

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 700**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2001 E 05076932 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 1626091**

54 Título: **Vectores de parvovirus duplicados**

30 Prioridad:

01.06.2000 US 208604 P

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

10.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (100.0%)
308 BYNUM HALL, CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**SAMULSKI, RICHARD JUDE y
MCCARTY, DOUGLAS M.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 505 700 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

Vectores de parvovirus duplicados

5 Información relacionada con la solicitud

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/208,604, presentada el 1 de junio de 2000.

10 Declaración de Soporte Federal

La presente invención se realizó, en parte, con el apoyo de los números de subvenciones HL51818, HL 48347, y DK 54419 del Instituto Nacional de Salud. El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

15 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con reactivos para el suministro de genes. Más particularmente, la presente invención se relaciona con vectores para el suministro mejorado de genes basados en parvovirus.

20 Antecedentes de la invención

25 El virus adeno-asociado (AAV) es un miembro no patogénico, helper dependiente de la familia de los parvovirus. Una de las características que identifican este grupo es la encapsidación de un genoma de ADN monocatenario (ADNmc). En el caso de AAV, las cadenas separadas de polaridad positiva o negativa se empaquetan con igual frecuencia, y, una es infecciosa. En cada extremo del genoma de ADNmc, una estructura palindrómica de repetición terminal (TR) aparea las bases sobre sí misma en una configuración de horquilla. Esto sirve como cebador para la ADN polimerasa celular que sintetiza la cadena complementaria después del desnudamiento en la célula huésped. El virus adeno-asociado generalmente requiere un virus helper para una infección productiva. Aunque el adenovirus (Ad) generalmente sirve para este propósito, el tratamiento con irradiación de UV o hidroximetiluracil (HMU) a células infectadas con AAV permitirá además una replicación limitada.

30 Los vectores de suministro de genes recombinantes AAV (rAAV) empaquetan también ADNmc de polaridad positiva o negativa, y pueden depender de factores de la replicación celular para la síntesis de la cadena complementaria. Aunque se esperó inicialmente que esta etapa pudiera llevarse a cabo espontáneamente, mediante replicación del ADN celular o vías de reparación, este no parece ser el caso. Los primeros trabajos con vectores rAAV revelaron que la capacidad para anotar la expresión del gen marcador se mejoró dramáticamente cuando las células se coinfectaron con adenovirus, o se trataron transitoriamente con agentes genotóxicos. Esta mejoría se correlacionó con la formación del ADN bicatenario a partir del virión de ADN monocatenario (vADN). Similar inducción de vectores de rAAV se observó *in vivo* seguido el tratamