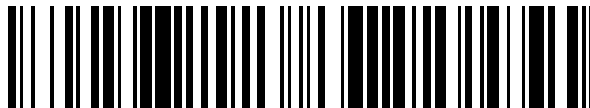


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 635**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/864** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 7/01** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2000 E 07022775 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1916258**

54 Título: **Incremento de la expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga monocatenaria de vectores virales recombinantes diseñando la secuencia de modo que forma pares de bases intracatenarios**

30 Prioridad:

**09.08.1999 US 160080 P**

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

**22.07.2014**

73 Titular/es:

**TARGETED GENETICS CORPORATION (100.0%)  
Suite 100, 1100 Olive Way  
Seattle, WA 98101, US**

72 Inventor/es:

**CARTER, BARRIE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 478 635 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

Incremento de la expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga monocatenaria de vectores virales recombinantes diseñando la secuencia de modo que forma pares de bases intracatenarios

5

**Campo técnico**

La invención está dentro del campo de las construcciones víricas para la administración de genes, en particular de vectores víricos recombinantes, tales como los vectores de virus adenoasociado (VAA), para utilización en terapia génica y en el cribado de productos genómicos.

10

**Antecedentes**

Los vectores recombinantes basados en parvovirus, tales como el virus adenoasociado (VAA), muestran ser prometedores para la terapia génica. Sin embargo, la obtención de niveles suficientes, eficaces, de expresión de un transgén en diferentes tipos celulares ha presentado problemas. Algunos tipos celulares no son permisivos, en el sentido de que el inicio de la transcripción o de la traducción del transgén es ineficaz, con una expresión, por consiguiente, muy lenta para iniciarse, si es que se inicia. Todavía en muchos contextos es deseable conseguir una expresión suficientemente rápida.

15

20

Los parvovirus son virus de ADN monocatenario pequeños, encapsidados, cuyo genoma de ADN está flanqueado por secuencias repetidas terminales invertidas (ITR). El genoma de ADN de los parvovirus codifica proteínas requeridas para la replicación (Rep) y la encapsidación (Cap). El virus adenoasociado (VAA) es un parvovirus defectuoso que se replica únicamente en células en las que se proporcionan ciertas funciones denominadas "funciones cooperadoras". Normalmente estas funciones son proporcionadas por la infección de un virus auxiliar. Pueden encontrarse revisiones generales de parvovirus, incluyendo VAA, en, por ejemplo, Carter (1989) *Handbook of Parvoviruses*; Berns (1995) *Virology*, Vol. 2, Raven Press, New York, páginas 2173-2197; Carter y col. (1983) En "The Parvoviruses" (K.I. Berns, ed.) Plenum Press, New York; Berns.

25

30

El genoma del VAA nativo es una molécula de ADN monocatenario lineal de 4.675 nucleótidos aproximadamente. Srivastava y col. (1983) *J. Virol.* **45**:555-564. El genoma del VAA nativo contiene secuencias que codifican las proteínas Rep y Cap (los genes *rep* y *cap*, respectivamente) flanqueadas por una secuencia repetida terminal invertida (ITR) de 145 nucleótidos. Hermonat y col. (1984) *J. Virol.* **51**:329-339; y Tratschin y col. (1984) *J. Virol.* **51**:611-619. El ciclo vital del VAA se presenta a continuación. El ciclo vital de otros parvovirus es similar, con la excepción de que los demás parvovirus no requieren funciones cooperadoras para su replicación (excepto hasta el punto de que puedan requerir que la célula hospedadora entre en fase S).

35

**Ciclo vital del VAA**

Esquemáticamente, un ciclo infeccioso productivo del VAA en una célula que ha sido infectada con un segundo virus auxiliar (o en una célula en la que están presentes funciones cooperadoras) procede según sigue (ver la Figura 1). La adsorción del VAA a una célula hospedadora es seguida por la inserción del genoma vírico monocatenario en un proceso conocido generalmente en la técnica como "transducción". En presencia de ciertas funciones de la célula hospedadora relacionadas con la replicación (tales como ADN polimerasas), el genoma vírico monocatenario entrante es convertido en una forma replicativa bicatenaria. Ver la Figura 2. Se cree que el inicio de esta conversión de monocatenario en bicatenario (SS→DS) implica la formación de una estructura en horquilla por secuencias dentro de la ITR del VAA, que genera una estructura molde-cebador a partir de la cual puede proceder el inicio de la replicación del ADN. El producto de esta conversión SS→DS, la forma replicativa (RF), es una molécula bicatenaria autocomplementaria que está cerrada covalentemente en un extremo (el extremo en el cual se inició la replicación). Ver la Figura 3. La RF es por tanto una molécula bicatenaria que tiene la misma complejidad de secuencia, pero dos veces aproximadamente el peso molecular, que el genoma del VAA entrante (esto es, para un genoma nativo de 4,7 kilobases aproximadamente, la RF tendrá un peso molecular correspondiente a 4,7 kilopares de bases). Aunque se cree que la formación de una horquilla terminal para cebar la replicación tiene lugar rápidamente, se postula que la extensión de esta horquilla para formar la RF bicatenaria es una de las etapas limitantes de la velocidad en la replicación del VAA. Este proceso de generación de la RF puede tener lugar en ausencia de una función cooperadora, pero se cree que es potenciado por la función cooperadora. Ver, Carter, B. y col. (1990) vol. I, pp. 169-226 y 255-282. Las células que son capaces de producir una progenie de VAA son generalmente consideradas por los expertos en la técnica como células "permisivas", y este proceso de conversión en un molde bicatenario es también conocido como "activación metabólica".

45

50

55

60

Después de su formación, la RF se replica para generar una progenie de RFs en un proceso facilitado por los productos del gen *rep* del VAA y por ciertas funciones cooperadoras (ver más adelante). Además, la RF sirve como molde para la formación de los genomas de la progenie del VAA, los cuales son empaquetados en partículas víricas. Estos genomas son moléculas de ADN monocatenario de 4,7 kb aproximadamente y representan las dos polaridades según se encuentran en la molécula de la RF bicatenaria.

65

Además de ser necesaria para la síntesis de los genomas de la progenie del VAA, la formación de la RF es requerida para que tenga lugar la transcripción de las proteínas víricas (o en el caso de VAA recombinante, para que tenga lugar la transcripción de secuencias heterólogas tales como un transgén), ya que los sistemas de polimerización de ARN celular requieren un molde bicatenario. La transcripción de los genes *rep* y *cap* del VAA tiene como resultado la producción de las proteínas Rep y Cap. Las proteínas Rep del virus facilitan la amplificación de la RF, la generación de los genomas víricos de la progenie, y pueden desempeñar también una función en la regulación de la transcripción del virus. Las proteínas Cap víricas son proteínas estructurales de la cápsida del virus. Los genomas víricos monocatenarios de la progenie de ambas polaridades están encapsidados en las partículas víricas hijas, que son posteriormente liberadas de la célula hospedadora.

Las funciones cooperadoras implicadas en la replicación de la RF, según describió anteriormente, pueden ser proporcionadas por la coinfección de células infectadas con VAA con adenovirus, virus herpes o poxvirus. Carter (1990) *supra*. Alternativamente, las células pueden contener genes integrados, víricos o de otro origen, que proporcionen la función cooperadora. Además, el requisito de la función cooperadora puede ser algunas veces obviado por el tratamiento de las células infectadas con VAA con agentes químicos y/o físicos tales como hidroximetilurea, irradiación ultravioleta, irradiación X o irradiación gamma, por ejemplo, que pueden inducir reparación celular, sistemas de recombinación y/o replicación, o que pueden afectar de otro modo al metabolismo del ADN celular. Jakobson y col. (1987) *J. Virol.* **61**:972-987; Jakobson y col. (1988) *J. Virol.* **63**:1023-1030; Bantel-Schaal, U. y col. (1988) *Virology* **164**:64-74; Bantel-Schaal, U. y col. (1988) *Virology* **166**:113-122; y Yalkinoglu y col. (1988) *Cancer Res.* **48**:3123-3125. Aunque pueda tener lugar la replicación de la RF, hasta cierto punto, en ausencia de la función cooperadora, en general este proceso es lento y/o ineficaz en ausencia de la función cooperadora.

De la Maza y Carter (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:3194-3203 describen moléculas de ADN del VAA variantes obtenidas de partículas del VAA. Algunas de estas moléculas son menores que la longitud unidad y presentan propiedades que sugieren que poseen regiones de autocomplementariedad. Hauswirth y Berns (1979) *Virology* **93**:57-68 describen moléculas variantes similares obtenidas a partir de células infectadas con VAA. Ver la Figura 4. Estas moléculas no contenían secuencias heterólogas; por consiguiente, su capacidad para expresar una secuencia heteróloga no pudo ser evaluada.

### 30 **Vectores y virus VAA recombinantes**

El genoma nativo del VAA ha sido utilizado como base de sistemas de vectores para la administración y la expresión de genes heterólogos en células hospedadoras tales como células de mamífero, tal como para terapia génica. Muzyczka (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:97-129; Carter, B.J. (1992) *Curr. Op. Biotechnol.* **3**:535-539 y Flotte y col. (1995) *Gene Therapy* **2**:357-362. Los vectores de VAA recombinante (VAAr), basados en el genoma nativo del VAA, son producidos en general mediante la delección de secuencias de *rep* y/o *cap* y la sustitución por una secuencia heteróloga. Por tanto, los vectores VAAr contienen generalmente una molécula de ADN monocatenario que comprende una secuencia o secuencias génicas heterólogas flanqueadas por al menos una ITR del VAA y típicamente por dos ITRs del VAA, una en cada extremo. Pueden estar incluidas también en los vectores VAAr secuencias adicionales implicadas en la regulación de la expresión de la secuencia heteróloga tales como promotores, sitios de ajuste, intrones, secuencias relacionadas con el transporte y la estabilidad del ARNm, señales de poliadenilación y sitios de unión de ribosomas.

Los vectores VAAr pueden ser encapsidados en partículas del virus VAA para formar virus adenoasociados recombinantes (VAAr). En general, el empaquetamiento productivo, eficaz, en una partícula de virus VAA está limitado a vectores que tengan aproximadamente el tamaño de un genoma del VAA (esto es, 4,7 kb aproximadamente) o menores; aunque secuencias con una longitud de hasta 5.200 nucleótidos aproximadamente pueden ser empaquetadas en partículas del virus VAA.

En un estudio del efecto de la longitud del genoma sobre la eficacia de empaquetamiento, se compararon genomas de VAAr que tenían tamaños entre 2 kb y 6 kb. Dong y col. (1996) *Hum. Gene Therapy* **7**:2101-2112. Se observó que vectores con tamaños entre 2 aproximadamente y 6 kb aproximadamente eran empaquetados en las partículas víricas con una eficacia similar, pero los virus que contenían moléculas del vector con longitudes mayores de 5,2 kb no eran infecciosos. Además, se obtuvieron pruebas en el estudio anteriormente mencionado que eran consistentes con la idea de que dos moléculas del vector podían ser empaquetadas en una única partícula de virus si los vectores eran menores de la mitad del tamaño del genoma nativo del VAA. Se presentó la especulación adicional sobre la capacidad de tales vectores cortos para formar moléculas bicatenarias dentro del virión. Los niveles de expresión de un transgén de la acetil transferasa de cloranfenicol (CAT) eran equivalentes para vectores del tamaño del genoma que contenían una única cadena del ADN del vector y para los vectores cortos, que se pensaba que contenían genomas del vector bicatenarios y producían niveles más elevados de ADN del vector en las células infectadas. Estos resultados indicaban que ni la reducción del tamaño del vector ni la presencia de ADN del vector potencialmente bicatenario tenían efectos significativos sobre los niveles de expresión.

Los vectores VAAr y las partículas de virus VAAr que contienen vectores VAAr pueden ser ambos utilizados para expresar productos de diferentes genes heterólogos en células hospedadoras mediante transformación o transducción, respectivamente. Los niveles de expresión conseguidos por tales vectores son afectados por los

5 mismos factores que influyen sobre la replicación y la transcripción del VAA nativo. Por tanto, después de la infección de una célula hospedadora por un VAAr, puede tener lugar la formación rápida de una horquilla terminal, pero la elongación de la horquilla para formar una RF procede mucho más lentamente. Ferrari y col. (1996) *J. Virol.* **70**:3227-3234; y Fisher y col. (1996) *J. Virol.* **70**:520-532; documento WO 96139530.

10 Los intentos para conseguir niveles máximos, eficaces, de expresión de secuencias heterólogas a partir de VAAr han estado dificultados para varias razones. La expresión de una secuencia heteróloga por un vector VAAr es máxima en una célula que haya sido infectada por un virus auxiliar, que exprese una función cooperadora o que haya sido tratada con un agente que remede la función cooperadora por afectar al metabolismo del ADN celular. Russell y col. (1995) *J. Virol.* **68**:5719-5723; Ferrari y col., *supra* y Fisher y col., *supra*. Para aplicaciones de terapia génica, la infección de las células hospedadoras con un virus auxiliar puede ser indeseable debido a los problemas de seguridad relacionados con las demás propiedades de los virus auxiliares y de las funciones cooperadoras. El tratamiento de las células con agentes que remedan la función celular cooperadora puede ser también indeseable debido a los efectos adicionales no específicos y/o a la toxicidad potencial. Además, la provisión de la función cooperadora por estos agentes puede ser eficaz únicamente para la infección con el VAA de tipo salvaje.

20 Además, se requieren las funciones de la proteína Rep del VAA para la expresión máxima de una secuencia heteróloga codificada por un vector VAAr. Como los vectores VAAr carecen generalmente de secuencias de *rep*, éstas deben ser suministradas exógenamente, complicando de este modo cualquier aplicación en terapia génica que utilice vectores VAAr. Por otra parte, la infección de una célula con un virus que contenga un vector VAAr, en ausencia de una fuente exógena de proteínas Rep, tendrá como resultado una amplificación limitada del genoma del VAAr y, por consiguiente, niveles bajos de expresión de la secuencia heteróloga.

25 Debido a que puede haber dificultades para obtener niveles suficientes de expresión de secuencias heterólogas a partir de vectores VAAr y de virus que contengan tales vectores, son deseables mejoras que incrementen la eficacia de expresión.

### Sumario de la invención

30 La invención proporciona composiciones para una expresión mejorada de una secuencia heteróloga (esto es, no vírica) por un vector de VAA recombinante, y por virus recombinantes que contengan tal vector.

35 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una preparación de virus adenoasociado recombinante de acuerdo con la Reivindicación 1.

40 Por tanto, los inventores describen un vector VAAr que contiene un polinucleótido monocatenario, con un extremo 5' y un extremo 3', que contiene una secuencia heteróloga flanqueada en uno o en ambos extremos por una repetición terminal invertida (ITR) del VAA, conteniendo dicha secuencia heteróloga una o más regiones capaces de tener un apareamiento de bases intracatenario (esto es, que forman pares de bases intracatenarios), vectores VAAr que son capaces de ser empaquetados en una partícula vírica de VAA.

45 En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga forma pares de bases esencialmente a lo largo de toda su longitud, de manera análoga por tanto a una forma replicativa (RF) del VAA. En tales realizaciones, la complejidad de secuencia de la secuencia heteróloga es alrededor de la mitad de la longitud de la secuencia heteróloga. En algunas realizaciones, el polinucleótido del VAAr contiene una ITR interna adicional (esto es, una ITR no terminal), preferiblemente en el centro aproximadamente de la única cadena.

50 Se describen también células hospedadoras que contienen los vectores víricos recombinantes de la invención. En otro aspecto, se describen en el presente documento bibliotecas de vectores víricos recombinantes.

55 Los inventores describen métodos para producir partículas de parvovirus, tales como partículas de virus VAA, que contienen los vectores de parvovirus recombinantes (incluyendo VAAr) descritos en el presente documento. Estos métodos incluyen la utilización de un vector parvovirus monocatenario (por ejemplo VAAr) en el que la longitud del vector es aproximadamente la mitad de la longitud del genoma del parvovirus nativo (por ejemplo VAA) y donde el vector contiene una secuencia de nucleótidos heteróloga y una o más secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) flanqueando dicha secuencia heteróloga. El vector es introducido en una célula hospedadora que proporciona la función *rep*, la función *cap* y, cuando es necesario, funciones cooperadoras; y la célula hospedadora infectada es incubada bajo condiciones que conducen a la replicación y a la encapsidación del virus. Son proporcionados también por la invención vectores víricos recombinantes (esto es, poblaciones de vectores víricos recombinantes) producidos de acuerdo con este método, así como virus que contienen tales vectores (esto es, poblaciones de virus que contienen tales vectores).

65 En otro aspecto, la invención incluye una preparación para ser utilizada en un método para la introducción de una secuencia heteróloga (tal como un gen de interés) en una célula hospedadora utilizando los vectores descritos en el presente documento y métodos para la expresión de una secuencia heteróloga (tal como un producto génico de interés) en una célula hospedadora, tal como células de mamífero, utilizando los vectores descritos en el presente

documento. Los métodos comprenden la puesta en contacto de un vector de VAA recombinante de la invención, que contiene una secuencia o gen de interés, o una partícula de VAAr que contiene tal vector, con una célula hospedadora bajo condiciones que permitan la captación del o de los vectores (que son un polinucleótido exógeno), mediante lo cual el vector de VAA recombinante es transfectado en la célula hospedadora. En el caso de expresión, una región o secuencia codificante de la secuencia heteróloga es transcrita y/o traducida.

Además, la invención proporciona métodos para explorar, o identificar un fenotipo asociado con la expresión de una región codificante en un vector de VAA recombinante de la invención. Dichos métodos serán útiles, por ejemplo, en técnicas de identificación de diana y de validación de diana. Estos métodos implican someter una célula (o población de células) que contiene vector o vectores de VAA recombinantes descritos en el presente documento a condiciones favorables para la expresión, y comparar el fenotipo de esta célula o estas células con un fenotipo de una célula o células que no contienen dicho vector recombinante, donde una diferencia de fenotipo indica un fenotipo asociado con la expresión de la región o regiones codificantes del vector o los vectores virales recombinantes. Estos métodos incluyen la etapa de introducir el vector o los vectores virales recombinantes de interés.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para construir una biblioteca de acuerdo con la Reivindicación 8.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático del ciclo vital del VAA.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de la conversión de un genoma de VAA monocatenario entrante en una forma replicativa (RF) bicatenaria. En el caso de un genoma de VAA nativo, la formación de la RF permite la expresión de los genes *rep* y *cap*; en el caso de un vector VAAr, la formación de la RF permite la expresión de un transgén (esto es, del gen contenido en el casete de expresión).

La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un modelo para la replicación del VAA. Una cadena "más" (parte izquierda de la figura) o una cadena "menos" (parte derecha de la figura) es convertida primeramente en una RF bicatenaria. Un segundo ciclo de replicación genera un concatémero cabeza-cabeza o cola-cola, donde "cabeza" se define arbitrariamente como el extremo izquierdo (o extremo 5' de la cadena "más") y "cola" se define arbitrariamente como el extremo derecho (o extremo 5' de la cadena "menos").

La Figura 4 es un diagrama esquemático de genomas del VAA DI (interferentes defectuosos). El genoma del VAA está representado en las dos moléculas superiores en su forma bicatenaria con ambos extremos abiertos (resueltos) o con un extremo cerrado como en la RF. Las dos moléculas inferiores ilustran la consecuencia de introducir una deleción entre dos sitios  $\delta$  y  $\delta'$ . Si la región entre  $\delta$  y  $\delta'$  es aproximadamente el 50% o más del genoma del VAA, entonces la molécula representada en la parte más inferior puede ser empaquetada directamente en una cápsida del VAA. Adaptado de Carter (1983) En "The Parvoviruses" (K.I. Berns, ed.) Plenum Press, New York, pp. 209-258.

Las Figuras 5A-5E ilustran la construcción de un vector AAV-GFP de tamaño mitad.

Las Figuras 6A-6F ilustran dos estrategias para la construcción de vectores AAV-GFP de tamaño completo.

Las Figuras 7A-7B son reproducciones a media tinta del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del ADN del vector procedente de partículas víricas. Los valores del peso molecular, determinado mediante el análisis paralelo de marcadores, están mostrados a la izquierda.

La Figura 7A muestra una electroforesis bajo condiciones alcalinas. La Calle 1 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma del vector de tamaño mitad aislado del plásmido pAAVGFP(0.5). La Calle 2 muestra ADN aislado de partículas del vector de tamaño mitad. La Calle 3 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño completo aislado del plásmido pAAVGFP(Sal). La Calle 4 muestra ADN aislado de las partículas con el vector de tamaño completo.

La Figura 7B muestra una electroforesis bajo condiciones neutras. La Calle 1 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño mitad aislado del plásmido pAAVGFP(0.5). La Calle 2 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño mitad aislado del plásmido pAAVGFP(0.5) que fue desnaturalizado antes de ser cargado en el gel. La Calle 3 muestra el análisis de ADN aislado de partículas con el vector de tamaño mitad. La Calle 4 muestra ADN aislado de partículas con el vector de tamaño mitad que fue desnaturalizado antes de ser cargado en el gel. La Calle 5 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño completo aislado del plásmido pAAVGFP(Sal). La Calle 6 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño completo aislado del plásmido pAAVGFP(Sal) que fue desnaturalizado antes de ser cargado en el gel. La Calle 7 muestra ADN aislado de partículas con el vector de tamaño completo. La Calle 8 muestra ADN aislado de partículas con el vector de tamaño completo que fue desnaturalizado antes de ser cargado en el gel.

Las Figuras 8A-8B son reproducciones a media tinta del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de genomas de ADN del vector procedentes de células infectadas.

La Figura 8A muestra una electroforesis bajo condiciones neutras. La Calle 1 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño mitad aislado del plásmido pAAVGFP(0.5). La Calle 2 muestra ADN aislado de partículas con el vector de tamaño mitad. La Calle 3 muestra ADN del vector procedente de células HeLa infectadas con adenovirus aislado 6 horas después de la infección con el vector de tamaño mitad. La Calle 4 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 6 horas después de la infección con el vector de tamaño mitad. La Calle 5 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 24 horas

después de la infección con el vector de tamaño mitad. La Calle 6 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 48 horas después de la infección con el vector de tamaño mitad. La Calle 7 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 72 horas después de la infección con el vector de tamaño mitad. La Calle 8 muestra el análisis de un fragmento de ADN que contiene el genoma de un vector de tamaño completo aislado de pAAVGFP(Sal). La Calle 9 muestra ADN aislado de partículas con el vector de tamaño completo. La Calle 10 muestra ADN del vector procedente de células HeLa infectadas con adenovirus aislado 6 horas después de la infección con el vector de tamaño completo. La Calle 11 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 6 horas después de la infección con el vector de tamaño completo. La Calle 12 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 24 horas después de la infección con el vector de tamaño completo. La Calle 13 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 48 horas después de la infección con el vector de tamaño completo. La Calle 14 muestra ADN del vector procedente de células HeLa aislado 72 horas después de la infección con el vector de tamaño completo.

La Figura 8B muestra una electroforesis bajo condiciones alcalinas. Las denominaciones de las calles son las mismas que en la Figura 8A. Los valores del peso molecular, determinados mediante el análisis paralelo de marcadores, están mostrados a la izquierda.

Las Figuras 9A-9B son reproducciones a media tinta del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de genomas de ADN del vector procedentes de partículas fraccionadas en gradientes de CsCl. La Figura 9A muestra una electroforesis bajo condiciones neutras. La Figura 9B muestra una electroforesis bajo condiciones alcalinas.

Las denominaciones de las calles son las mismas para ambas Figuras 9A y 9B. Las Calles 1-5 muestran el análisis de los genomas de vectores procedentes de partículas con el vector de tamaño mitad. La Calle 1 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,388 g/ml. La Calle 2 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,379 g/ml. La Calle 3 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,375 g/ml. La Calle 4 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,371 g/ml. La Calle 5 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,362 g/ml. Las Calles 6-10 muestran el análisis de genomas de vectores procedentes de partículas con el vector de tamaño completo. La Calle 6 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,394 g/ml. La Calle 7 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,387 g/ml. La Calle 8 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,381 g/ml. La Calle 9 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,377 g/ml. La Calle 10 muestra el análisis de partículas que forman bandas a una densidad de 1,372 g/ml. Los valores del peso molecular, determinados mediante el análisis paralelo de marcadores, están mostrados a la izquierda.

La Figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión TNFR:Fc procedente de la Patente de EE.UU. N° 5.605.690.

#### Modos de llevar a cabo la invención

Los inventores han descubierto que la capacidad de un vector parvovírico recombinante para formar pares de bases intracatenarios contribuye a incrementar los niveles y/o la velocidad de expresión de una secuencia heteróloga contenida en tal vector. Los vectores VAAr que contenían dos copias de la proteína fluorescente verde (GFP) en orientación opuesta, y que eran por consiguiente capaces de formar una molécula bicatenaria debido al apareamiento de bases intracatenario, muestran niveles de expresión significativamente mayores (indicados por el porcentaje de células que expresaban el gen informador) en células 293 y HeLa en comparación con otro vector que no era capaz de formar apareamiento de bases intracatenario del gen de la GFP. Los resultados observados en células HeLa son particularmente sorprendentes, ya que se sabe que estas células son ineficaces para expresar vectores VAAr. La propiedad del apareamiento de bases intracatenario es particularmente ventajosa en contextos en los cuales es deseable obtener una expresión más eficaz de una secuencia heteróloga, tal como en ciertas aplicaciones de terapia génica y en el cribado de productos genómicos. Tipos celulares que habían sido considerados tradicionalmente como no permisivos en el sentido de una expresión ineficaz (ya sea debido a la variación con el tiempo de la expresión y/o a los niveles de expresión) de vectores parvovíricos, son ahora hospedadores utilizables, prácticos.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría, el nivel y/o la velocidad de expresión incrementados por los vectores VAAr en la preparación de la invención pueden deberse a su facilidad para formar una estructura bicatenaria. Como el genoma del VAA nativo existe como una molécula de ADN monocatenaria en el virión, la expresión de una secuencia heteróloga en un vector VAAr depende de la formación de una forma replicativa bicatenaria, ya que la transcripción requiere un molde de doble hebra. Por consiguiente, la conversión del genoma de un vector de VAA recombinante en una forma replicativa bicatenaria (un proceso conocido también como "activación metabólica" del vector) es una etapa crítica en la expresión de una secuencia heteróloga. Si el genoma de un vector entrante está en forma bicatenaria o está en una forma a partir de la cual puede adoptar rápidamente una conformación bicatenaria, proporcionando moldes para la transcripción más eficaces y/o más tempranos durante el ciclo infeccioso, se incrementa la expresión de una secuencia insertada en comparación con otros vectores VAAr. Expresado de forma diferente, el genoma de un vector VAAr activado metabólicamente se convertirá en bicatenario con una cinética de orden cero, ya sea en una partícula de virus o en una célula infectada. Por tanto, para los vectores VAAr de la invención activados metabólicamente, la formación de una estructura de bases apareadas no es una etapa crítica ni/o limitante de la velocidad en la expresión de una secuencia heteróloga o gen heterólogo de interés.

Por tanto, los inventores describen vectores VAAr capaces de formar apareamiento de bases intracatenario de secuencias heterólogas, así como composiciones y células hospedadoras que contienen estos vectores. La invención proporciona también métodos que utilizan estos vectores tales como transfección, transducción, expresión y cribado de productos genómicos.

Según se indicó anteriormente, la expresión de una secuencia heteróloga, tal como un transgén, a partir de un vector parvovírico recombinante, tal como un vector VAAr, depende de varias etapas, comenzando con la entrada en la célula hospedadora, la conversión de la forma monocatenaria en una forma bicatenaria y la transcripción y la traducción de la secuencia heteróloga. Este proceso tiene lugar en células que son clasificadas fenotípicamente en la técnica como permisivas. Como es conocido de manera general por los expertos en la técnica, los términos transducción, transcripción, traducción y permisividad son acontecimientos molecularmente y fenotípicamente distinguibles que pueden ser medidos todos ellos experimentalmente (y lo han sido en varias publicaciones) por la expresión del transgén según métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en el presente documento. La invención descrita en el presente documento se refiere a vectores de VAA recombinantes que presentan una eficacia incrementada de la expresión de una secuencia heteróloga y por tanto pueden ser referidos por los expertos en la técnica como vectores que mejoran la traducción, convierten a las células en permisivas y/o incrementan las velocidades de transcripción o traducción.

## **Técnicas Generales**

La práctica de la presente invención emplea, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de virología, bioquímica, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante y campos relacionados que están dentro de la experiencia en la técnica. Estas técnicas están explicadas en profundidad en la literatura. Ver, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales), y referencias relacionadas.

## **Definiciones**

Según se utiliza en el presente documento, la forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluye las referencias en plural, a no ser que se indique de otro modo. Por ejemplo, un polinucleótido que contiene "una" región que forma apareamiento de bases intracatenario puede incluir una o más de tales regiones.

"Recombinante" se refiere a una entidad genética distinta de la encontrada generalmente en la naturaleza. Aplicado a un polinucleótido o gen, este término significa que el polinucleótido es el producto de diferentes combinaciones de etapas de clonaje, restricción y/o ligadura, y de otros procedimientos que tienen como resultado la producción de una construcción que es distinta del polinucleótido encontrado en la naturaleza.

Un "vector", según se utiliza en el presente documento, se refiere a un plásmido o virus recombinante que contiene un polinucleótido que va a ser administrado a una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*. El polinucleótido que va a ser administrado, referido algunas veces como "secuencia heteróloga", "polinucleótido diana", "transgén" o "gen de interés", puede contener una secuencia de interés en terapia génica (tal como un gen que codifique una proteína o un transcrito de ARN, tal como un transcrito antisentido o un ribozima, de interés terapéutico) y/o un marcador seleccionable o detectable.

Un "vector vírico recombinante" se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que contiene una o más secuencias heterólogas (esto es, una secuencia de polinucleótidos que no es de origen vírico). En el caso de vectores parvovíricos recombinantes, el polinucleótido recombinante está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos, secuencias repetidas terminales invertidas (ITRs).

Un "vector de VAA recombinante (vector VAAr)" se refiere a un vector polinucleotídico que contiene una o más secuencias heterólogas (esto es, secuencias de polinucleótidos que no son de origen VAA) que están flanqueadas por al menos una, preferiblemente dos, secuencias repetidas terminales invertidas (ITRs) del VAA. Tales vectores VAAr pueden ser replicados y empaquetados en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que ha sido infectada con un virus auxiliar adecuado (o que está expresando funciones cooperadoras adecuadas) y que está expresando los productos de los genes *rep* y *cap* del VAA (esto es, las proteínas Rep y Cap del VAA). Cuando un vector VAAr está incorporado en un polinucleótido más grande (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para clonaje o transfección), el vector VAAr puede ser entonces referido como un "provector" que puede ser "rescatado" mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento del VAA y de funciones cooperadoras adecuadas. Un VAAr puede estar en cualquiera de varias formas, incluyendo, pero sin limitarse a, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, acompañado con lípidos, encapsulado en liposomas y, muy preferiblemente, encapsidado en una partícula vírica, en particular de VAA.

Un vector VAAr puede ser empaquetado en una partícula vírica de VAA para generar un "virus adenoasociado recombinante" (VAAr). El vector de tamaño máximo que puede ser empaquetado para dar lugar a una partícula vírica infecciosa es de 5,2 kb aproximadamente.

5 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la identidad con la cual se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo celular diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De manera similar, una secuencia celular (por ejemplo un gen o una porción del mismo) que está incorporada en un vector vírico, es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

10 Para los fines de esta invención, "heterólogo" significa heterólogo con respecto a un virus que es la base de un vector vírico recombinante. Por consiguiente, y como ejemplo, un vector VAAr de la invención puede ser utilizado para introducir y/o expresar una secuencia de mamífero, y por tanto "heteróloga", en una célula de mamífero.

15 Una "región" de un polinucleótido es una secuencia de nucleótidos contiguos. Una región puede ser al menos aproximadamente cualquiera de las siguientes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 85, 100, 110, 120, 130, 145, 150, 160, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más nucleótidos contiguos.

20 Una "región codificante" de un polinucleótido (en esta invención, una "región codificante" de una secuencia heteróloga) es una secuencia de nucleótidos contiguos que da lugar en una célula hospedadora a un producto de transcripción y/o traducción. Por ejemplo, una "región codificante" puede dar lugar a una molécula de ARN tal como un transcrito antisentido, un ribozima. Como otro ejemplo no limitante, una región codificante puede dar lugar a un polipéptido. Se comprende que la "región codificante" puede dar lugar a todo o a una porción de un producto de transcripción o de traducción, así como a variantes y otras formas modificadas. El producto de transcripción y/o traducción deseado puede presentar o no una función (esto es, puede presentar o no un fenotipo detectable o medible cuando está presente en una célula hospedadora). Esto tiene especialmente importancia en las aplicaciones de cribado de productos genómicos, en las cuales secuencias candidato son analizadas para determinar una función. Una región codificante puede ser al menos aproximadamente cualquiera de las siguientes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 85, 100, 110, 120, 130, 145, 150, 160, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más nucleótidos contiguos.

30 Una "región (o secuencia) que forma pares de bases intracatenarios" (incluyendo una región codificante que forma pares de bases intracatenarios) es una región (tal como una región codificante) que es complementaria en secuencia a otra región de la misma cadena, y que es capaz por tanto de formar pares de bases con la secuencia complementaria, esto es, es capaz de autohibridación. Las interacciones de pares de bases tienen lugar de acuerdo con propiedades moleculares bien conocidas y reconocidas en la técnica de las bases de nucleótidos, de tal manera que la adenina se aparea con la timina o el uracilo y la guanina se aparea con la citosina. Por tanto, la adenina es complementaria a la timina y al uracilo, y *viceversa*; de manera similar, la guanina es complementaria a la citosina y *viceversa*. Si una primera secuencia polinucleotídica es complementaria a lo largo de toda su longitud a una segunda secuencia polinucleotídica, se dice que la dos secuencias son perfectamente complementarias, están perfectamente apareadas o son totalmente complementarias entre sí. Si una mayoría de bases de una primera secuencia polinucleotídica es complementaria a la mayoría de bases de una segunda secuencia polinucleotídica, pero una o más bases no son complementarias, se dice que las dos secuencias de polinucleótidos son sustancialmente complementarias entre sí si su grado de complementariedad es suficiente para permitir la formación de dúplexes. Se comprende que, para los fines de esta invención, un vector vírico recombinante que contiene una secuencia o región que forma pares de bases intracatenarios presenta una expresión incrementada cuando se compara con un vector por lo demás similar (o idéntico) excepto por el grado de apareamiento de bases intracatenario. Por tanto, el grado de apareamiento de bases intracatenario no necesita ser el 100% de la secuencia, sino que puede ser al menos aproximadamente cualquiera de los siguientes: 25%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%. El apareamiento de bases intracatenario es suficiente para permitir la transcripción sin una replicación de ADN previa de la cadena. Generalmente, para los fines de esta invención, existirán pares de bases intracatenarios en una célula hospedadora durante la expresión y/o la replicación de la región codificante de interés. Los pares de bases intracatenarios podrán tener lugar, pero no necesariamente, antes de que un vector vírico recombinante de la invención sea introducido en una célula hospedadora, tal como empaquetado en una partícula de VAAr.

55 Una "repetición terminal invertida" o secuencia "ITR", es un término bien conocido en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas encontradas en los extremos de los genomas víricos que están en orientación opuesta.

60 Una secuencia "repetida terminal invertida (ITR) del VAA", un término bien conocido en la técnica, es una secuencia de 145 nucleótidos aproximadamente que está presente en ambos extremos del genoma del VAA monocatenario nativo. Los 125 nucleótidos más al extremo de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de las dos orientaciones alternativas, dando lugar a heterogeneidad entre diferentes genomas del VAA y entre los dos extremos del genoma de un único VAA. Los 125 nucleótidos más al extremo contienen también varias regiones más cortas de autocomplementariedad, permitiendo que tenga lugar el apareamiento de bases intracatenario en esta porción de la ITR.



Un "virus auxiliar" de VAA se refiere a un virus que permite al VAA (que es un parvovirus defectuoso) ser replicado y empaquetado por una célula hospedadora. Se han identificado varios de tales virus auxiliares incluyendo adenovirus, virus herpes y poxvirus tales como vaccinia. Los adenovirus incluyen varios subgrupos diferentes, aunque el más comúnmente utilizado es el adenovirus de tipo 5 del subgrupo C (Ad5). Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, de mamífero no humano y de origen aviar, y están disponibles en depósitos tales como la ATCC. Virus de la familia herpes, que están también disponibles en depósitos tales como la ATCC, incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (VPR).

"Función cooperadora" se refiere a una actividad requerida para la replicación y/o el empaquetamiento de un parvovirus pero que no está codificada en ese parvovirus. La función cooperadora puede ser proporcionada por un virus auxiliar. Se cree también que las funciones cooperadoras estimulan la transcripción de algunos promotores del VAA, incluyendo p5, y pueden incrementar la procesividad de replicación en las células en las que se expresan las funciones cooperadoras.

Un "promotor", según se utiliza en el presente documento", se refiere a una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen o secuencia codificante a la cual está unida operativamente.

"Unidos operativamente" se refiere a la disposición de dos o más componentes, donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de manera coordinada. A modo de ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción o promotor está unida operativamente a una secuencia codificante si la secuencia reguladora de la transcripción o promotor facilita algún aspecto de la transcripción de la secuencia codificante. Aspectos del proceso de la transcripción incluyen, pero no se limitan a, inicio, elongación, atenuación y terminación. Una secuencia reguladora de la transcripción unida operativamente está generalmente unida en *cis* a la secuencia codificante, pero no es necesariamente directamente adyacente a la misma.

Un "replicón" se refiere a un polinucleótido que contiene un origen de replicación que permite la replicación del polinucleótido en una célula hospedadora apropiada. Ejemplos de replicones incluyen virus, episomas (incluyendo plásmidos), así como cromosomas (tales como cromosomas nucleares o mitocondriales).

Un "origen de replicación" es una secuencia de nucleótidos implicada en uno o más aspectos del inicio de la replicación del ADN del VAA, tal como, por ejemplo, el inicio de la replicación, el desenrollamiento del ADN bicatenario, la formación de cebadores y/o la síntesis de una hebra complementaria dirigida por el molde. El origen de replicación del VAA está situado en la secuencia repetida terminal invertida (ITR) del VAA y facilita la replicación de secuencias a las que está unido operativamente. En la práctica de la invención, el origen del VAA puede ser sustituido por una secuencia similar a *ori*, según se describe en la PCT copropiedad WO 99/20779.

"Empaquetamiento" se refiere a una serie de acontecimientos subcelulares que tienen como resultado el ensamblaje y la encapsidación de un vector vírico, tal como un vector VAAr. Por tanto, cuando un vector adecuado es introducido bajo condiciones apropiadas en una línea celular de empaquetamiento, puede ser ensamblado para dar lugar a una partícula vírica.

"Transducción" es la introducción de un gen exógeno en una célula mediante infección vírica, donde el gen exógeno es parte de un genoma vírico recombinante.

Los "genes *rep* y *cap*" son genes que codifican proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Los "genes *rep* y *cap* del VAA" son genes del VAA que codifican proteínas de replicación y encapsidación. Se han encontrado proteínas de *rep* y *cap* del VAA en todos los serotipos de VAA examinados, y están descritas en el presente documento y en las referencias citadas. En el VAA de tipo salvaje, los genes *rep* y *cap* se encuentran generalmente adyacentes entre sí dentro del genoma vírico (esto es, están "acoplados" juntos como unidades transcripcionales contiguas o solapantes) y en general están conservados entre los serotipos de VAA. Los genes *rep* y *cap* del VAA pueden ser referidos individualmente y colectivamente como "genes de empaquetamiento del VAA". Pueden utilizarse también en la presente invención genes de empaquetamiento del VAA que hayan sido modificados por una delección o una mutación puntual, o que hayan sido subdivididos en componentes que puedan ser unidos de nuevo mediante recombinación (por ejemplo, según está descrito en la PCT copropiedad WO 98/27204, cuya descripción se incorpora de este modo por referencia). Los genes de empaquetamiento del VAA pueden ser también unidos operativamente a otras secuencias reguladoras de la transcripción, incluyendo secuencias promotoras, intensificadoras y de poliadenilación ("poliA") (secuencias reguladoras de la transcripción adicionales que pueden ser también heterólogas). Un "casete de empaquetamiento del VAA" es una construcción recombinante que incluye uno o más genes de empaquetamiento del VAA.

Una "célula hospedadora" es una célula que ha sido o puede ser receptora de un(os) vector(es) de esta invención y la progenie de la misma. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genómica del complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Las células hospedadoras son preferiblemente células eucarióticas, preferiblemente células de

mamífero, muy preferiblemente células humanas.

Los términos "gen terapéutico", "polinucleótido diana", "transgén", "gen de interés", "secuencia heteróloga", etcétera, se refieren de manera general a una secuencia o secuencias que van a ser transferidas utilizando un vector. Preferiblemente, tales secuencias están localizadas en un vector parvovírico recombinante, más preferiblemente en un vector VAAr (vector que está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos, regiones ITR, y que por tanto puede replicarse y ser encapsidado en partículas de VAAr). Pueden utilizarse en esta invención polinucleótidos diana para generar vectores parvovíricos recombinantes (preferiblemente VAAr) para varias aplicaciones diferentes. Tales polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a: (i) polinucleótidos que codifican proteínas útiles en otras formas de terapia génica para aliviar deficiencias causadas por niveles ausentes, defectuosos o subóptimos de una proteína estructural o de un enzima; (ii) polinucleótidos que son transcritos para dar moléculas antisentido; (iii) polinucleótidos que son transcritos para dar lugar a señuelos que se unen a factores de transcripción o de traducción; (iv) polinucleótidos que codifican moduladores celulares tales como citoquinas; (v) polinucleótidos que pueden convertir a las células receptoras en susceptibles a fármacos específicos, tal como el gen de la timidina quinasa del virus herpes; (vi) polinucleótidos para terapia del cáncer, tales como los genes supresores de tumores E1A o los genes supresores de tumores p53 para el tratamiento de diferentes cánceres y (vii) polinucleótidos que codifican antígenos o anticuerpos. Para llevar a cabo la expresión del transgén en una célula hospedadora receptora, el mismo está preferiblemente unido operativamente a un promotor o a otra secuencia reguladora de la transcripción similar, ya sea su propio promotor o un promotor heterólogo. Se conocen en la técnica un gran número de promotores adecuados, cuya elección depende del nivel deseado de expresión del polinucleótido diana; de si se desea una expresión constitutiva, una expresión inducible, una expresión específica de una célula o una expresión específica de un tejido, etc. El vector recombinante puede contener también un marcador seleccionable.

Un "producto génico" es un producto codificado por una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente una secuencia de ADN, y puede ser ARN o proteína. Ejemplos de productos génicos que son ARN incluyen ARNm, ARNr, ARNt, ARN estructural, ARN catalítico y ribozimas. Ejemplos de productos génicos que son proteínas, codificados por medio de un ARNm intermedio, incluyen proteínas estructurales y enzimas.

El término "expresión" incluye transcripción y/o traducción. Los métodos para detectar la transcripción, tal como el análisis Northern, y la traducción, tal como el análisis Western o el ELISA, son bien conocidos en la técnica. Estos métodos permiten también medir diferencias de niveles de transcripción y/o traducción, ya sean esas diferencias entre diferentes vectores, diferentes tiempos, diferentes células hospedadoras, etc.

"Polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos o cualquier combinación de los anteriores. El término incluye ácidos nucleicos monocatenarios, bicatenarios y tricatenarios, así como estructuras de orden superior, tales como cuartetos. Incluye también polinucleótidos modificados tales como polinucleótidos metilados o con casquete ("capped"), y análogos de polinucleótidos tales como ácidos nucleicos de poliamida (peptídicos). Los polinucleótidos pueden ser moléculas lineales, ramificadas o circulares. Un polinucleótido lineal tiene dos extremos; en el caso de un polinucleótido monocatenario, éstos pueden ser caracterizados como un extremo 5' y un extremo 3'.

El término "complejidad de una secuencia" o "complejidad" se refiere a la cantidad total de secuencia única presente en un polinucleótido. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no repetida con una longitud de 500 nucleótidos, tiene una complejidad de 500 nucleótidos, mientras que una secuencia que tiene una longitud de 500 nucleótidos y que está compuesta por dos copias de una secuencia de 250 nucleótidos idénticas (o casi idénticas) tiene una complejidad de 250 nucleótidos. La complejidad de la secuencia puede ser determinada mediante la medida de la tasa de reasociación entre dos polinucleótidos complementarios, correlacionándose una complejidad más elevada con tasas menores. Ver, por ejemplo, Britten y col. (1985) en "Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach" (ed. B.D. Hames & S.J. Higgins) IRL Press, Oxford, Capítulo 1, pp. 3-15 y las referencias citadas en el mismo. La complejidad de la secuencia puede ser determinada también directamente mediante secuenciación del ADN.

Una "biblioteca" es una población de vectores, en la que los vectores individuales contienen diferentes secuencias heterólogas, y las secuencias heterólogas reflejan la población de ácidos nucleicos de, por ejemplo, una célula, tejido o etapa del desarrollo particular. Por ejemplo, una "biblioteca de ADNc" es una población de vectores que contienen una pluralidad de insertos de ADNc distintos, donde los insertos de ADNc derivan de una población de ARNm. Una "biblioteca genómica" es una población de vectores que tienen una pluralidad de insertos distintos, en los que cada inserto representa una porción del genoma de una célula o de un organismo.

Las condiciones que "permiten" que tenga lugar un acontecimiento, tal como la captación de un polinucleótido exógeno, tal como un vector vírico recombinante, en una célula, tal como una célula de mamífero, o la infección por un virus, son condiciones que no impiden que tengan lugar tales acontecimientos. De este modo, estas condiciones permiten, intensifican, facilitan y/o conducen al acontecimiento, tal como la entrada del polinucleótido exógeno en la célula. Tales condiciones, conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, dependen de la naturaleza de la célula así como del polinucleótido exógeno (esto es, de si es introducido como un vector desnudo, formando complejos o empaquetado). Estas condiciones dependen también del acontecimiento que se desee, tal como la

expresión o la infección.

Un "fenotipo" es un acontecimiento o condición celular y/o molecular detectable que surge de la composición genética de una célula u organismo.

5 Un "individuo" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, e incluye, pero sin limitarse a, animales domésticos, animales de granja, roedores, primates y humanos.

10 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Una cantidad eficaz puede ser administrada en una o más administraciones. En términos de un estado de enfermedad, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad.

15 ***Vectores víricos recombinantes de la invención y composiciones que contienen los vectores víricos recombinantes***

Los inventores describen vectores VAA recombinantes que contienen secuencias de nucleótidos heterólogas monocatenarias en las cuales una o más regiones forman pares de bases intracatenarios. Técnicas para producir y utilizar vectores virales están descritas en el oficio.

20 En algunas realizaciones, la invención proporciona vectores VAAr polinucleotídicos monocatenarios en los cuales una o más regiones de la secuencia heteróloga, que comprende la secuencia codificante, forman pares de bases intracatenarios. Los vectores VAAr de la invención contienen un extremo 5' y un extremo 3' (esto es, no son circulares) así como ITR(s) que flanquea(n) uno o ambos extremos.

25 La(s) región(es) de complementariedad intracatenaria (esto es, la(s) región(es) que forma(n) pares de bases intracatenarios) en el vector vírico recombinante es(son) posicionalmente y/o cuantitativamente suficiente(s) para incrementar la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés contenida en el vector, en comparación con un vector que sea estructuralmente análogo excepto por la posición y/o la cantidad de apareamiento de bases, de tal manera que el vector análogo carece de complementariedad intracatenaria suficiente para incrementar la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés. La(s) región(es) de apareamiento de bases intracatenario está(n) dentro de la(s) región(es) codificante(s), esto es, el apareamiento de bases intracatenario tiene lugar en una secuencia de nucleótidos que va a ser expresada. En realizaciones preferidas, la(s) región(es) codificante(s) completa(s) tiene(n) apareamiento de bases.

35 Las regiones de complementariedad intracatenaria pueden estar en cualquier lugar a lo largo de la secuencia heteróloga y pueden ser de cualquiera de varios tamaños, con respecto a nucleótidos contiguos, y la formación de pares de bases intracatenarios es suficiente para permitir la transcripción sin replicación de ADN previo de la cadena. Además, se entiende que la región o secuencia de formación de pares de bases intracatenarios está dentro de una región codificante de una secuencia heteróloga. En algunas realizaciones, una(s) región(es) está(n) adyacente(s) a, o, alternativamente, próxima(s) a, un extremo (5' o 3'). En otras realizaciones, una(s) región(es) está(n) adyacente(s) a, o cerca de, el centro de la molécula del VAAr. Una región puede tener al menos aproximadamente cualquiera de los siguientes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 85, 100, 110, 120, 130, 145, 150, 160, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más nucleótidos contiguos la formación de pares de bases intracatenarios es suficiente para permitir la transcripción sin previa replicación de ADN de la cadena. En algunas realizaciones, la cantidad total de secuencia que forma pares de bases intracatenarios (que pueden estar en una o más regiones) es mayor de 125 nucleótidos aproximadamente, mayor de 250 nucleótidos aproximadamente, mayor de 500 nucleótidos aproximadamente y/o mayor de 1.000 nucleótidos aproximadamente.

50 Si una secuencia heteróloga contiene más de una de tales regiones, las regiones pueden estar separadas por varios nucleótidos o hasta por varios cientos de nucleótidos. La región debe incluir la secuencia cuya expresión (esto es, transcripción y/o traducción) se desea. Por ejemplo, un vector VAAr puede contener dos secuencias para expresión antisentido, o dos genes pequeños, contiguos (esto es, sin nucleótidos intermedios) o separados por nucleótidos no codificantes. El vector contiene también secuencia complementarias (en orientación opuesta para permitir el apareamiento de bases) de las dos secuencias "codificantes".

60 En una realización, los vectores de VAA recombinante de la invención tienen una complejidad de secuencia que es aproximadamente la mitad de su longitud, con las secuencias dispuestas de tal modo que una porción de la molécula contiene un complemento invertido de otra porción. Bajo estas circunstancias, un vector es capaz de formar una molécula con rehibridación intracatenaria ("snap-back") que es bicatenaria a lo largo de la mayor parte o de toda su longitud, análoga por tanto a la RF producida durante la infección por VAA.

65 En otras realizaciones, el vector VAAr, contiene además un ITR interna (esto es, una ITR que está flanqueada en ambos lados por secuencias heterólogas), que es distinta de la(s) ITR(s) que flanquea(n) la secuencia heteróloga. Esta ITR interna divide preferiblemente la secuencia heteróloga, de tal manera que el apareamiento de bases intracatenario tiene lugar entre región(es) a ambos lados de la ITR interna. Muy preferiblemente, esencialmente toda

la secuencia heteróloga a ambos lados de la ITR está implicada en el apareamiento de bases intracatenario. Los Ejemplos 4-7 ilustran tal vector.

Los vectores de VAA recombinantes en la preparación de la invención están empaquetados en una partícula de VAA. Por consiguiente, su tamaño puede variar hasta 5,2 kb aproximadamente y/o el límite de empaquetamiento del VAA que esté siendo utilizado. Se comprende, sin embargo, que un vector vírico de la invención puede ser, y a menudo será, más pequeño que el límite de empaquetamiento. En el caso de un vector VAAr de la invención, su longitud puede ser menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes: 5,5, 5,2, 5,0, 4,8, 4,0, 3,8, 3,5, 3,0, 2,8, 2,5, 2,0, 1,8, 1,5, 1,0, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 kilobases.

De acuerdo con la invención, se proporcionan partículas de VAA recombinante que contienen un vector VAAr de la invención. Los métodos para producir partículas de VAAr son conocidos en la técnica, y métodos para producir VAAr son proporcionados en el presente documento así como en la técnica. Con respecto al VAA, cualquier serotipo es adecuado, ya que los diferentes serotipos están funcionalmente y estructuralmente relacionados, incluso a nivel genético (ver, por ejemplo, Blacklow, pp. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J.R. Pattison, ed. (1988); y Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974). El serotipo VAA2 fue utilizado en algunas de las ilustraciones de la presente invención que están mostradas en los Ejemplos. Sin embargo, se espera que los mismos principios derivados del análisis de VAA2 sean aplicables a otros serotipos del VAA, ya que se sabe que los diferentes serotipos están bastante estrechamente relacionados, funcionalmente y estructuralmente, incluso a nivel genético. Ver, por ejemplo, Blacklow (1988) *Parvoviruses and Human Disease*, J.R. Pattison (ed.) pp. 165-174; y Rose (1974) *Comprehensive Virology* 3:1-61. Todos los serotipos del VAA presentan aparentemente propiedades de replicación similares mediadas por los genes *rep* homólogos, y generalmente todos ellos llevan tres proteínas de la cápsida relacionadas tales como las expresadas en VAA2. El grado de relación es sugerido además por el análisis de los heterodúplexes, que revela un extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y por la presencia de segmentos análogos que autohibridan en los extremos y que corresponden a ITRs. Los patrones de infectividad similares sugieren también que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo un control regulador similar. Entre los diferentes serotipos del VAA, VAA2 es el más comúnmente empleado. Para una revisión general de la biología y de la genética del VAA ver, por ejemplo, Carter, "Handbook of Parvoviruses", Vol. 1, pp. 169-228 (1989) y Berns, "Virology", pp. 1743-1764, Raven Press (1990). Los principios generales de la construcción de vectores VAAr son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; y Muzyczka, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.

Con respecto a los vectores, pueden producirse y utilizarse partículas de VAAr que contengan los vectores, composiciones y métodos que utilicen estos restos anteriormente mencionados, poblaciones de tales vectores (y/o virus). Por ejemplo, según se discute posteriormente, algunos métodos para producir tales vectores víricos pueden dar lugar a una población de vectores que contenga vectores con apareamiento de bases intracatenario. Durante el proceso de replicación (en la producción de estos vectores), algunos genomas monocatenarios pueden resultar interrumpidos ("nicked") y conservar su estructura bicatenaria. Estas moléculas bicatenarias son consideradas funcionalmente equivalentes a las moléculas dúplexes intracatenarias descritas en el presente documento y, por consiguiente, esta invención incluye tales poblaciones y otros restos estrechamente relacionados (así como métodos que utilizan estas poblaciones y estos restos estrechamente relacionados), tales como vectores "interrumpidos" ("nicked").

Por consiguiente, la invención proporciona vectores de VAA recombinantes en los cuales una región heteróloga forma un dúplex sin replicación del ADN de la célula hospedadora. La formación de dúplexes es de tal manera que la expresión de una secuencia de interés está incrementada cuando se compara con un vector estructuralmente análogo que carece de una formación de dúplexes suficiente para incrementar la expresión de la secuencia de interés.

### 50 Composiciones

La invención proporciona composiciones que contienen los vectores VAAr. Estas composiciones son útiles para, *inter alia*, ser administradas a un individuo con el fin de suministrarle genes, así como para la puesta en contacto con células hospedadoras adecuadas para el cribado fenotípico.

En general, estas composiciones contienen componentes que facilitan su utilización, tales como excipientes farmacéuticos y/o tampones apropiados. Para uso farmacéutico, la composición contiene generalmente una cantidad eficaz de un vector de VAA recombinante, preferiblemente en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como es bien conocido en la técnica, los excipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz y pueden ser suministrados como soluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones, o como formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en un líquido antes de su utilización. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación y tampones. Excipientes, así como formulaciones para la administración de fármacos parenteral y no parenteral están descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 19ª Ed. Mack Publishing (1995). Las composiciones farmacéuticas incluyen también

formas liofilizadas y/o reconstituidas de los vectores de VAA recombinantes de la invención, y pueden ser utilizadas en un entorno *in vitro* así como en un entorno *in vivo*.

5 Generalmente, estas composiciones farmacéuticas son formuladas para su administración mediante inyección (por ejemplo, intraarticularmente, intravenosamente, intramuscularmente, etc.). Por consiguiente, estas composiciones son combinadas preferiblemente con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de sales equilibrada de Ringer (pH 7,4), solución de dextrosa, etcétera. Aunque no es requerido, las composiciones farmacéuticas pueden ser suministradas opcionalmente en forma de dosificación unidad adecuada para la administración de una cantidad precisa.

10 Para la introducción *in vitro* en células hospedadoras, tal como en aplicaciones de cribado, las composiciones contienen agentes tales como sales y tampones que estimulan la infección vírica y/o la captación del(los) vector(es) vírico(s) por las células. Tales agentes son bien conocidos en la técnica.

15 La invención incluye también cualquiera de los vectores anteriores (o composiciones que contienen los vectores) para su utilización en tratamiento (debido a la expresión de un gen terapéutico). La invención proporciona además la utilización de cualquiera de los vectores anteriores (o de las composiciones que contienen los vectores) en la producción de un medicamento para tratamiento.

## 20 Células hospedadoras y bibliotecas

La especificación divulga también células hospedadoras que contienen los vectores de VAA recombinantes como se describen en el presente documento. Entre las células hospedadoras eucarióticas están las células de levaduras, insectos, aves, plantas y mamíferos. Preferiblemente, las células hospedadoras son de mamífero, incluyendo líneas celulares y células primarias. Por ejemplo, las células hospedadoras incluyen, pero no se limitan a, células HeLa, 25 293 y fibroblastos primarios de prepucio fetal, todas ellas de origen humano y fácilmente disponibles. Estas células son el resultado del contacto del polinucleótido del vector con una célula hospedadora utilizando métodos bien conocidos en la técnica para la introducción de ácidos nucleicos en células bajo condiciones que permitan la captación del ácido nucleico y la inserción no homóloga de un ácido nucleico exógeno en un genoma. Se discuten en el presente documento métodos y composiciones para la introducción del(los) vector(es) recombinante(s) en la 30 célula hospedadora y para la determinación de si una célula hospedadora contiene el(los) vector(es), según está ejemplificado por los vectores VAAr, y son bien conocidos en la técnica.

35 Incluidas en estas realizaciones, y discutidas más adelante, están las denominadas "células productoras" utilizadas como base para la producción de vectores VAAr empaquetados.

Están también incluidas bibliotecas que contienen los vectores de VAA recombinantes como se describen en el presente documento. Será obvio para los expertos en la técnica que una población celular que sea expuesta a varios de los vectores de VAA recombinantes de la invención, esto es, a vectores que contienen varias secuencias heterólogas, bajo condiciones que permitan la captación de ADN exógeno, estará compuesta por una pluralidad de 40 células, donde la mayoría de las células se caracterizará porque cada una de ellas tendrá un vector vírico particular en comparación con las demás células de la población. Esto es, se generará una biblioteca de células, donde la mayoría de las células de la biblioteca tendrá una secuencia codificante exclusiva que será diferente de la secuencia codificante de cualquier otra o de la mayoría de las otras células de la biblioteca. Esta biblioteca de células marcadas será útil en diferentes tipos de investigaciones de genómica funcional, tal como la comparación de células enfermas con sus equivalentes normales, la comparación de células en diferentes etapas del desarrollo, etc.

## **Producción de los vectores de VAA recombinantes de la invención**

50 Los vectores de VAA recombinantes en la preparación de la invención pueden ser producidos mediante cualquier método conocido en la técnica tales como métodos recombinantes y sintéticos, que están bien descritos en la técnica. Cualquier método que genere una molécula polinucleotídica monocatenaria como la descrita flanqueada por al menos una ITR es adecuado. Como ejemplo, pueden utilizarse las técnicas sintéticas conocidas para sintetizar una molécula bicatenaria que contenga una secuencia de interés flanqueada por una o más secuencias ITR. Tal 55 molécula puede ser desnaturalizada y sus cadenas individuales constituyentes pueden ser recuperadas. Alternativamente, pueden obtenerse cadenas individuales después de clonar tal molécula bicatenaria en un vector de clonaje fágico filamentosos, tal como M13, fl o fd, por ejemplo, como es conocido por los expertos en la técnica. Una cadena individual purificada será capaz de formar una horquilla corta en cada uno de sus extremos, debido a las secuencias ITR localizadas en los mismos. La extensión de la horquilla corta por una polimerasa de ácido nucleico en presencia de desoxinucleósidos trifosfato generará un vector metabólicamente activado.

60 En otra realización, se utiliza un polinucleótido monocatenario que contiene una secuencia de interés con una ITR en un extremo. Tal polinucleótido puede ser obtenido, por ejemplo, mediante desnaturalización del polinucleótido bicatenario correspondiente, o por recuperación a partir de un vector de clonaje fágico filamentosos. La extensión de la horquilla corta formada por la secuencia ITR terminal generará una molécula bicatenaria cerrada covalentemente en un extremo, con una secuencia ITR parcial en el extremo cerrado covalentemente. Opcionalmente, una

secuencia ITR bicatenaria puede ser ligada al extremo opuesto mediante técnicas bien conocidas por los expertos en el oficio.

5 Los vectores VAAr en la preparación de la invención pueden ser producidos construyendo un vector VAAr que tenga un tamaño que sea la mitad aproximadamente del genoma nativo y permitiendo que tal vector se replique en una célula hospedadora. En el caso de VAAr, la célula hospedadora proporciona por consiguiente las funciones *rep* y *cap*, así como las funciones cooperadoras. Después de la replicación, el genoma de tamaño mitad es copiado en una hebra de ADN complementaria que está unida covalentemente a su molde en un extremo (ver las Figuras 1 y 3), formando una estructura que tendrá rehibridación intracatenaria ("snap-back") para dar lugar a una horquilla bicatenaria. Estas estructuras genómicas, que tienen una longitud monocatenaria comparable a la de un genoma nativo (tal como VAA), pueden ser empaquetadas en partículas víricas bajo condiciones apropiadas en una célula que se ha convertido en permisiva por la expresión de funciones cooperadoras (en el caso del VAA) y en la que se expresan también los genes *rep* y *cap*. Estos vectores parvovíricos recombinantes contienen una secuencia ITR entre las secuencias heterólogas (esto es, una secuencia ITR flanqueada en ambos lados por secuencias heterólogas).

20 Como ejemplo de este método de producción, un plásmido con la mitad del tamaño aproximadamente del genoma nativo del VAA, esto es, de 2.300-2.400 pares de bases aproximadamente, es transfectado en una línea celular productora que, además, está infectada con un virus auxiliar o bien expresa funciones cooperadoras. Un ejemplo no limitante de una línea celular productora es la línea C12. La C12 es una línea de células HeLa que contiene un casete de los genes *rep* y *cap*, en la cual la expresión de Rep y Cap es inducida tras la infección con adenovirus. Cuando las células C12 (o líneas celulares equivalentes) son simultáneamente infectadas con adenovirus y transfectadas con un vector plasmídico, el genoma del vector es amplificado y encapsidado en partículas de VAA. Para que un genoma de VAAr tenga un tamaño comparable al del genoma del VAA nativo, genomas correspondientes a cada una de las cadenas del vector pueden ser empaquetados en partículas víricas.

30 Según se describió anteriormente, los vectores virales recombinantes de esta invención contienen un polinucleótido heterólogo. Como se desea en general la transcripción de un polinucleótido heterólogo del vector en la célula diana deseada, el mismo puede estar unido operativamente a su propio promotor o a un promotor y/o intensificador heterólogo, dependiendo por ejemplo del nivel y/o la especificidad deseados de la transcripción en la célula diana, como es conocido en la técnica. Varios tipos de promotores e intensificadores son adecuados para utilización en este contexto. Por ejemplo, Feldhaus (Solicitud de Patente de EE.UU. 09/171.759, registrada el 20 de Octubre de 1998) describe una ITR modificada que contiene un promotor para regular la expresión procedente de un VAAr. Los promotores constitutivos proporcionan un nivel continuo de transcripción génica, y se prefieren cuando se desea que el polinucleótido terapéutico sea expresado de manera continua. Los promotores inducibles o regulables presentan generalmente una baja actividad en ausencia del inductor, y aumentan de manera regulada en presencia del inductor. Pueden ser preferidos cuando se desea la expresión únicamente a ciertos tiempos o en ciertas localizaciones, o cuando es deseable valorar el nivel de expresión utilizando un agente inductor. Los promotores y los intensificadores pueden ser también específicos de un tejido, esto es, presentan su actividad únicamente en ciertos tipos celulares, debido presumiblemente a elementos reguladores génicos encontrados exclusivamente en esas células. Tales promotores e intensificadores específicos de un tejido son conocidos en la técnica. A manera de ilustración, un ejemplo de promotores específicos de un tejido incluye diferentes promotores de miosina para la expresión en músculo. Otro ejemplo de promotores e intensificadores específicos de un tejido son los elementos reguladores para tipos celulares y/o tisulares que están en una articulación.

45 Ejemplos ilustrativos adicionales de promotores son el promotor tardío de SV40 procedente del virus de simio 40, el elemento intensificador/promotor polihédrico de Baculovirus, la timidina quinasa del Virus del Herpes Simple (tk del VHS), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y diferentes promotores retrovíricos incluyendo los elementos LTR. Promotores inducibles adicionales incluyen promotores inducibles por iones de metales pesados (tal como el promotor del virus del tumor mamario de ratón (VTMm) o diferentes promotores de la hormona de crecimiento), y los promotores procedentes del fago T7 que son activos en presencia de la ARN polimerasa de T7. Se conoce una gran variedad de otros promotores que están generalmente disponibles en la técnica, y las secuencias de muchos de tales promotores están disponibles en bases de datos de secuencias tales como la base de datos GenBank.

50 Cuando se desea también la traducción en una célula diana deseada, el polinucleótido heterólogo contiene también preferiblemente elementos de control que facilitan la traducción (tal como un sitio de unión de ribosomas o "RBS", y una señal de poliadenilación). Por consiguiente, el polinucleótido heterólogo contendrá generalmente al menos una región codificante unida operativamente a un promotor adecuado, y puede contener también, por ejemplo, un intensificador, un sitio de unión de ribosomas y una señal de poli-A unidos operativamente. El polinucleótido heterólogo puede contener una región codificante o más de una región codificante bajo el control de los mismos promotores o de promotores diferentes. La unidad completa, que contiene una combinación de elementos de control y la región codificante, es referida a menudo como casete de expresión.

65 Un polinucleótido heterólogo es integrado mediante técnicas recombinantes en, o preferiblemente en lugar de, la región codificante genómica del virus (por ejemplo en lugar de los genes *rep* y *cap* del VAA), pero, en el caso de

parvovirus, está generalmente flanqueado en cada lado por ITRs. Esto significa que aparece una ITR corriente arriba y corriente abajo de la secuencia codificante, en yuxtaposición directa, preferiblemente (aunque no necesariamente) sin ninguna secuencia intermedia de origen vírico, con el fin de reducir la probabilidad de recombinación. En el caso del VAA, tal recombinación podría regenerar un genoma del VAA competente para la replicación ("RCA"). Pruebas recientes sugieren que una única ITR puede ser suficiente para llevar a cabo las funciones normalmente asociadas con configuraciones que comprenden dos ITRs (Patente de EE.UU. 5.478.745), y pueden emplearse por tanto construcciones de vectores con sólo una ITR junto con los métodos de empaquetamiento y producción descritos en el presente documento. El vector vírico recombinante resultante es referido como "defectuoso" en funciones víricas cuando secuencias codificantes víricas específicas son eliminadas del vector.

Los vectores víricos recombinantes son proporcionados en una variedad de formas, tal como en forma de plásmidos bacterianos, partículas víricas, liposomas o cualquier combinación de las mismas. En otras realizaciones, la secuencia del vector vírico recombinante es proporcionada en las células hospedadoras transfectadas con el vector vírico.

Lo que sigue a continuación es una descripción más detallada de ejemplos y principios de sistemas de producción adecuados de vectores VAAr (y de VAA conteniendo estos vectores). Se comprende que muchos de los principios aquí descritos son aplicables a otros parvovirus.

Para la encapsidación en partículas de VAA2, el polinucleótido heterólogo será preferiblemente menor de 5 kb aproximadamente, aunque pueden emplearse otros serotipos y/o modificaciones con el fin de permitir que secuencias mayores sean empaquetadas en las partículas víricas de VAA. Dados los límites del tamaño de encapsidación relativo de los diferentes genomas del VAA, la inserción de un polinucleótido heterólogo grande en el genoma necesita la eliminación de una porción del genoma del VAA, en particular, uno o más de los genes de empaquetamiento pueden ser eliminados. La eliminación de uno o más genes del VAA es deseable en cualquier caso para reducir la probabilidad de generar RCA. Por consiguiente, secuencias codificantes o promotoras de *rep*, *cap*, o ambos, son preferiblemente eliminadas, ya que las funciones proporcionadas por estos genes pueden ser proporcionadas en *trans*.

Si el VAAr va a ser utilizado en forma de una partícula de VAAr empaquetado y se desea emplear en terapia génica, hay al menos tres características deseables en la preparación de un virus VAAr para utilización en transferencia génica. En primer lugar, se prefiere que el virus VAAr sea generado con títulos suficientemente elevados para transducir una proporción eficaz de células en el tejido diana. Se requiere típicamente un número elevado de partículas víricas de VAAr para la transferencia génica *in vivo*. Por ejemplo, algunos tratamientos pueden requerir más de  $10^8$  partículas. En segundo lugar, se prefiere que las preparaciones de virus VAAr estén esencialmente libres de VAA competente para la replicación (esto es, VAA fenotípicamente de tipo salvaje que puede replicarse en presencia de un virus auxiliar o de las funciones de un virus auxiliar). En tercer lugar, se prefiere que la preparación de virus VAAr como un todo esté esencialmente libre de otros virus (tal como el virus auxiliar utilizado en la producción de VAA) así como de virus auxiliares y de proteínas celulares, y de otros componentes tales como lípidos y carbohidratos, con el fin de minimizar o eliminar cualquier riesgo de generar una respuesta inmune en el contexto de la transferencia de genes.

Si un vector VAAr va a ser empaquetado en una partícula de VAA para replicar y empaquetar el vector VAAr, las funciones que faltan son complementadas por un gen de empaquetamiento, o por una pluralidad de los mismos, que juntos codifican las funciones necesarias para los diferentes productos de los genes *rep* y/o *cap* que faltan. Los genes o casetes de genes de empaquetamiento preferiblemente no están flanqueados por ITRs de VAA y preferiblemente no comparten ninguna homología sustancial con el genoma del VAAr. Por tanto, con el fin de minimizar la recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia del vector y los genes de empaquetamiento proporcionados separadamente, es deseable evitar el solapamiento de las dos secuencias polinucleotídicas. El nivel de homología y la frecuencia de recombinación correspondiente aumentan al aumentar la longitud de las secuencias homólogas y con su nivel de identidad compartida. El nivel de homología que planteará un problema en un sistema dado puede ser determinado teóricamente y confirmado experimentalmente, según se conoce en la técnica. De manera general, sin embargo, la recombinación puede ser reducida sustancialmente o eliminada si la secuencia solapante es menor que una secuencia de 25 nucleótidos aproximadamente si es al menos un 80% idéntica a lo largo de su longitud completa, o menor que una secuencia de 50 nucleótidos aproximadamente si es al menos un 70% idéntica a lo largo de su longitud completa. Por supuesto, son preferibles niveles de homología incluso menores, ya que los mismos reducirán adicionalmente la probabilidad de recombinación. Parece que, incluso sin homología solapante, existe una cierta frecuencia residual de generación de RCA. Incluso reducciones adicionales de la frecuencia de generación de RCA (por ejemplo, mediante recombinación no homóloga) pueden ser obtenidas "dividiendo" las funciones de replicación y encapsidación del VAA, según está descrito por Allen y col. en la Solicitud de Patente de EE.UU. 08/769.728, registrada el 18 de Diciembre de 1996.

La construcción del vector VAAr, y las construcciones de genes de empaquetamiento complementarias, pueden ser llevadas a cabo en esta invención de varias formas diferentes. Partículas víricas, plásmidos y células hospedadoras transformadas de manera estable pueden ser utilizados todos ellos para introducir tales construcciones en la célula de empaquetamiento, ya sea de manera transitoria o estable.

Puede utilizarse por tanto en el contexto de esta invención una variedad de células diferentes alteradas genéticamente. A manera de ilustración, puede utilizarse una célula hospedadora de mamífero con al menos una copia intacta de un vector VAAr integrado de manera estable. Puede utilizarse un plásmido de empaquetamiento del VAA que contenga al menos un gen *rep* del VAA unido operativamente a un promotor para suministrar funciones de replicación (según está descrito en la Patente de EE.UU. 5.658.776). Alternativamente, puede utilizarse una línea celular de mamífero estable con un gen *rep* del VAA unido operativamente a un promotor para suministrar funciones de replicación (ver, por ejemplo, Trempe y col., Patente de EE.UU. 5.837.484; Burstein y col., WO 98/27207; y Johnson y col., Patente de EE.UU. 5.658.785). El gen *cap* del VAA, que proporciona las proteínas de encapsidación según se describió anteriormente, puede ser suministrado junto con un gen *rep* del VAA o separadamente (ver, por ejemplo, las solicitudes y patentes anteriormente referenciadas así como Allen y col. (WO 96/17947)). Son posibles otras combinaciones.

Según está descrito en la técnica, e ilustrado en las referencias citadas anteriormente y en los Ejemplos posteriores, puede introducirse material genético en células (tal como en células "productoras" de mamífero para la producción de VAAr) utilizando cualquiera de una variedad de medios para transformar o transducir tales células. A manera de ilustración, tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, transfección con plásmidos bacterianos, infección con vectores víricos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio y la introducción utilizando cualquiera de una variedad de composiciones basadas en lípidos (un proceso referido a menudo como "lipofección"). Métodos y composiciones para llevar a cabo estas técnicas han sido descritos en el oficio y están ampliamente disponibles.

La selección de células alteradas adecuadamente puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica del oficio. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas utilizadas para alterar la célula pueden ser introducidas simultáneamente con, o unidas operativamente a, uno o más marcadores detectables o seleccionables según se conoce en la técnica. A manera de ilustración, puede emplearse un gen de resistencia a fármacos como marcador seleccionable. Las células resistentes al fármaco pueden ser luego recogidas y cultivadas y analizadas posteriormente para determinar la expresión de la secuencia deseada (esto es, un producto del polinucleótido heterólogo). El análisis de la adquisición, localización y/o mantenimiento de un polinucleótido introducido puede ser llevado a cabo utilizando técnicas basadas en la hibridación del ADN (tales como transferencia Southern y otros procedimientos conocidos en la técnica). El análisis de la expresión puede ser llevado a cabo fácilmente mediante análisis Northern de ARN extraído de las células alteradas genéticamente, o mediante inmunofluorescencia indirecta para determinar el producto génico correspondiente. El análisis y la confirmación de las capacidades y eficacias de empaquetamiento pueden ser obtenidos introduciendo en la célula los componentes funcionales restantes del VAA y un virus auxiliar, con el fin de analizar la producción de partículas del VAA. Cuando una célula es alterada de forma heredable con un pluralidad de construcciones polinucleotídicas, es generalmente más conveniente (aunque no esencial) introducir las mismas en la célula separadamente y validar cada etapa en serie. Referencias que describen tales técnicas incluyen las citadas en el presente documento.

En un procedimiento para empaquetar vectores VAAr en una partícula de VAA, la secuencia del vector VAAr (esto es, la secuencia flanqueada por ITRs del VAA) y los genes de empaquetamiento del VAA que van a ser proporcionados *in trans*, son introducidos en la célula hospedadora en plásmidos bacterianos separados. Ejemplos de este procedimiento están descritos en Ratschin y col., 1984, *Mol. Cell. Biol.*, **4**:2072; Hermonat y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6466; Tratschin y col., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, **5**:3251; McLaughlin y col., 1988, *J. Virol.*, **62**:1963; Lebkowski y col., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, **7**:349; Samulski y col., 1989, *J. Virol.*, **63**:3822-3828; Flotte y col., 1992, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **7**:349.

Un segundo procedimiento es proporcionar la secuencia del vector VAAr, o los genes de empaquetamiento del VAA, en forma de un plásmido episómico en una célula de mamífero utilizada para la replicación del VAA. Ver, la Patente de EE.UU. 5.173.414.

Un tercer procedimiento es proporcionar la secuencia del vector VAAr, o los genes de empaquetamiento del VAA, o ambos, integrados de manera estable en el genoma de la célula del mamífero utilizada para la replicación, según está ejemplificado en el Ejemplo 2 posteriormente.

Una técnica ejemplar de este tercer procedimiento está esquematizada en la Solicitud de Patente Internacional WO 95/13365 (Targeted Genetics Corporation y Johns Hopkins University) y en la Patente de EE.UU. correspondiente N° 5.658.776 (de Flotte y col.). Este ejemplo utiliza una célula de mamífero con al menos una copia intacta de un vector VAAr integrado de manera estable, donde el vector contiene una ITR del VAA y un promotor de la transcripción unido operativamente a un polinucleótido diana, pero donde la expresión de *rep* es limitante en la célula. En una realización preferida, un plásmido de empaquetamiento del VAA que contiene el gen *rep* unido operativamente a un promotor heterólogo es introducido en la célula, y posteriormente la célula es incubada bajo condiciones que permiten la replicación y el empaquetamiento de la secuencia del vector VAAr en partículas.

Otro procedimiento está esquematizado en Trempe y col., Patente de EE.UU. 5.837.484. Este ejemplo utiliza una línea celular de mamífero estable con un gen *rep* del VAA unido operativamente a un promotor heterólogo con el fin de que sea capaz de expresar una proteína Rep funcional. En varias realizaciones preferidas, el gen *cap* del VAA



puede ser proporcionado también de manera estable o puede ser introducido transitoriamente (por ejemplo en un plásmido). Un vector VAAr puede ser también introducido de manera estable o transitoria.

Otro procedimiento está esquematizado en la Solicitud de Patente WO 96/17947 (Targeted Genetics Corporation). Este ejemplo utiliza una célula de mamífero que contiene un gen *cap* del VAA integrado de manera estable, y un gen *rep* del VAA integrado de manera estable unidos operativamente a un promotor heterólogo inducible por un virus auxiliar. Un plásmido que contiene la secuencia del vector VAAr es también introducido en las células (ya sea de manera estable o transitoria). El empaquetamiento del vector VAAr en partículas es iniciado posteriormente por la introducción del virus auxiliar.

Métodos para conseguir títulos elevados de preparaciones víricas de VAAr que están sustancialmente libres de virus y/o proteínas víricas o celulares contaminantes están descritos por Atkinson y col. en WO 99/11764. Las técnicas descritas en la misma pueden ser empleadas para la producción a gran escala de preparaciones de partículas víricas con VAAr.

Estos diferentes ejemplos abordan la cuestión de la producción de partículas víricas con VAAr a un título suficientemente elevado, minimizando la recombinación entre el vector VAAr y las secuencias que codifican los componentes de empaquetamiento, reduciendo o evitando las dificultades potenciales asociadas con la expresión del gen *rep* del VAA en una línea celular de mamífero (ya que las proteínas Rep pueden no sólo limitar su propia expresión sino también afectar al metabolismo celular) y produciendo preparaciones víricas de VAAr que están sustancialmente libres de virus y/o proteínas víricas o celulares contaminantes.

El empaquetamiento de un vector VAA en partículas víricas se basa en la presencia de un virus auxiliar adecuado para VAA o en el suministro de las funciones del virus auxiliar. Los virus auxiliares capaces de apoyar la replicación del VAA están ejemplificados por adenovirus, pero incluyen otros virus tales como los virus herpes (incluyendo, pero sin limitarse a, VHS1, citomegalovirus y VHH-6) y poxvirus (particularmente vaccinia). Puede utilizarse cualquiera de tales virus.

Frecuentemente, el virus auxiliar será un adenovirus de un tipo y subgrupo que pueda infectar la célula hospedadora deseada. Se utilizan comúnmente adenovirus humanos del subgrupo C, particularmente los serotipos 1, 2, 4, 6 y 7. Generalmente se prefiere el serotipo 5.

Las características y los patrones de crecimiento de los adenovirus son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Horowitz, "Adenoviridae and their replication", pp. 771-816 en "Fundamental Virology", Fields y col., eds. El genoma del adenovirus empaquetado es una molécula de ADN lineal, ligada mediante las ITRs adenovíricas de los extremos izquierdo y derecho a través de un complejo proteico terminal para formar un círculo. Regiones de control y codificantes de los componentes tempranos, intermedios y tardíos solapan dentro del genoma. Los genes de la región temprana están implicados en la replicación del genoma del adenovirus y están agrupados dependiendo de su localización en las regiones E1, E2, E3 y E4.

Aunque no es esencial, es deseable en principio que la cepa del virus auxiliar sea defectuosa para la replicación en el sujeto que va a recibir finalmente la terapia génica. Por tanto, cualquier virus auxiliar residual presente en una preparación vírica de VAAr será incompetente para la replicación. Adenovirus en los que se ha eliminado la región E1A o las regiones E1A y E3 no son infecciosos para la mayoría de las células humanas. Pueden ser replicados en una línea celular permisiva (por ejemplo, la línea celular humana 293) que sea capaz de complementar la actividad que falta. Se han identificado y descrito en la técnica regiones de adenovirus que parecen estar asociadas con las funciones cooperadoras, así como regiones que no lo están (ver, por ejemplo, P. Colosi y col., WO 97/17458, y las referencias citadas en la misma).

Por ejemplo, según está descrito en Atkinson y col. (WO 99/11764), puede emplearse también un virus auxiliar "sensible de manera condicional" para proporcionar la actividad del virus auxiliar. Tal cepa de virus auxiliar debe tener como mínimo la propiedad de ser capaz de apoyar la replicación del VAA en una célula hospedadora bajo al menos un conjunto de condiciones en las que el él mismo no experimenta una replicación genómica eficaz. Cuando la actividad del virus auxiliar es suministrada como partículas víricas intactas, es también en general necesario que el virus sea capaz de replicarse en una célula hospedadora bajo un segundo conjunto de condiciones. El primer conjunto de condiciones diferirá del segundo conjunto de condiciones en una característica fácilmente controlable, tal como la presencia o ausencia de un cofactor requerido (tal como un catión), la presencia o ausencia de un fármaco inhibidor o un desplazamiento de una condición ambiental tal como la temperatura. Muy convenientemente, la diferencia entre las dos condiciones es la temperatura, y tal virus sensible de manera condicional es referido por tanto como un virus auxiliar sensible a la temperatura.

El virus auxiliar puede ser preparado en cualquier célula que sea permisiva para la replicación vírica. Para adenovirus, las células preferidas incluyen las células 293 y las células HeLa. Es preferible emplear técnicas de cultivo que permitan un incremento de la densidad de siembra. Hay disponibles variantes de células 293 y de células HeLa que han sido adaptadas para el cultivo en suspensión. Las HeLa son preferibles por razones de crecimiento, viabilidad y morfología celular en suspensión. Estas células pueden ser cultivadas a una densidad suficiente ( $2 \times 10^6$

por ml) para compensar la tasa de replicación más baja de la cepa de adenovirus sensible a la temperatura. Una vez establecidas, las células son infectadas con el virus y cultivadas a la temperatura permisiva durante un periodo de tiempo suficiente; generalmente 3-7 días y típicamente alrededor de 5 días.

- 5 Ejemplos de métodos útiles para la preparación, el aislamiento y la concentración de virus auxiliares pueden ser encontrados en Atkinson y col. (WO 99/11764).

Varios criterios influyen sobre la selección de células para utilización en la producción de partículas con VAAr según se describe en el presente documento. Como cuestión inicial, la célula debe ser permisiva para la replicación y el empaquetamiento del vector VAAr cuando se utiliza el virus auxiliar seleccionado. Sin embargo, como la mayoría de la células de mamífero pueden ser infectadas productivamente por VAA, y muchas pueden ser también infectadas por virus auxiliares tales como adenovirus, está claro que una gran variedad de células y líneas celulares de mamífero satisfacen eficazmente estos criterios. Entre éstas, las células y líneas celulares más preferidas son aquellas que pueden ser crecidas fácilmente en cultivo con el fin de facilitar la producción a gran escala de las preparaciones víricas de VAAr. Una vez más, sin embargo, muchas de tales células satisfacen eficazmente este criterio. Cuando se desea una producción a gran escala, la elección del método de producción influirá también sobre la selección de la célula hospedadora. Por ejemplo, según está descrito con más detalle en Atkinson y col. (WO 99/11764) y en la técnica, algunas técnicas de producción y los recipientes o cámaras de cultivo están diseñados para el crecimiento de células adherentes o fijadas, mientras que otros están diseñados para el crecimiento de células en suspensión. En este último caso, la célula hospedadora deberá ser por tanto adaptada o adaptable al crecimiento en suspensión. Sin embargo, incluso en el caso de células y líneas celulares que son consideradas adherentes o dependientes del anclaje, es posible derivar variantes adaptadas al crecimiento en suspensión de una línea parental dependiente del anclaje mediante la selección seriada de células capaces de crecer en suspensión. Ver, por ejemplo, Atkinson y col. (WO 99/11764).

Finalmente, el virus auxiliar, la secuencia del vector VAAr y todas las secuencias del VAA necesarias para la replicación y el empaquetamiento deben estar presentes en la misma célula. Cuando se proporcionan uno o más genes de empaquetamiento del VAA separadamente del vector, se proporciona una célula hospedadora que contiene: (i) uno o más genes de empaquetamiento del VAA, donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento del VAA codifica una proteína de replicación o encapsidación del VAA; (ii) un polinucleótido heterólogo introducido en dicha célula hospedadora utilizando un vector VAAr, donde dicho vector VAAr contiene dicho polinucleótido heterólogo flanqueado por al menos una ITR del VAA y es deficiente en dicho(s) gen(es) de empaquetamiento del VAA; y (iii) un virus auxiliar o secuencias que codifican las funciones del virus auxiliar requeridas. Debe indicarse, sin embargo, que uno o más de estos elementos pueden estar combinados en un único replicón.

El virus auxiliar es introducido preferiblemente en el cultivo celular a un nivel suficiente para infectar a la mayoría de las células del cultivo, pero por otra parte puede ser mantenido en un mínimo con el fin de limitar la cantidad de virus auxiliar presente en la preparación resultante. Puede utilizarse una multiplicidad de infección o "MOI" de 1-100, pero es típicamente adecuada una MOI de 5-10.

De manera similar, si el vector VAAr y/o los genes de empaquetamiento son introducidos transitoriamente en la célula de empaquetamiento (en oposición a ser introducidos de manera estable), son introducidos preferiblemente a un nivel suficiente para alterar genéticamente a la mayoría de las células del cultivo. Las cantidades generalmente requeridas son del orden de 10 µg por 10<sup>6</sup> células, si se suministra como un plásmido bacteriano; o 10<sup>8</sup> partículas por 10<sup>5</sup> células, si se suministra como una partícula de VAA. La determinación de la cantidad óptima es un ejercicio de valoración rutinario que está dentro de la experiencia habitual del técnico experto.

Estos elementos pueden ser introducidos en la célula ya sea simultáneamente o bien secuencialmente en cualquier orden. Cuando la célula es alterada de manera heredable por cualquiera de los elementos, la célula puede ser seleccionada y dejarse proliferar antes de introducir el elemento siguiente.

En un ejemplo preferido, el virus auxiliar es introducido el último en la célula con el fin de rescatar y empaquetar un vector VAAr residente. La célula estará ya generalmente suplementada hasta el grado necesario con los genes de empaquetamiento del VAA. Preferiblemente, el vector VAAr o los genes de empaquetamiento, y más preferiblemente ambos, estarán integrados de manera estable en la célula. Se aprecia fácilmente que son posibles otras combinaciones. Tales combinaciones están incluidas en el ámbito de la invención.

Una vez que se han proporcionado a la célula hospedadora los elementos requeridos, la célula es cultivada bajo condiciones que sean permisivas para la replicación del VAA, con el fin de permitir la replicación y el empaquetamiento del vector VAAr. El tiempo de cultivo es ajustado preferiblemente para que corresponda a los niveles de producción máximos, y es típicamente de 3-6 días. Posteriormente se recogen las partículas de VAAr y se aíslan de las células utilizadas para prepararlas.

Opcionalmente, las preparaciones víricas de VAAr pueden ser además procesadas con el fin de enriquecerlas en partículas de VAAr, eliminar partículas del virus auxiliar o convertirlas de otro modo en adecuadas para su administración a un sujeto. Ver, Atkinson y col. para técnicas ejemplares (WO 99/11764). Las técnicas de

purificación pueden incluir centrifugación en gradiente isopínico y técnicas cromatográficas. La reducción de la actividad infecciosa del virus auxiliar puede incluir inactivación mediante tratamiento con calor o mediante tratamiento con pH según es conocido en la técnica. Otros procesos pueden incluir concentración, filtración, diafiltración o mezclado con un tampón o excipiente farmacéutico adecuado. Las preparaciones pueden ser divididas en alícuotas de dosis unidad y de múltiples dosis para la distribución, las cuales conservarán las características esenciales del lote, tales como la homogeneidad del contenido antigénico y genético y la proporción relativa de virus auxiliar contaminante.

Se conocen en la técnica varios métodos para la determinación del título infeccioso de una preparación vírica. Por ejemplo, un método para la determinación del título es un ensayo de titulación de alto rendimiento como el proporcionado por Atkinson y col. (WO 99/11764). Los títulos víricos determinados por este método rápido y cuantitativo se corresponden estrechamente con los títulos determinados mediante técnicas más clásicas. Además, sin embargo, este método de alto rendimiento permite el procesamiento y el análisis simultáneos de muchas reacciones de replicación vírica y por tanto tiene muchas otras utilidades, incluyendo por ejemplo el cribado de líneas celulares permisivas o no permisivas para la replicación y la infectividad del virus.

### **Usos de los vectores víricos recombinantes de la invención**

Los vectores VAAr de la preparación de la invención son útiles en varios contextos, incluyendo la terapia génica y el cribado de productos genómicos. Por ejemplo, como los vectores VAAr basados en un genoma nativo del VAA requieren funciones de la célula hospedadora y funciones cooperadoras para la formación de una RF, la expresión de secuencias heterólogas insertadas a partir de tales vectores es a menudo ineficaz. Puede requerirse un periodo de tiempo significativo, a menudo del orden de semanas, para obtener niveles útiles de un producto génico de interés. En contraste, los vectores metabólicamente activados de la invención pueden formar eficazmente y rápidamente moldes bicatenarios para la transcripción, proporcionando de este modo la expresión incrementada de transgenes y reduciendo el tiempo requerido para la acumulación de un producto génico de interés a días en lugar de semanas. Como los vectores metabólicamente activados de la invención proporcionan una expresión más rápida y eficaz del transgén, facilitarán también los procedimientos conocidos en la técnica en los cuales es deseable la expresión rápida de un producto génico de interés. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, el cribado de productos genómicos, la identificación de dianas y la validación de dianas.

La invención proporciona una preparación para ser utilizada en un método de introducción de un polinucleótido de interés en una célula hospedadora, a través de una partícula de VAA recombinante que contiene un vector VAA recombinante, que comprende la puesta en contacto de la célula con la partícula vírica recombinante bajo condiciones que permitan la infección, mediante lo cual el vector de VAA recombinante es introducido en la célula. De este modo, una secuencia polinucleotídica exógena es introducida en la célula.

En otras realizaciones, los vectores de VAA recombinantes de la invención son utilizados para la expresión de un polinucleótido, tal como productos genéticos de interés, en una célula hospedadora tal como una célula de mamífero. Estos métodos comprenden el sometimiento de la célula que contiene un vector VAAr recombinante, a condiciones que permitan la expresión, mediante lo cual se expresa una región codificante de la secuencia heteróloga del vector vírico recombinante. Los productos genéticos incluyen, pero no se limitan a, ARNs tales como, por ejemplo, ARNs antisentido y ribozimas, y proteínas tales como, por ejemplo, enzimas, proteínas estructurales y citoquinas. Según se describió anteriormente, una secuencia heteróloga que codifique el producto génico puede estar unida operativamente a una o más secuencias que regulen su expresión tales como, por ejemplo, promotores e intensificadores.

En algunas realizaciones, la introducción de, y/o la expresión a partir de, un vector VAAr de la invención es llevada a cabo por transducción, en la cual una partícula de VAA recombinante conteniendo un vector de VAA recombinante de la invención (tal como una partícula de VAAr conteniendo un VAAr según se describe en el presente documento) es puesta en contacto con una célula hospedadora bajo condiciones que son favorables para la infección vírica y/o la expresión de la secuencia heteróloga, de tal manera que el vector de VAA recombinante es introducido y/o expresado en la célula hospedadora.

Tipos de células en los cuales pueden ser introducidos los polinucleótidos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células eucarióticas, células procarióticas y Archaea. Las células eucarióticas incluyen células animales, células vegetales, células de levadura y, en una realización preferida, células de mamífero, más preferiblemente células humanas; las células incluyen líneas celulares así como células primarias, tales como fibroblastos primarios de prepucio.

La introducción de ácidos nucleicos en las células puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, microinyección, transfección, electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, transferencia génica mediada por lípidos y bombardeo de partículas. En una población de células que ha estado en contacto con el polinucleótido de un vector VAAr, la expresión de la función informadora identifica a la célula en la cual se ha introducido el polinucleótido del vector.

Una población de células en la que muchas, y preferiblemente la mayoría, de las células sean portadoras de un vector integrado (esto es, una biblioteca de células marcadas) puede ser obtenida mediante el empleo de selección negativa contra las células que no expresen el gen informador. Un método ilustrativo, no limitante, de selección negativa implica el cultivo de células que han sido puestas en contacto con el vector en presencia de un fármaco citotóxico para el cual el gen informador proporciona resistencia. En este caso, las células que no expresen el gen informador no crecerán en presencia del fármaco.

Después de la introducción de los polinucleótidos del vector en las células, puede llevarse a cabo la selección de las células en las cuales se ha introducido el polinucleótido del vector de acuerdo con métodos estándar. Como una ilustración, si se utiliza un gen informador, tal como un gen de resistencia a neomicina, las células son cultivadas en un medio que contenga G418, que es un fármaco citotóxico que impide el crecimiento de las células que no expresen resistencia a neomicina. Después de un periodo de contacto apropiado con el medio, se obtienen clones de células resistentes a neomicina que son adecuados para ser expandidos en poblaciones de células más grandes utilizando técnicas estándar de cultivo de tejidos. Alternativamente, si se utiliza como gen informador *lacZ*, las células marcadas pueden ser seleccionadas, por ejemplo, por el color de las colonias (utilizando un sustrato cromogénico de la  $\beta$ -galactosidasa) o mediante clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS), seleccionando las células que expresen la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

En ciertas realizaciones, un vector VAAr de la preparación de la invención, después de su introducción en una célula hospedadora, puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula. En estas circunstancias, se obtiene la persistencia y la expresión a largo plazo del transgén, sin alterar el metabolismo celular normal. De este modo, se proporciona una fuente continua del producto del transgén, y se consigue la administración continuada del producto génico, en la célula hospedadora. Ésta es una ventaja obvia y significativa en comparación con otras modalidades de tratamiento, la mayoría de las cuales confiere únicamente beneficios transitorios.

La administración de una preparación de la invención a un mamífero, con el fin de introducir una secuencia de interés en una célula de mamífero y/o expresar un producto génico de interés en una célula de mamífero, puede ser llevada a cabo de varias formas, y se describe en el presente documento. Los modos de administración preferidos incluyen, pero no se limitan a, administración intramuscular, administración intravenosa e inyección directa de la(s) composición(es) en un tejido o lugar anatómico. La inyección puede ser, por ejemplo, intraarterial, intravenosa, intramuscular o intraarticular. Métodos para la transducción de células de vasos sanguíneos están descritos en, por ejemplo, PCT US 97/103134.

Otro modo preferido de administración de las composiciones de la invención es por las vías nasofaríngea y pulmonar. Éstas incluyen, pero no se limitan a, las vías por inhalación, transbronquial y transalveolar. La invención incluye composiciones adecuadas para la administración mediante inhalación incluyendo, pero sin limitarse a, diferentes tipos de aerosoles y formas en polvo. Dispositivos adecuados para la administración de las composiciones por inhalación incluyen, pero no se limitan a, atomizadores y vaporizadores.

Se administra una cantidad eficaz de un vector de VAA recombinante (preferentemente en forma de partículas de VAA), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Una cantidad eficaz puede ser administrada en una única dosis o en múltiples dosis. Cuando un porcentaje bajo de transducción puede conseguir un efecto terapéutico, el objetivo del tratamiento es generalmente llegar a, o superar, este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede ser conseguido por la transducción solamente de un 1% a un 5% aproximadamente de las células diana, pero es más típicamente del 20% de las células del tipo tisular deseado, normalmente de al menos el 50% aproximadamente, preferiblemente de al menos el 80% aproximadamente, más preferiblemente de al menos el 95% aproximadamente e incluso más preferiblemente de al menos el 99% aproximadamente de las células del tipo tisular deseado.

Como guía, el número de partículas de VAAr administrado por inyección estará generalmente entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{14}$  partículas, preferiblemente entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^{13}$  partículas, más preferiblemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{12}$  partículas e incluso más preferiblemente alrededor de  $1 \times 10^{11}$  partículas.

El número de partículas de VAAr administrado por inyección intramuscular y por administración intravenosa, por ejemplo, será generalmente de al menos  $1 \times 10^{10}$ , y es más típicamente  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$  y en algunas ocasiones  $1 \times 10^{13}$  partículas, incluyendo partículas resistentes a ADNasa y partículas susceptibles a ADNasa. En términos de partículas resistentes a ADNasa, la dosis estará generalmente entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{14}$  partículas, más generalmente entre  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{13}$  partículas aproximadamente.

La eficacia de la administración vírica puede ser monitorizada mediante varios criterios. Por ejemplo, muestras extraídas mediante biopsia o escisión quirúrgica pueden ser analizadas mediante hibridación *in situ*, amplificación por PCR utilizando sondas específicas para el vector y/o protección de ARNasa para detectar ADN vírico y/o ARNm vírico, tal como ADN o ARN del VAAr. Además, por ejemplo, muestras de tejido recogido, de fluido articular y/o suero pueden ser monitorizadas para determinar la presencia de un producto proteico codificado por el vector vírico recombinante con inmunoensayos, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, inmunohistología y/o recuento de células inmunofluorescentes, o con bioensayos basados en una función. Ejemplos

de tales ensayos son conocidos en la técnica.

La invención proporciona también preparaciones para ser utilizadas en métodos en los cuales se emplean estrategias *ex vivo* para la administración de los vectores de VAA recombinantes descritos en el presente documento para suministrar un transgén a un individuo, preferiblemente a un mamífero. Tales métodos y técnicas son conocidos en el oficio. Ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.399.346. De manera general, se extraen células de un individuo, se transducen con vectores de VAA recombinantes *in vitro*, y las células transducidas son posteriormente reintroducidas en el individuo. Células adecuadas para la administración *ex vivo* son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, varios tipos de células madre.

La selección de una composición, de un régimen de dosificación (esto es, una dosis, una pauta y una repetición) y de una vía de administración particulares dependerá de varios factores diferentes incluyendo, pero sin limitarse a, la historia médica del sujeto y las características de la condición y del sujeto que esté siendo tratado. El régimen de dosificación particular puede ser determinado empíricamente.

En una realización de la invención, se proporcionan métodos para identificar un fenotipo asociado con la expresión de una secuencia codificante de un vector de VAA recombinante de la invención, que comprenden el sometimiento de las células hospedadoras que contienen un vector vírico recombinante de la invención a condiciones que permitan la expresión; la comparación del fenotipo de estas células que expresan con el fenotipo de células que carecen del vector vírico recombinante; donde una diferencia fenotípica indica un fenotipo asociado con la expresión de la secuencia codificante. La selección fenotípica se realiza poniendo en contacto una célula hospedadora con un vector de VAA recombinante descrito en el presente documento bajo condiciones que permitan la captación del vector; el análisis de la célula para determinar la expresión de la región codificante heteróloga del vector; la comparación del fenotipo de la célula que expresa la región codificante heteróloga con el fenotipo de una célula que carezca del vector. Una diferencia fenotípica indica que el fenotipo de la célula que expresa la secuencia heteróloga es un fenotipo asociado con la expresión de la región codificante. Tales características fenotípicas pueden a su vez proporcionar una valiosa información concerniente a la(s) función(es) de la secuencia codificante, así como a su función potencial en la salud o a la contribución a estados de enfermedad, y como una diana farmacológica útil.

### 30 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar, pero sin limitación, la invención.

#### 35 Ejemplo 1. Construcción de un vector de VAA de tamaño mitad

Un vector de VAA (AAV-cmv-intrón-EGFP, conocido también como rAAV-GFP(0.5), diseñado para expresar el gen de GFP y para que tenga un tamaño no superior al 50% del tamaño del genoma de un VAA, fue construido según está mostrado en la Figura 5. Un fragmento de NheI a Sall procedente de pEGFP-C1 (Clontech), que contiene EGFP (Figura 5C), fue ligado al fragmento grande de NheI a Sall obtenido del plásmido pCI (Promega, Figura 5B). La construcción plasmídica resultante fue digerida posteriormente con BglII y SmaI, rellenada utilizando nucleósidos trifosfato y ADN polimerasa de T4 (Figura 5D) y ligada a un fragmento de XhoI a SpeI de AAV-syn pA (Figura 5A), que había sido rellenado utilizando ADN polimerasa de T4. La construcción final (Figura 5E) tiene 2265 pares de bases desde el comienzo de la ITR 5' hasta el final de la ITR 3'.

#### 45 Ejemplo 2. Construcción de vectores de VAA de tamaño completo

Se construyeron dos vectores de VAA de tamaño completo diseñados para expresar el gen de GFP y para tener un tamaño equivalente aproximadamente al tamaño del genoma de un VAA, según se muestra en la Figura 6.

El primer vector de tamaño completo (Sal-AAV-cmv-intrón-EGFP, conocido también como rAAV-GFP(Sal)), fue construido ligando un fragmento de HindIII de 2,3 kb de ADN del fago lambda (rellenado utilizando nucleósidos trifosfato y ADN polimerasa de T4, Figura 6B), al vector de tamaño mitad descrito en el Ejemplo 1, que había sido digerido con Sall y rellenado con ADN polimerasa de T4 (Figura 6A). La construcción final de tamaño completo Sal-AAV-cmv-intrón-EGFP (Figura 6C) tiene 4587 nucleótidos de longitud desde el comienzo de la ITR 5' hasta el final de la ITR 3'.

El otro vector de tamaño completo (Cla-AAV-cmv-intrón-EGFP, conocido también como rAAV-GFP(Cla)) fue construido ligando un fragmento de ClaI de 2,3 kb (obtenido a partir de ADN del fago lambda mediante PCR, Figura 6E) al vector descrito en el Ejemplo 1 que había sido digerido con ClaI (Figura 6D). La construcción final de tamaño completo Cla-AAV-cmv-intrón-EGFP (Figura 6F) tiene 4486 nucleótidos de longitud desde el comienzo de la ITR 5' hasta el final de la ITR 3'.

Cada uno de estos vectores de tamaño completo contiene por tanto las mismas secuencias que el vector de tamaño mitad, con la adición de un fragmento de relleno procedente de ADN del fago lambda insertado delante (Sal de tamaño completo) o detrás (Cla de tamaño completo) del sitio de adición de poliA sintético.

**Ejemplo 3. Análisis de la expresión procedente de los plásmidos con el vector de tamaño mitad y de tamaño completo**

Los plásmidos de tamaño mitad y de tamaño completo, descritos en los ejemplos previos, fueron utilizados para transfectar células humanas 239 y HeLa con el fin de determinar el nivel de expresión de la proteína GFP obtenido a partir de cada construcción. Los niveles de expresión procedentes de las construcciones de VAA fueron comparados con el nivel obtenido después de la transfección del plásmido EGFP-C1 (Figura 5C). Cantidades equimolares de cada plásmido fueron introducidas en cada línea celular y, 48 horas después de la transfección, se determinó el nivel de expresión de GFP mediante análisis en un citómetro de flujo. Los resultados están mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Análisis de la expresión procedente de los plásmidos con los vectores**

Tipo celular	construcción	cantidad de ADN (equimolar)	células fluorescentes (%)	% de la construcción parental
293A	EGFP-C1 (parental)	1,0 µg	94	100
293A	AAV-GFP Tamaño 1/2	1,0 µg	92	98
293A	AAV-GFP Cla de tamaño completo	1,0 µg	81	86
293A	AAV-GFP Sal de tamaño completo	1,0 µg	89	95
293A	EGFP-C1 (parental)	0,3 µg	86	100
293A	AAV-GFP Tamaño 1/2	0,3 µg	83	97
293A	AAV-GFP Cla de tamaño completo	0,3 µg	59	69
293A	AAV-GFP Sal de tamaño completo	0,3 µg	82	95
HeLa	EGFP-C1 (parental)	1,0 µg	81	100
HeLa	AAV-GFP Tamaño 1/2	1,0 µg	80	99
HeLa	AAV-GFP Cla de tamaño completo	1,0 µg	68	84
HeLa	AAV-GFP Sal de tamaño completo	1,0 µg	67	83
HeLa	EGFP-C1 (parental)	0,3 µg	77	100
HeLa	AAV-GFP Tamaño 1/2	0,3 µg	74	96
HeLa	AAV-GFP Cla de tamaño completo	0,3 µg	55	71
HeLa	AAV-GFP Sal de tamaño completo	0,3 µg	65	84

Estos resultados indican que, en general, el vector de tamaño mitad y el vector Sal de tamaño completo fueron expresados en un número de células equivalente, sobre una base molar con respecto al gen, al obtenido con el plásmido de referencia EGFP-C1. La expresión de GFP a partir del plásmido Cla de tamaño completo fue, en general, menor. Por tanto, en los ejemplos siguientes, se llevaron a cabo comparaciones entre el vector Sal de tamaño completo y el vector de tamaño mitad.

**Ejemplo 4. Partículas de VAA derivadas de los plásmidos con el vector de tamaño mitad o de tamaño completo**

Se produjeron preparaciones de partículas del vector VAA derivadas de plásmidos con el vector de tamaño mitad o de tamaño completo utilizando la línea celular productora C12. La C12 es una línea celular HeLa que contiene un casete de los genes *rep* y *cap*, en la cual la expresión de Rep y Cap es inducida tras la infección con adenovirus. Cuando las células C12 son simultáneamente infectadas con adenovirus y transfectadas con un plásmido conteniendo el vector, el genoma del vector es amplificado y empaquetado en partículas de VAA.

Cuarenta frascos T225 sembrados con células C12, fueron infectados con adenovirus de tipo 5 (a una multiplicidad de 10 unidades infecciosas por célula) una hora antes de la transfección. Las células fueron transfectadas con ADN

plasmídico mediante el método de DEAE-dextrano y fueron incubadas durante cuatro horas a 37°C en una atmósfera con un 10% de CO<sub>2</sub>. El medio fue aspirado y las células fueron sometidas a un choque mediante la adición de medio que contenía un 10% de DMSO durante 5 minutos a temperatura ambiente. El medio que contenía DMSO fue sustituido posteriormente por medio completo y las células fueron incubadas durante 72 horas a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron posteriormente incorporadas al medio mediante rascado y aglutinadas por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. A continuación medio fue aspirado y el aglutinado celular fue resuspendido en Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,1. Las células fueron lisadas mediante un ciclo rápido de congelación/descongelación seguido por sonicación (4 pulsos de 15 segundos cada uno). Al lisado se añadió BENZONASE<sup>®</sup> a una concentración de 2.500 unidades/ml y el lisado fue incubado a 37°C durante 1 hora. Se añadió CsCl al lisado tratado con Benzonase<sup>®</sup> hasta un índice de refracción final de 1,3710. Los lisados fueron transferidos a un tubo de centrifuga, cubiertos con 0,5 ml de aceite mineral y centrifugados en un rotor con cestillos basculantes (SW41) a 35.000 rpm, 15°C durante 48 horas. La región del gradiente de CsCl que comenzaba a 1 cm del fondo del tubo hasta, pero sin incluir, la banda de adenovirus, fue combinada y dializada frente a Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5% (v/v), NaCl 100 mM, pH 7,4 (TMEG + NaCl) durante 3 horas con un cambio de tampón. El combinado dializado fue purificado mediante cromatografía en columna y las fracciones fueron analizadas para localizar las fracciones de los picos de partículas de virus adenoasociado recombinante (VAAr). Las fracciones de los picos fueron agrupadas y dializadas durante 3 horas con un cambio de tampón frente a solución de sales tamponada de Ringer (RBSS) que contenía un 5% de glicerol (v/v). El combinado de vectores dializado fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm, dividido en alícuotas y almacenado a 70°C.

#### Ejemplo 5. Análisis del título de VAAr y determinación de la infectividad del VAAr

El número de partículas con el vector en las preparaciones del vector fue calculado midiendo el número de partículas resistentes a ADNasa (DRP) utilizando un ensayo de hibridación de ADN mediante transferencia por ranuras. Muestras del vector (40 µl) fueron tratadas con ADNasa, mediante mezclado con 32 µl de tampón de ADNasa 2X (conteniendo Tris 80 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM) y 8 µl de ADNasa (10 U/ml) e incubación a 37°C durante 20 minutos. La reacción fue parada por la adición de 4 µl de EDTA 0,5 M y 116 µl de agua, y la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de reacción fue añadida posteriormente a 1 ml de solución de desnaturalización (conteniendo NaOH 0,4 N, 1 µg/ml de ADN de esperma de salmón, EDTA 10 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente. Porciones (1 µl y 10 µl) del material desnaturalizado fueron transferidas a un filtro de hibridación de un aparato de transferencia por ranuras. Plásmidos estándar fueron cotransferidos a regiones separadas del filtro. La transferencia fue hibridada con una sonda de ADN de GFP marcada con <sup>32</sup>P cebada aleatoriamente. El número de DRP fue calculado por comparación con los estándares y la cantidad de partículas del vector en cada preparación fue expresada como DRP/ml.

La infectividad de las preparaciones del vector fue determinada utilizando un ensayo de replicación en células del clon 37 (C37). Atkinson y col. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**:2821-2823. Las células C37 son una línea de células HeLa que contienen los genes *rep* y *cap* del VAA. Cuando las células C37 son infectadas con adenovirus, la expresión del gen *rep* permite la replicación del vector de VAA coinfectante. Ver la publicación de PCT WO 96/17947.

Para determinar la infectividad del vector, células C37 sembradas en placas de 96 pocillos fueron coinfectadas con adenovirus 5 (a una multiplicidad de 10 unidades infecciosas por célula) junto con diluciones seriadas de 3 veces de un vector rAAV-GFP o del vector tgACAPSN, como estándar. El vector tgACAPSN es un vector VAAr que contiene en el orden siguiente: una ITR del VAA, una secuencia promotora de CMV, un ADNc de fosfatasa alcalina humana, un promotor de SV40, un gen de resistencia a neomicina bacteriano, una secuencia de poliadenilación y una ITR del VAA. Ver, por ejemplo, PCT WO 97/32990; PCT WO 99/20779; y Lynch y col. (1997) *Circ. Res.*, **80**:497-505. A las 72 horas después de la infección, se añadió a cada pocillo solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M, EDTA 1 mM) y las placas se incubaron a 65°C durante 60 minutos. Las muestras desnaturalizadas fueron transferidas bajo vacío a una membrana, seguido por lavado con NaOH 0,4 M, y los ácidos nucleicos fueron unidos de manera cruzada a la membrana mediante irradiación UV. La transferencia fue hibridada con una sonda de ADN de CMV marcada con <sup>32</sup>P cebada aleatoriamente. La infectividad de la preparación del vector, expresada como unidades de replicación (Atkinson y col., *supra*), fue determinada por comparación con el estándar tgACAPSN.

Las determinaciones del número de partículas (DRP) y de la infectividad fueron utilizadas para calcular la proporción de partículas:infectividad para las preparaciones del vector. Para VAAr derivado del plásmido con el vector de tamaño mitad rAAV-GFP(0.5) esta proporción fue de 58 y para el VAAr derivado del vector de tamaño completo rAAV-GFP(Sal) esta proporción fue de 52. Por tanto, ambos vectores generaban partículas con infectividad equivalente. El VAAr que contenía un vector VAAr derivado del plásmido con el vector de tamaño mitad será denominado en estos Ejemplos como vector VAAr de "complejidad mitad" (o "0.5").

#### Ejemplo 6. Expresión en células 293 humanas por VAAr que contiene vectores VAAr

Células 293 humanas fueron infectadas con el VAAr de complejidad mitad (VAAr derivado del plásmido con el vector de tamaño mitad rAAV-GFP(0.5)) o con el VAAr derivado del vector rAAV-GFP(Sal), y se determinó el número de células que expresaban la proteína GFP mediante microscopía de fluorescencia.

Se sembraron células 293A en placas de 48 pocillos ( $7 \times 10^3$  células/pocillo). Al día siguiente, las células en 0,2 ml de medio fueron infectadas a una multiplicidad de 100 ó 1000 DRP por célula. Veinticuatro horas después de la infección, el medio fue sustituido por 0,5 ml de medio fresco. A las 48 horas y a las 72 horas después de la infección se contó el número de células que expresaban la proteína GFP utilizando un microscopio de fluorescencia. Los resultados, presentados en la Tabla 2, muestran que el vector de complejidad mitad tenía una capacidad significativamente más elevada para expresar niveles detectables de GFP, según indicaba el porcentaje de células 293 fluorescentes, en comparación con el vector de tamaño completo.

**Tabla 2. Expresión en células 293 humanas por vectores VAAR**

vector	dosis DRP/célula	tiempo tras la infección (horas)	células fluorescentes (%) (n=2)	diferencia en veces
rVAAGFP(0.5)	100	48	10,2%	>10
rVAAGFP(Sal)	100	48	0,0%	
rVAAGFP(0.5)	1000	48	63,6%	3,6
rVAAGFP(Sal)	1000	48	17,7%	
rVAAGFP(0.5)	100	72	13,1%	10,9
rVAAGFP(Sal)	100	72	1,2%	
rVAAGFP(0.5)	1000	72	72,2%	5,6
rVAAGFP(Sal)	1000	72	12,9%	

#### Ejemplo 7. Expresión en células HeLa por vectores VAAR

Células HeLa fueron infectadas con el vector de complejidad mitad (derivado de rAAV-GFP(0.5)) o con el vector rAAV-GFP(Sal), y se determinó el número de células que expresaban la proteína GFP mediante microscopía de fluorescencia y mediante citometría de flujo.

Células HeLa 5 fueron sembradas en placas de 24 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo). Al día siguiente las células, en 0,5 ml de medio, fueron infectadas a una multiplicidad de 100 ó 1000 DRP por célula. Veinticuatro horas después de la infección, el medio fue sustituido por 1,0 ml de medio fresco. A las 72 horas después de la infección, se determinó el número de células que expresaban la proteína GFP mediante microscopía de fluorescencia y también mediante análisis en un citómetro de flujo. Los resultados, presentados en la Tabla 3, muestran que el vector de complejidad mitad tenía una capacidad significativamente mayor para expresar niveles detectables de GFP, según indicaba el porcentaje de células HeLa fluorescentes, en comparación con el vector de tamaño completo, medidos por ambos métodos. Ambos métodos proporcionaron cálculos similares de la expresión de GFP. Se considera de manera general que las células HeLa expresan transgenes a partir de VAAR sólo ineficazmente. A la MOI más elevada, hubo un incremento significativamente mayor de la expresión en las células HeLa en comparación con las células 293.

**Tabla 3. Expresión en células HeLa por vectores VAAR**

vector	dosis (DRP/ml)	Células fluorescentes (%) por microscopía (n=2)	diferencia en veces	Células fluorescentes (%) por citometría de flujo (n=3)	diferencia en veces
rAAV-GFP (0.5)	100	9,0	9	9,8	9,8
rAAV-GFP (Sal)	100	1,0		1,0	
rAAV-GFP (0.5)	1000	49,4	15	47,9	16
rAAV-GFP (Sal)	1000	3,3		3,0	

#### Ejemplo 8. Análisis de los genomas de ADN de los vectores en partículas de VAAR

Para analizar los genomas de ADN de las partículas con el vector, se extrajo ADN de las partículas con el vector y se analizó mediante electroforesis en gel bajo condiciones desnaturalizantes (gel alcalino) o no desnaturalizantes (gel neutro). En la preparación del análisis electroforético, muestras de los vectores VAAR fueron tratadas con SDS y proteinasa K, incubadas a 50°C durante 4 horas y extraídas sucesivamente con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo. El ácido nucleico fue posteriormente precipitado con etanol, resuspendido y cargado en un gel de agarosa alcalino o neutro.

La electroforesis en gel alcalino se llevó a cabo en un gel de agarosa SeaKem® 1,5% (FCM Products) en NaOH 30 mM y EDTA 2 mM, con un tampón de procesamiento de NaOH 30 mM, EDTA 2 mM. El tampón de carga para el gel alcalino fue NaOH 30 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10% y verde de bromocresol al 0,1% (concentraciones finales). El gel alcalino se dejó correr durante una noche a 20 voltios con recirculación del tampón de procesamiento.



El gel neutro fue agarosa SeaKem® 1,0% (FMC Products) en Tris-borato 0,45 M, EDTA 0,001 M (TBE). El gel neutro se dejó correr durante una noche a 40 voltios.

- 5 El análisis de los geles se llevó a cabo según sigue. Los geles fueron sometidos a condiciones de desnaturalización, neutralizados posteriormente y transferidos durante una noche a una membrana de nailon. La transferencia fue entrecruzada e hibridada con una sonda de GFP marcada con <sup>32</sup>P cebada aleatoriamente utilizando la solución "quick Hyb®" (Stratagene, La Jolla, CA, # de Catálogo 201220). Las transferencias hibridadas fueron expuestas a una película de rayos X y los resultados están mostrados en la Figura 7.
- 10 El análisis en gel alcalino, mostrado en la Figura 7A, indica que las preparaciones de partículas víricas con genomas del vector que fueron producidos a partir de un plásmido de tamaño mitad contienen moléculas de ADN que tienen una longitud monocatenaria que es la misma que la del genoma del VAA nativo (segunda calle empezando por la izquierda). Esto es lo que se esperaría si moléculas de la RF del tipo con "rehibridación intracatenaria" ("snap-back") hubieran sido empaquetadas en estas partículas víricas. De manera similar, cuando los genomas víricos son sometidos a condiciones desnaturalizantes y analizados posteriormente a pH neutro (según se muestra en la Figura 15 7B), una porción significativa de los genomas procedentes de los virus producidos a partir de los vectores de tamaño mitad no se desnaturaliza, migrando en una posición (Figura 7B, Calle 4) similar a la de un fragmento bicatenario de tamaño mitad no desnaturalizado (Figura 7B, Calle 1).
- 20 Por tanto, los vectores VAAr que están presentes en las partículas víricas de VAAr producidos a partir de los plásmidos de tamaño mitad (esto es, de complejidad mitad) tienen una longitud que es del mismo tamaño que el genoma del VAA nativo y poseen una estructura secundaria significativa, presumiblemente en forma de apareamiento de bases intracatenario. De hecho, el análisis presentado en este ejemplo indica que el genoma completo de tales vectores tiene apareamiento de bases.

25

#### **Ejemplo 9. Análisis de los genomas de los vectores en células infectadas**

- Se extrajeron los genomas de los vectores de células HeLa después de la infección con partículas víricas de VAAr que contenían vectores de complejidad mitad (esto es, vectores derivados del vector de tamaño mitad (que tienen como resultado un polinucleótido monocatenario autocomplementario con un 50% aproximadamente de complejidad de la secuencia)) o que contenían el genoma del vector de tamaño completo control y con o sin coinfección con adenovirus. Los genomas de los vectores extraídos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa alcalinos y neutros, según se describió en el Ejemplo 8.

- 35 Células HeLa fueron sembradas en placas de 6 pocillos (2,5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo). Al día siguiente, las células fueron infectadas, en 1 ml de medio completo, con VAAr que contenía vectores VAAr derivados del genoma de un vector de tamaño completo o de tamaño mitad (lo cual tiene como resultado una molécula de tamaño completo con un 50% aproximadamente de complejidad de la secuencia o una complejidad mitad), según está descrito en el Ejemplo 8. A las 6, 24, 48 y 72 horas después de la infección con VAAr solo (a una multiplicidad de 500 partículas resistentes a ADNasa por célula), o a las 6 horas después de la infección con VAAr junto con adenovirus (a una multiplicidad de 5 unidades infecciosas por célula), las células fueron recogidas y se extrajo selectivamente el ADN del vector utilizando el procedimiento de precipitación de Hirt con SDS-alto contenido en sal. Brevemente, las células fueron incorporadas al medio mediante rascado, centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos, resuspendidas en 0,5 ml de tampón de lisis (SDS 0,6%, EDTA 10 mM), ajustadas a NaCl 1 M por la adición de 0,15 ml de NaCl 5 M e incubadas a 4°C durante una noche. El lisado fue posteriormente centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Después de la adición de 20 µl de SDS al 10% y de 2,5 µl de una solución de 10 mg/ml de proteinasa K, el lisado fue incubado a 50°C durante 4 horas y extraído posteriormente con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo. El ADN fue precipitado de la fase acuosa con etanol y el ADN precipitado fue resuspendido en 50 µl de agua. Alícuotas (25 µl) del ADN resuspendido fueron cargadas en geles de agarosa 50 alcalinos y neutros. La electroforesis y el análisis de los geles se llevó a cabo según se describió en el Ejemplo 8.

- Los resultados están mostrados en la Figura 8 (la Figura 8A muestra un gel neutro y la Figura 8B muestra un gel alcalino) e indican que, en las células infectadas, el VAAr de complejidad mitad (esto es, derivado del genoma de un vector de tamaño mitad) existe en una conformación que tiene un alto grado de estructura secundaria (Figuras 8A y 8B, Calles 4-7), debido presumiblemente al apareamiento de bases intracatenario. Además, el vector de complejidad mitad existe en esta forma bicatenaria tan pronto como 6 horas después de la infección (Figuras 8A y 8B, Calle 4), independientemente de la presencia o ausencia de coinfección con adenovirus (Figuras 8A y 8B, Calle 3), mientras que el vector de tamaño completo no (Figura 8A, Calle 11).

60

**Ejemplo 10. Fraccionamiento basado en la densidad de soluciones madre de los vectores en gradientes de CsCl**

5 En las preparaciones de los vectores anteriormente descritas, los vectores VAAr fueron purificados mediante fraccionamiento volumétrico en CsCl seguido por cromatografía en columna. Para analizar las preparaciones de los vectores más altamente purificadas, se produjeron preparaciones adicionales y se fraccionaron por densidad en lugar de por la separación volumétrica descrita en los Ejemplos anteriores.

10 El vector de complejidad mitad y el vector control de tamaño completo fueron preparados según se describió anteriormente a partir de cinco frascos T225 de células C12 infectadas con adenovirus 5 (a una multiplicidad de 10 unidades infecciosas por células) y transfectadas con el plásmido que contenía el vector (37,5 µg por frasco). Se prepararon lisados tratados con Benzonase® según se describió en el Ejemplo 4, *supra*, y se ajustaron a un índice de refracción final de 1,3710 con CsCl. Los lisados fueron transferidos a un tubo de centrifuga, cubiertos con 0,5 ml de aceite mineral y centrifugados en una ultracentrifuga Beckman en un rotor con cestillos basculantes (SW41) a 15 35.000 rpm, 15°C, durante 48 horas. Se recogieron de cada gradiente 21 fracciones de 200 µl cada una. Para cada fracción se determinó el índice de refracción utilizando un refractómetro Abbe y se calculó la densidad a partir del valor del índice de refracción. Las fracciones de los picos fueron localizadas analizando cada fracción para determinar el título de partículas (DRP) y la infectividad (expresada como unidades de replicación, RU), obteniendo posteriormente la relación partícula:infectividad. El análisis de las fracciones de los picos para el vector de 20 complejidad mitad, en comparación con el vector de tamaño completo fraccionado volumétricamente, está mostrado en la Tabla 4.

**Tabla 4. Análisis de las fracciones del gradiente de CsCl**

Muestra	Título (DRP/ml)	Título (RU/ml)	Partícula:infectividad
rVAAGFP(0.5) fracción 11 de CsCl	2,01 x 10 <sup>9</sup>	2,02 x 10 <sup>7</sup>	100
rVAAGFP(0.5) fracción 12 de CsCl	8,32 x 10 <sup>9</sup>	8,43 x 10 <sup>7</sup>	99
rVAAGFP(0.5) fracción 13 de CsCl	8,81 x 10 <sup>9</sup>	9,55 x 10 <sup>7</sup>	92
rVAAGFP(0.5) fracción 14 CsCl	3,41 x 10 <sup>9</sup>	2,08 x 10 <sup>7</sup>	164
rVAAGFP(Sal) combinado de CsCl	8,39 x 10 <sup>9</sup>	2,92 x 10 <sup>7</sup>	287

25 Las fracciones de los picos fueron analizadas posteriormente mediante electroforesis en gel con el fin de determinar la conformación del ADN del vector. Las fracciones que tenían una densidad que variaba de 1,362 g/ml a 1,394 g/ml fueron dializadas individualmente, lisadas y digeridas con SDS y proteinasa K, incubadas a 50°C durante 4 horas, extraídas con fenol, fenol/cloroformo, cloroformo, precipitadas con etanol y cargadas en geles de agarosa alcalinos y neutros, según se describió *supra*. Los geles fueron desnaturalizados, neutralizados y transferidos a una membrana de nailon; los ácidos nucleicos fueron unidos de manera cruzada a la membrana y la membrana fue hibridada con una sonda de GFP marcada con <sup>32</sup>P cebada aleatoriamente. Las transferencias sondadas fueron expuestas a una película y a pantallas de fósforo. Los resultados, mostrados en la Figura 9 (la Figura A muestra un gel neutro y la 30 Figura 9B muestra un gel alcalino), indican que el vector de complejidad mitad existe en las partículas en dos conformaciones: como una cadena sencilla con la longitud de la mitad de genoma (Figura 9B, Calles 3-7) o como una cadena con la longitud completa del genoma que forma una molécula bicatenaria, teniendo cada una de sus 35 cadenas la mitad de la longitud del genoma (Figura 9A, Calles 3-7). Esta última conformación de los genomas de rAAV-GFP(0.5) está preferencialmente enriquecida en las partículas que tienen una densidad similar a la densidad de las partículas que contienen el vector rAAV-GFP(Sal) de longitud completa (comparar la Figura 9A, Calles 3-5, con la Figura 9A, Calles 11 y 12).

40

**Ejemplo 11. Expresión en células HeLa por vectores VAAr fraccionados por densidad**

Se examinó la transducción de células HeLa humanas por vectores de complejidad mitad o de tamaño completo que habían sido preparados mediante fraccionamiento por densidad en gradientes de CsCl, según se describió en el 45 Ejemplo 10. Con fines de comparación, se utilizaron vectores de complejidad mitad que habían sido purificados mediante el método de CsCl volumétrico y de cromatografía en columna descrito en el Ejemplo 4. Los controles negativos fueron células HeLa no transducidas, y células transducidas de manera estable con un plásmido de expresión de GFP fueron utilizadas como controles positivos. La transducción fue analizada midiendo la expresión de GFP mediante citometría de flujo 72 horas después de la infección. Los resultados están presentados en la Tabla 5, en la que "% de transducción" se refiere al porcentaje de células que expresan GFP. Estos resultados muestran 50 que el vector de complejidad mitad transduce al menos 20 veces más eficazmente que un vector de tamaño completo. Además, se observaron niveles de expresión mayores con vectores de complejidad mitad procedentes de las fracciones más densas, consistente con el enriquecimiento a estas densidades en partículas que contenían genomas que podían formar rápidamente moléculas bicatenarias.

**Tabla 5. Expresión de células HeLa por vectores VAAr fraccionados por densidad**

Vector	dosis (DRP/célula)	% de transducción (n=3)
control negativo	N/A	0,04
control positivo	N/A	95,1
de complejidad mitad purificado en columna	100	16,9 (+/- 1,4)
	1000	58,7 (+/- 4,3)
de complejidad mitad fracción 11	100	12,3 (+/- 2,0)
	1000	60,3 (+/- 2,9)
de complejidad mitad fracción 12	100	12,0 (+/- 1,9)
	1000	63,5 (+/- 1,9)
de complejidad mitad fracción 13	100	8,1 (+/- 0,4)
	1000	46,6 (+/- 1,8)
de complejidad mitad fracción 14	100	10,8 (+/- 1,4)
	1000	53,5 (+/- 0,5)
de tamaño completo combinación	100	0,4 (+/- 0,1)
	1000	2,9 (+/- 0,3)

Los resultados de este ejemplo indican que se obtienen niveles de expresión más elevados de un transgén después de la infección de células humanas con virus que contienen un vector activado metabólicamente. Tomados en conjunto, la evidencia de los ejemplos precedentes demuestra que la expresión en células humanas es mucho más eficaz con un vector que forme pares de bases intracatenarios (en este ejemplo, el vector de complejidad mitad) que con un vector que no asuma esta estructura.

#### 10 **Ejemplo 12. Producción de un vector de complejidad mitad a partir de líneas celulares productoras estables**

Un método preferido para producir vectores VAAr es generar células según Clark y col. (1995) *Hum. Gene Therapy*, 6:1329-1341; y las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 5.658.785; 5.858.775. Las líneas celulares C12 anteriormente mencionadas contienen un casete de los genes *rep* y *cap* integrado y un vector integrado de manera estable. Cuando tales células son infectadas con adenovirus, el genoma del vector es escindido, replicado y empaquetado en cápsidas de VAA, que pueden ser purificadas a partir de lisados de las células infectadas.

Se generó una línea celular productora transduciendo células C12 (células HeLa que contienen un casete de los genes *rep-cap*, ver también el Ejemplo 4) con ADN plasmídico de AAV-GFP(0.5) y se seleccionó un clon (KAO). Este clon KAO-GFP fue expandido en cultivos voluminosos y utilizado para generar rAAV-GFP(0.5) por infección con adenovirus de tipo 5. En ocho preparaciones diferentes, el rendimiento medio fue superior a 10.000 partículas de rAAV-GFP(0.5) por célula KAO-GFP. Por tanto, la producción de los vectores de la invención puede llevarse a cabo rutinariamente a escala comercial utilizando un método preferido que emplea líneas celulares productoras estables.

#### 25 **Ejemplo 13. Expresión *in vivo* de un transgén utilizando un vector activado metabólicamente**

En este ejemplo, un polinucleótido del vector VAAr que codifica una proteína de fusión del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la región constante de una molécula de inmunoglobulina (Fc) denominada sTNFR(p75):Fc (ENBREL, Immunex) es producido de acuerdo con los Ejemplos anteriores. La secuencia de aminoácidos de sTNFR(p75):Fc está mostrada en la Figura 10; ver la Patente de EE.UU. 5.605.690.

Se lleva a cabo un estudio utilizando transferencia génica del vector VAAr en el modelo de artritis en rata inducida por la pared celular de estreptococos. El modelo en rata utilizado en estos estudios es un modelo aceptado en la técnica y aceptado por la FDA para estudiar la artritis y se utiliza para evaluar terapias anti-citoquinas.

En este modelo de artritis, la enfermedad es iniciada por una única inyección intraperitoneal (i.p.) de un péptidoglicano-polisacárido (PG-APS) de SCW del grupo A (30 µg peso corporal) en ratas Lewis hembra de 4 semanas de edad (100 g) susceptibles genéticamente. Cromartie y col. (1977) *J. Exp. Med.*, 146:1585-1602. Típicamente, este modelo presenta una poliartritis bifásica, periférica y simétrica, con ciclos de recurrencia exacerbada y remisión, y es clínicamente e histológicamente similar a la artritis reumatoide. Se desarrolla en 24-48 horas una inflamación aguda de los tobillos, muñecas y pequeñas articulaciones de los pies, que persiste durante 4-5 días y posteriormente se resuelve parcialmente. Esta respuesta inflamatoria aguda, en la que predominan los neutrófilos, es seguida posteriormente por una inflamación crónica que se reactiva espontáneamente en el día 15 aproximadamente, que progresa hacia una sinovitis erosionante crónica, progresiva. Además de la poliartritis, este modelo de PG-APS induce una inflamación granulomatosa crónica en el hígado y en el bazo. La gravedad de la artritis (índice articular, AI) es determinada valorando cada articulación del tobillo y la muñeca sobre la base del grado de inflamación, eritema y distorsión en una escala de 0-4 y sumando las puntuaciones de los cuatro miembros. En paralelo, puede medirse la inflamación de las patas posteriores mediante pletismometría por

desplazamiento de agua.

Ratas Lewis hembra de un mes de edad son inyectadas i.p. con SCW, según se describió anteriormente. Las ratas son monitorizadas diariamente para determinar la aparición y la progresión de la enfermedad registrando los valores del AI. A medida que las ratas progresan hacia la fase crónica de la enfermedad (día 14 a 15), son divididas en grupos y administradas con diferentes dosis ( $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^{12}$  DRPs) en la articulación de los tobillos posteriores.

Las ratas son inspeccionadas diariamente para determinar la aparición y la progresión de la enfermedad, y se registra la gravedad de la artritis (AI) cada 2 ó 3 días según se describió anteriormente. Se compara la incidencia y la gravedad de la enfermedad entre los grupos tratados con AAVrTNFR-Fc, con el vector control VAA y con el vehículo. La inflamación de las patas posteriores se mide con un pletismómetro y se registra el número de patas implicadas (recuento de las articulaciones) en cada grupo y se compara entre los grupos. La significación de las diferencias entre los grupos en el curso de la artritis, basada en las medidas del diámetro de las articulaciones, es analizada utilizando un programa estadístico de análisis de varianza (ANOVA). La significación estadística de la valoración correspondiente a la observación macroscópica es determinada utilizando el test *t* de Student no pareado.

Las ratas son sacrificadas 60 días aproximadamente después de la administración de los vectores o del vehículo. Los animales de cada uno de los grupos tratados con el vector AAVrTNFR-Fc que muestran una reducción significativa de los síntomas de la artritis (>20% de reducción del AI y de la inflamación de las patas traseras) en comparación con los grupos tratados con el vector control VAA o con el vehículo, son mantenidos vivos y monitorizados para determinar la duración de la eficacia terapéutica durante un tiempo de hasta 12 meses aproximadamente.

El efecto de los tratamientos con los vectores y el vehículo sobre la morfología de las articulaciones tal como la resorción del cartilago y ósea es determinado mediante radiografía con rayos X y *post-mortem* mediante el examen histopatológico de criosecciones de las articulaciones teñidas con hematoxilina y eosina (H/E). En estas secciones se hace una valoración de la hiperplasia de la membrana sinovial, de la formación de pannus, de la destrucción de cartilago articular y de la producción de tejido fibroso masivo. Las secciones de las articulaciones son examinadas también para determinar la existencia de infiltración de leucocitos en el espacio sinovial.

La presencia de respuestas inmunes mediadas por células contra las células transducidas con AAVrTNFR-Fc es evaluada aislando células de los nódulos linfáticos de drenaje de la región y del bazo de un subgrupo de animales, a partir de las cuales se preparan suspensiones de células individuales. Se llevan a cabo ensayos de proliferación de células T utilizando la proteína de fusión rTNFR-Fc como fuente de antígeno. La citotoxicidad mediada por células es analizada utilizando ensayos de liberación de cromo con una línea celular isogénica de ratas Lewis que expresa rTNFR-Fc transfectada de manera estable (compatible con RT-1) como diana.

El hígado y el bazo son examinados para determinar la existencia de inflamación granulomatosa crónica y se comparará entre los grupos la incidencia y la gravedad de la enfermedad. Además, otros órganos vitales incluyendo pulmones, corazón, tracto GI y riñón, son inspeccionados para detectar signos de patología, seguido por análisis histopatológicos de secciones de tejido incluidas en parafina y teñidas con H/E.

Para examinar la distribución tisular de los vectores, se prepara ADN de todos los órganos vitales, de los ovarios y de las articulaciones, y se examina la presencia de ADN del vector mediante análisis de transferencia Southern utilizando sondas específicas del vector y mediante PCR utilizando cebadores específicos del vector.

Se recogen muestras de suero de todos los animales, antes, inmediatamente después y a intervalos semanales después de la administración de los vectores y del vehículo y se analizan para determinar:

- (i) La presencia y los niveles de TNFR-Fc. Un ensayo sobre inmunoabsorbente con enzima unido (ELISA) mide los niveles séricos totales de rTNFR-Fc, y un bioensayo estándar de TNF- $\alpha$  mide la bioactividad de rTNFR-Fc.
- (ii) La presencia y los niveles de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra las proteínas de la cápsida del VAA mediante un ELISA para medir los niveles totales de anticuerpos anti-cápsida, y mediante un ensayo de inhibición de la infectividad del VAA mediada por anticuerpos anti-cápsida del VAA para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-cápsida.
- (iii) La presencia y los niveles de anticuerpos neutralizantes y/o no neutralizantes dirigidos contra la proteína rTNFR-Fc mediante un ELISA para medir los niveles totales de anticuerpos anti-rTNFR-Fc, y mediante un bioensayo estándar de TNF- $\alpha$  para analizar la inhibición de la bioactividad de rTNFR-Fc. En este ensayo, las muestras de suero son analizadas para determinar la inhibición de la actividad de la proteína rTNFR-Fc (para bloquear la destrucción celular por TNF- $\alpha$ ).

Los inventores describen un método para preparar un VAAr de acuerdo con la invención, donde el método comprende incubar una célula hospedadora en condiciones que permitan la replicación y encapsidación de VAA, donde dicha célula hospedadora comprende:

- (a) un vector VAAr que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga y una o más secuencias de

repeticiones terminales invertidas (ITR) de VAA que flanquean dicha secuencia heteróloga, donde el vector es menor de aproximadamente 2,5 kb, y

(b) función *rep* de VAA, función *cap* de VAA y función de virus auxiliar para VAA.

- 5 Las funciones *rep* y *cap* pueden proporcionarse por un casete *rep-cap* que está integrado de forma estable en el genoma de la célula hospedadora. Como alternativa, las funciones *rep* y *cap* pueden proporcionarse por un plásmido. Las funciones auxiliares pueden proporcionarse por infección de adenovirus.

La invención también proporciona un método para construir una biblioteca que comprende:

- 10 (a) poner en contacto una población de células hospedadoras con vectores de VAA recombinantes de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la introducción de dichos vectores en las células; y (b) seleccionar células que contienen un vector viral recombinante.
- 15 También se proporciona un método para construir una biblioteca que comprende: (a) poner en contacto una población de células hospedadoras con una partícula de VAAr de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la infección; y (b) seleccionar células que contienen el vector de VAAr.

## REIVINDICACIONES

1. Una preparación vírica de virus adenoasociado recombinante (VAAr), preparación vírica de VAAr que está esencialmente libre de virus auxiliar, que comprende un vector de VAAr, donde el vector de VAAr comprende una  
5 secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una región codificante que forma pares de bases intracatenarios, donde la formación de pares de bases intracatenarios es suficiente para permitir la transcripción sin previa replicación de ADN de la cadena, donde la expresión de la región codificante de la secuencia heteróloga está incrementada con relación a un vector de VAAr que carece de formación de pares de bases intracatenarios suficiente para incrementar dicha expresión, y donde el vector VAAr comprende una o más secuencias de repetición  
10 terminal invertida (ITR) que flanquean dicha secuencia heteróloga, para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia.
2. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el vector de VAAr comprende además una ITR flanqueada en ambos lados por secuencias heterólogas.  
15
3. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la secuencia heteróloga codifica una proteína o un ARN de interés terapéutico.
4. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la secuencia heteróloga codifica un ARN antisentido o una ribozima.  
20
5. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la secuencia heteróloga es:
- (i) un polinucleótido que codifica una proteína útil en terapia génica para aliviar deficiencias causadas por niveles ausentes, defectuosos o subóptimos de una proteína estructural o de un enzima;  
25 (ii) un polinucleótido que se transcribe para dar lugar a una molécula antisentido;  
(iii) un polinucleótido que se transcribe para dar lugar a un señuelo que se une a un factor de transcripción o de traducción;  
(iv) un polinucleótido que codifica un modulador celular;  
30 (v) un polinucleótido que puede hacer que una célula receptora sea susceptible a un fármaco específico;  
(vi) un polinucleótido para terapia del cáncer; o  
(vii) un polinucleótido que codifica un antígeno o un anticuerpo.
6. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la secuencia heteróloga es el gen de la timidina quinasa del virus herpes, un gen supresor de tumores E1A o un gen supresor de tumores p53.  
35
7. Una preparación vírica de VAAr para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 8. Un método para construir una biblioteca que comprende:
- (a) poner en contacto una población de células hospedadoras con vectores de VAAr como se define en la reivindicación 1 en condiciones que permitan la introducción de dichos vectores de VAAr en las células; y  
45 (b) seleccionar células que contienen un vector de VAAr.
9. Un método para identificar un fenotipo asociado con la expresión de una región codificante de un vector de VAAr como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
- (a) poner en contacto una célula hospedadora con un vector de VAAr como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en condiciones que permitan la captación del vector;  
50 (b) ensayar la célula con respecto a la expresión de la región codificante de la secuencia heteróloga; y  
(c) comparar un fenotipo de la célula que expresa la región codificante de la secuencia heteróloga con un fenotipo de una célula que carece del vector,  
55 donde una diferencia fenotípica indica que el fenotipo de la célula que expresa la secuencia heteróloga es un fenotipo asociado con la expresión de la región codificante.

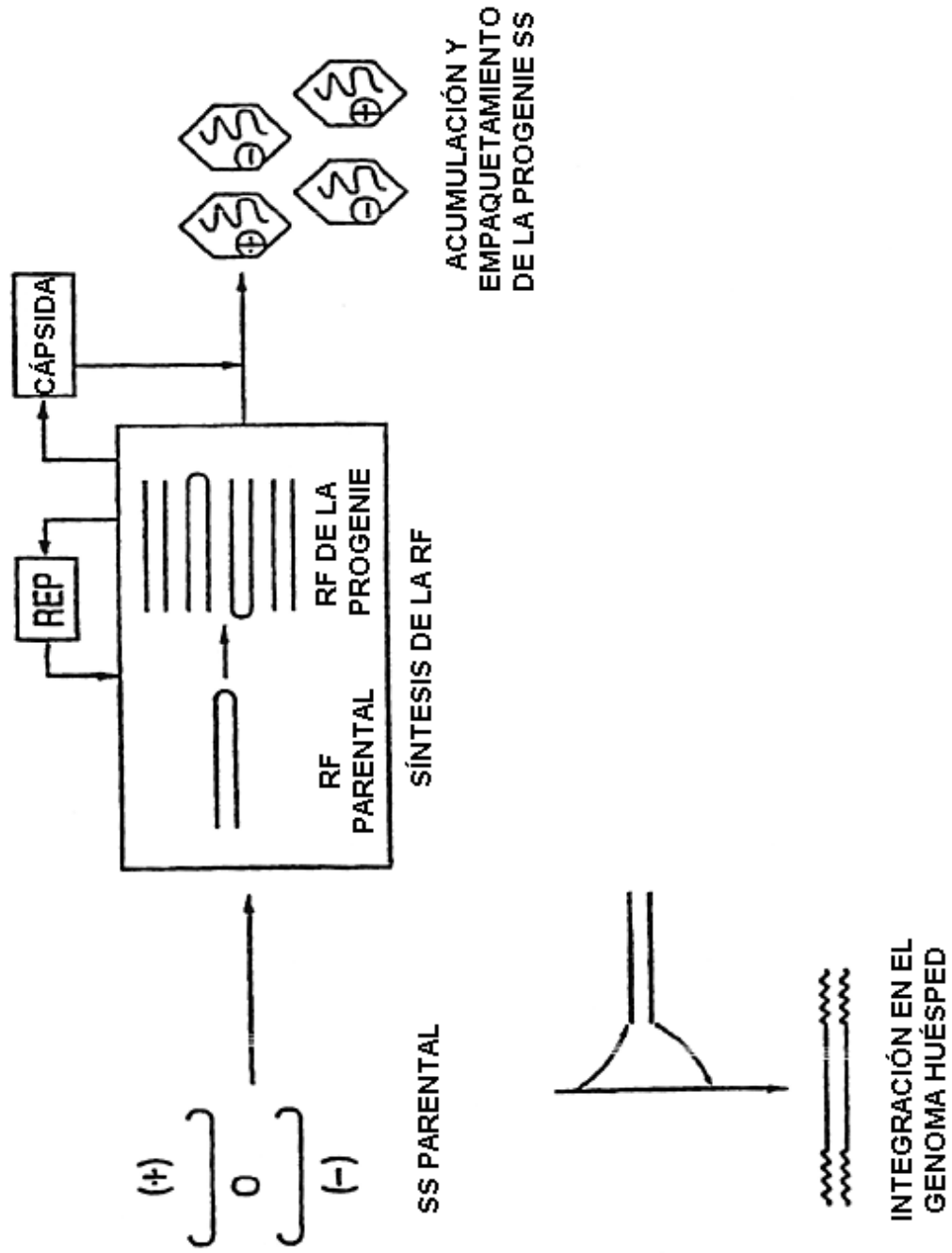
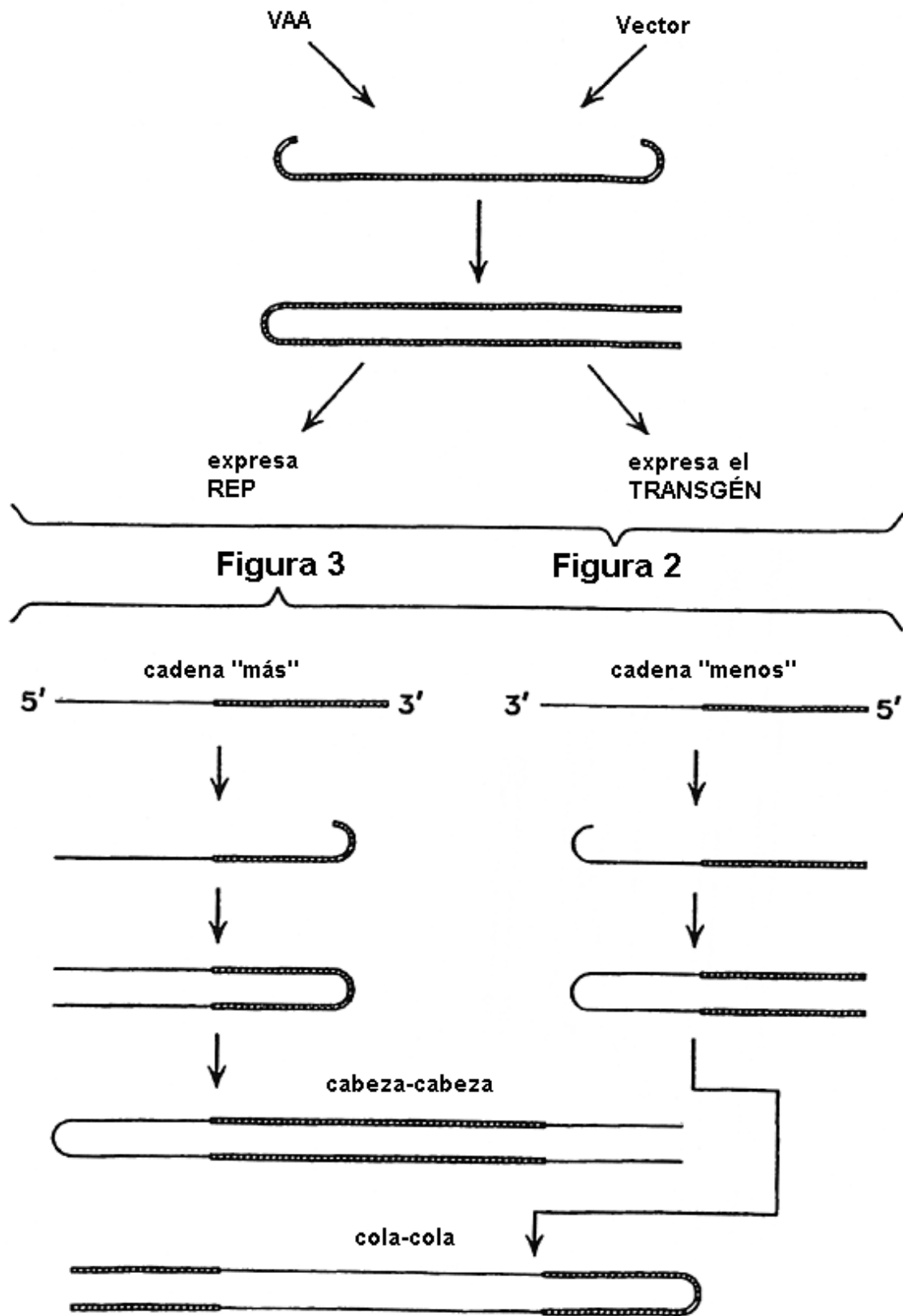


Figura 1





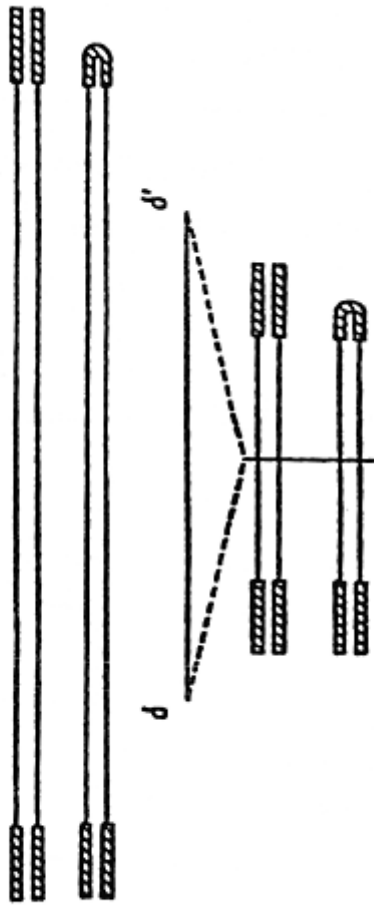


Figura 4

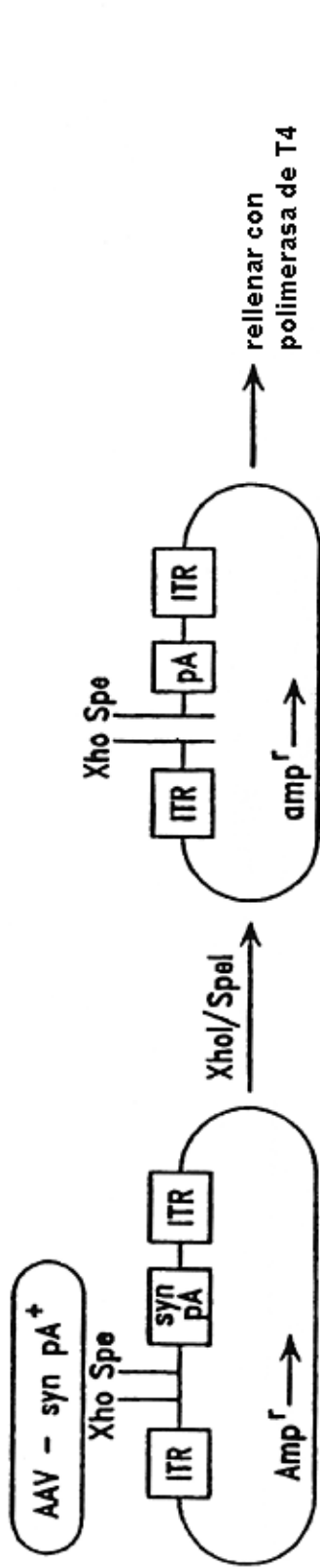


Figura 5A

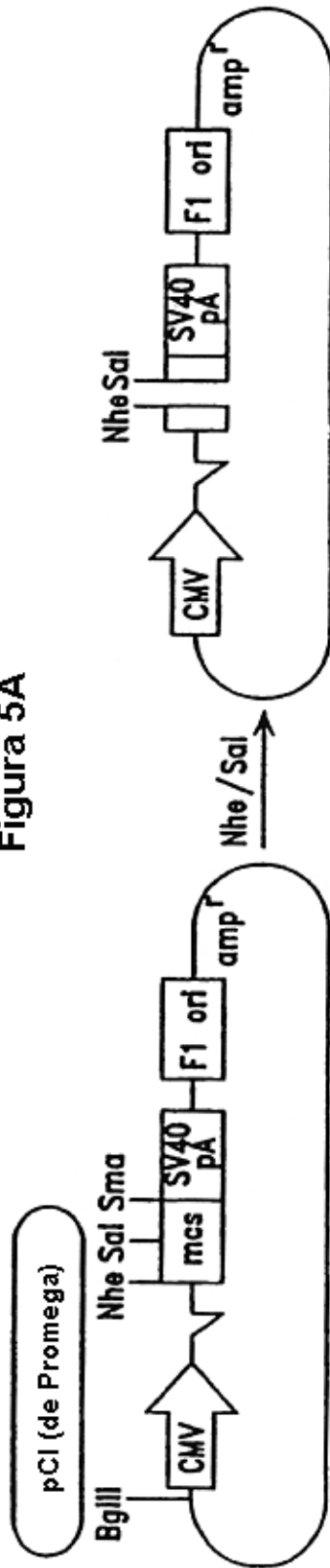


Figura 5B

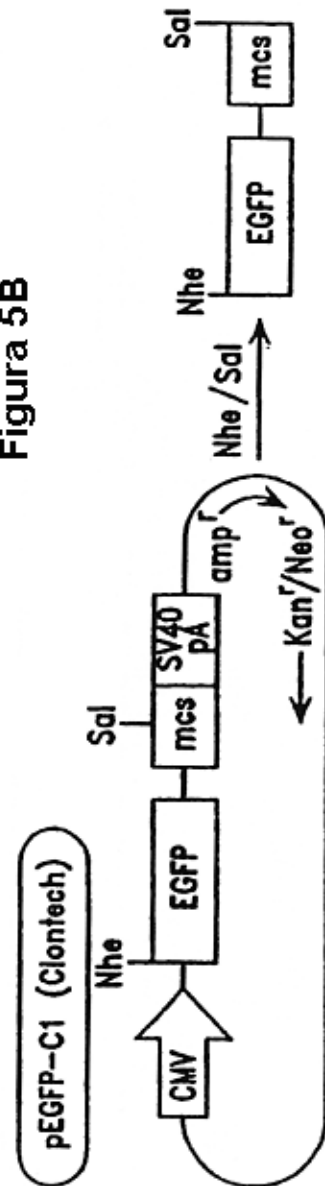


Figura 5C

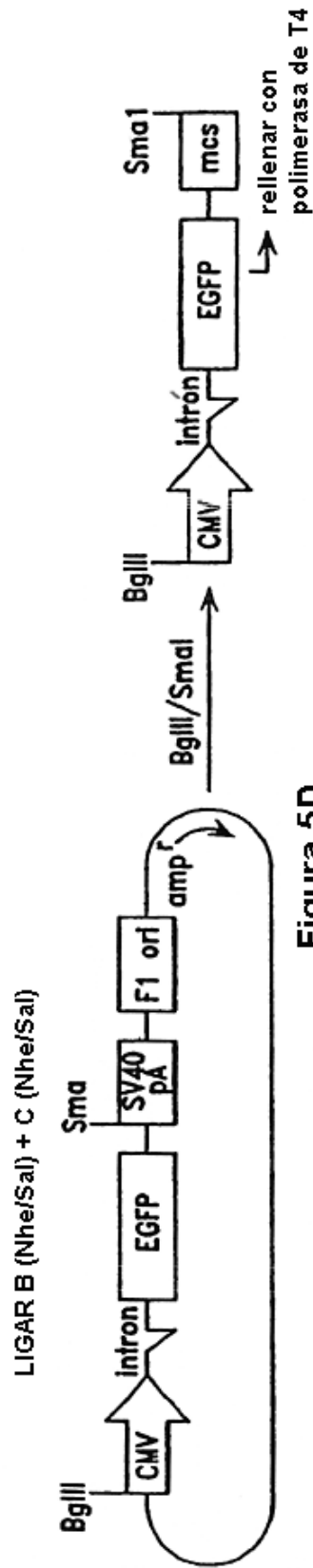


Figura 5D

AAV CMV Intron EGFP - tamaño 1/2

LIGAR A (romo con Xho/Spe) + D (romo con BglIII/SmaI) =

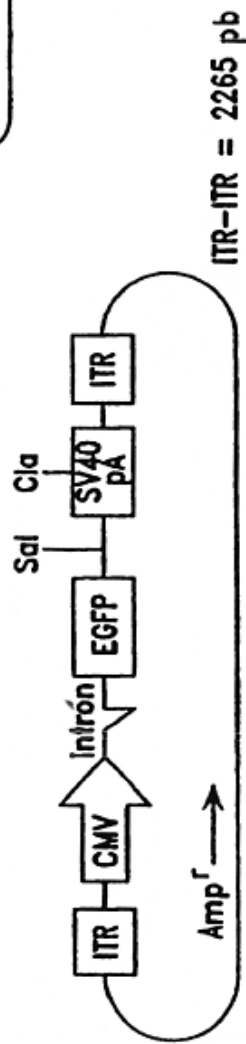


Figura 5E

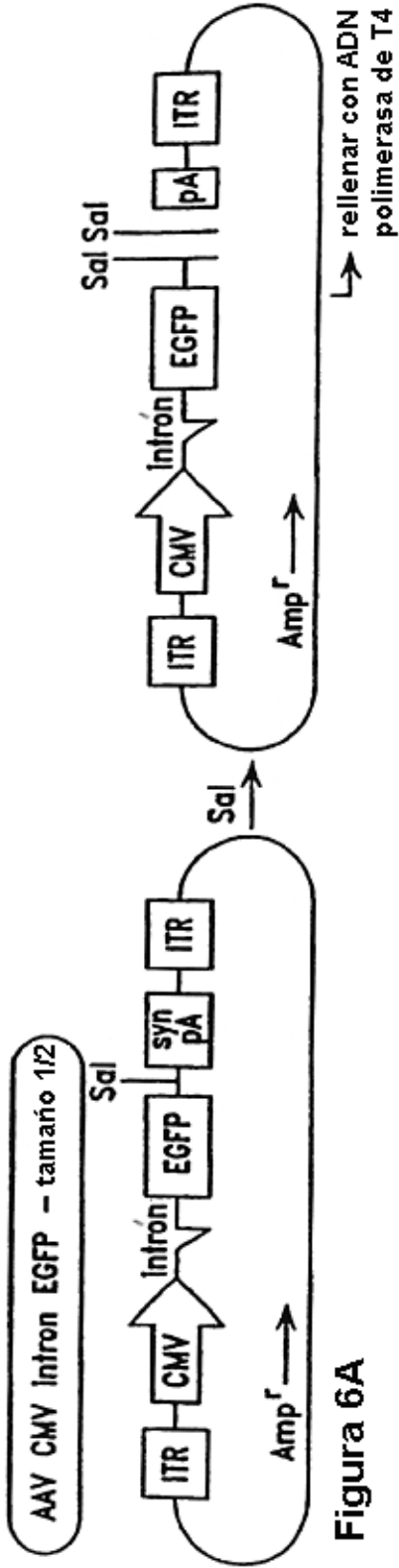


Figura 6A

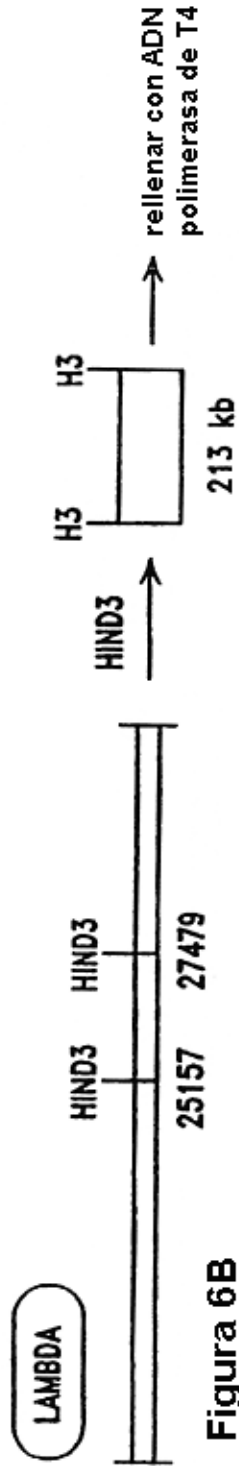


Figura 6B

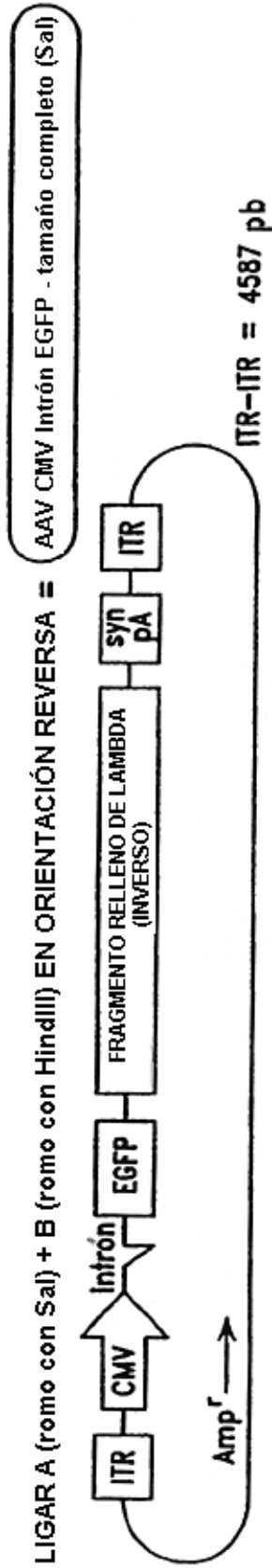


Figura 6C

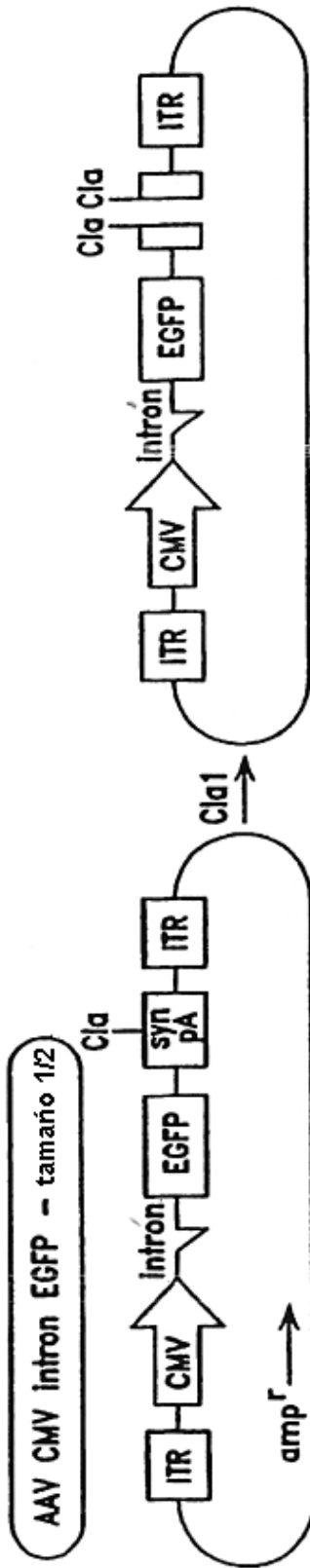


Figura 6D

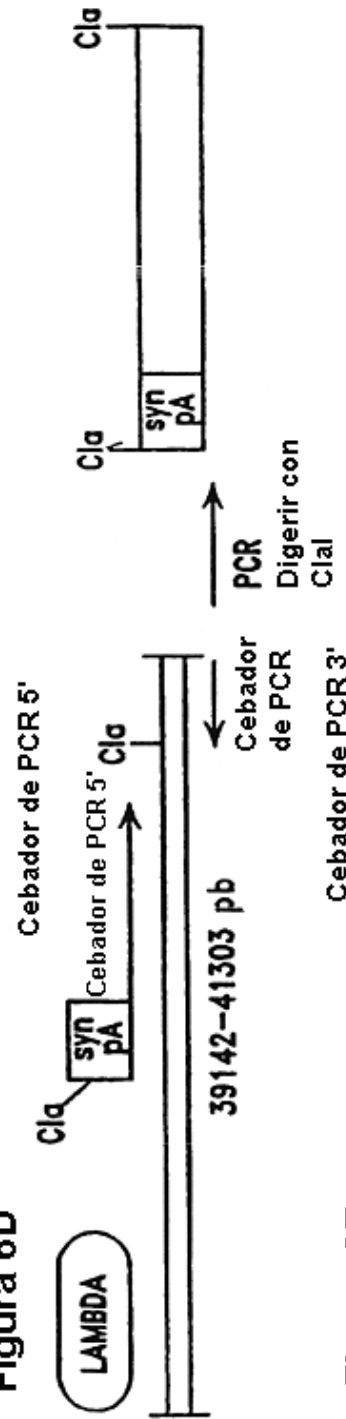


Figura 6E

LIGAR D (Cla) + E (Cla) = AAV CMV Intron EGFP - Tamaño completo (Cla)

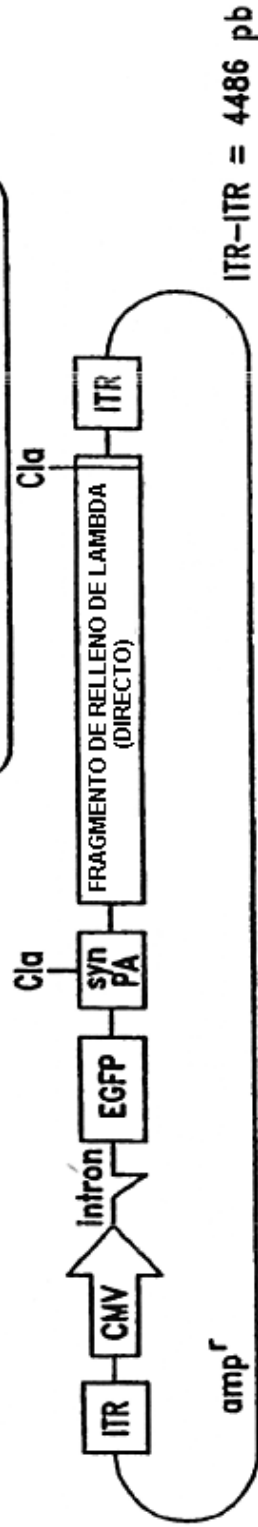


Figura 6F



Figura 7A

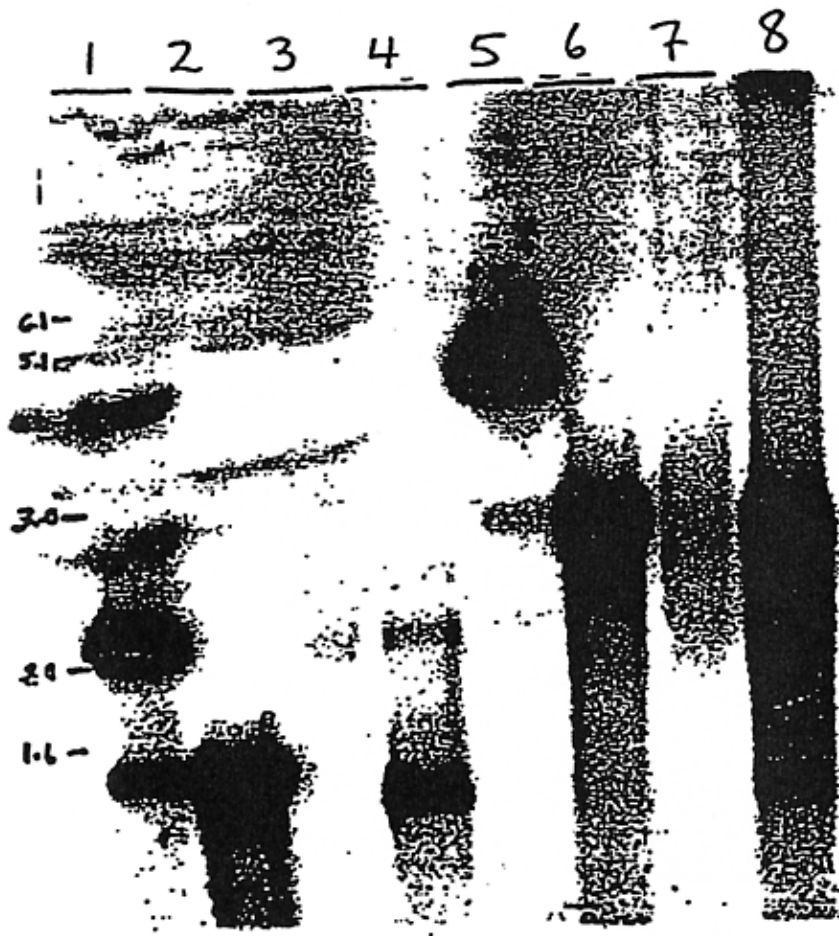


Figura 7B

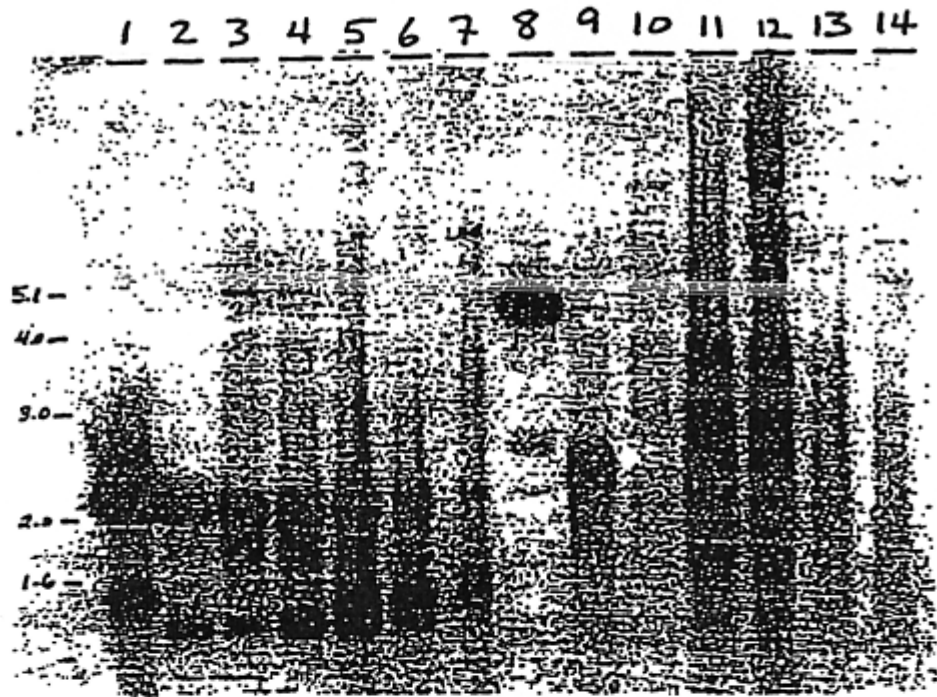


Figura 8A

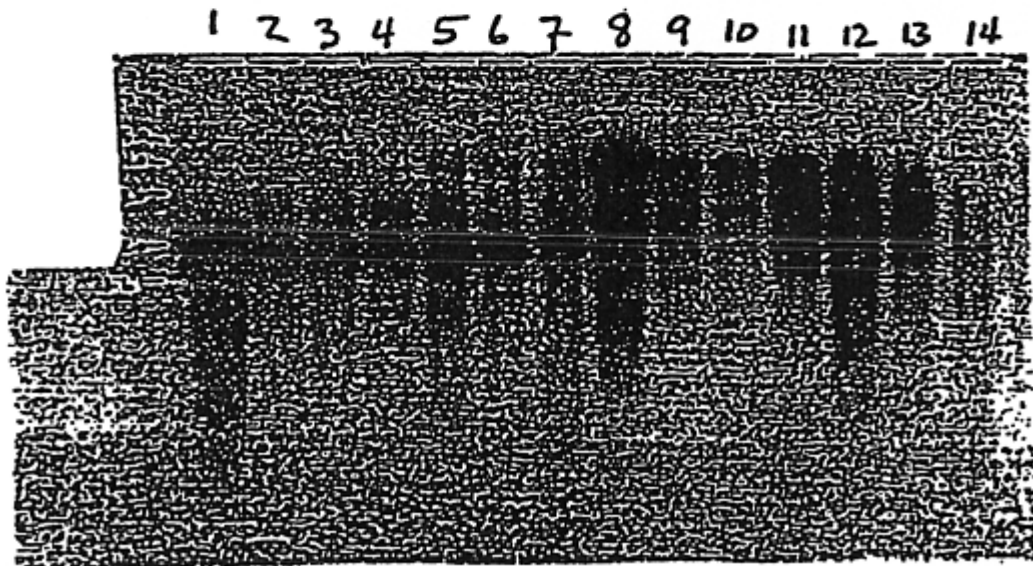


Figura 8B

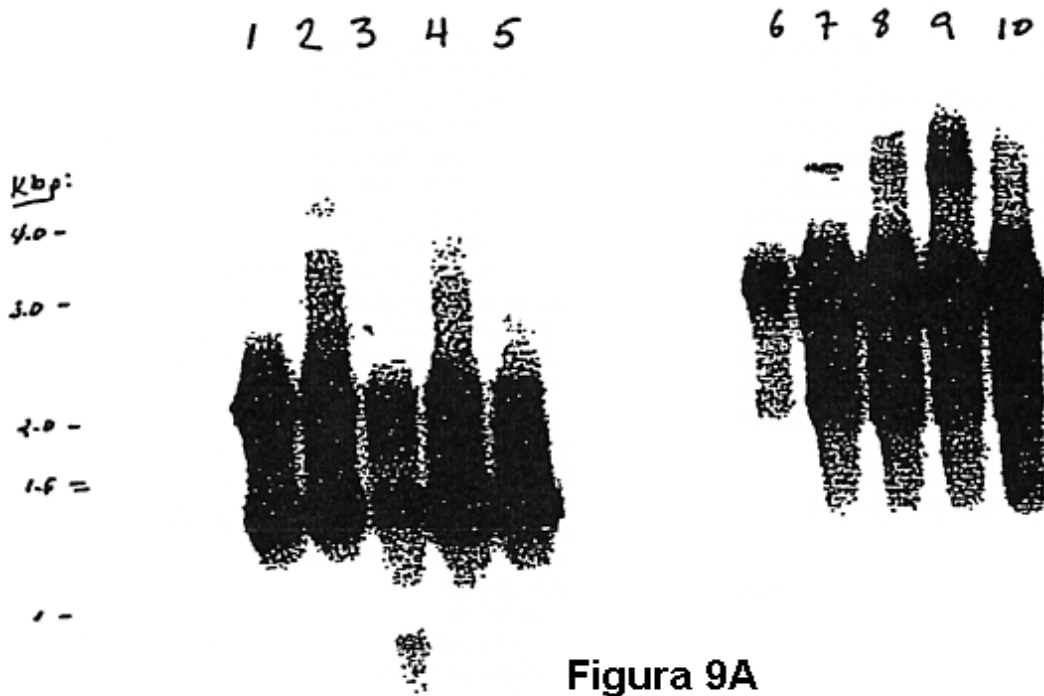


Figura 9A



Figura 9B



AlaArgGlnAlaAlaTrpArgGluGlyAlaGlyLeuArgGlyArgGlu  
 GlyAlaArgAlaGlyGlyAsnArgThrProProAlaSerMetAlaPro  
 ValAlaValTrpAlaAlaLeuAlaValGlyLeuGluLeuTrpAlaAla  
 AlaHisAlaLeuProAlaGlnValAlaPheThrProTyrAlaProGlu  
 ProGlySerThrCysArgLeuArgGluTyrTyrAspGlnThrAlaGln  
 MetCysCysSerLysCysSerProGlyGlnHisAlaLysValPheCys  
 ThrLysThrSerAspThrValCysAspSerCysGluAspSerThrTyr  
 ThrGlnLeuTrpAsnTrpValProGluCysLeuSerCysGlySerArg  
 CysSerSerAspGlnValGluThrGlnAlaCysThrArgGluGlnAsn  
 ArgIleCysThrCysArgProGlyTrpTyrCysAlaLeuSerLysGln  
 GluGlyCysArgLeuCysAlaProLeuArgLysCysArgProGlyPhe  
 GlyValAlaArgProGlyThrGluThrSerAspValValCysLysPro  
 CysAlaProGlyThrPheSerAsnThrThrSerSerThrAspIleCys  
 ArgProHisGlnIleCysAsnValValAlaIleProGlyAsnAlaSer  
 MetAspAlaValCysThrSerThrSerProThrArgSerMetAlaPro  
 GlyAlaValHisLeuProGlnProValSerThrArgSerGlnHisThr  
 GlnProThrProGluProSerThrAlaProSerThrSerPheLeuLeu  
 ProMetGlyProSerProProAlaGluGlySerThrGlyAspGluPro  
 LysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProAlaProGlu  
 LeuLeuGlyGlyProSerValPheLeuPheProProLysProLysAsp  
 ThrLeuMetIleSerArgThrProGluValThrCysValValValAsp  
 ValSerHisGluAspProGluValLysPheAsnTrpTyrValAspGly  
 ValGluValHisAsnAlaLysThrLysProArgGluGluGlnTyrAsn  
 SerThrTyrArgValValSerValLeuThrValLeuHisGlnAspTrp  
 LeuAsnGlyLysAspTyrLysCysLysValSerAsnLysAlaLeuPro  
 AlaProMetGlnLysThrIleSerLysAlaLysGlyGlnProArgGlu  
 ProGlnValTyrThrLeuProProSerArgAspGluLeuThrLysAsn  
 GlnValSerLeuThrCysLeuValLysGlyPheTyrProArgHisIle  
 AlaValGluTrpGluSerAsnGlyGlnProGluAsnAsnTyrLysThr  
 ThrProProValLeuAspSerAspGlySerPhePheLeuTyrSerLys  
 LeuThrValAspLysSerArgTrpGlnGlnGlyAsnValPheSerCys  
 SerValMetHisGluAlaLeuHisAsnHisTyrThrGlnLysSerLeu  
 SerLeuSerProGlyLys

Figura 10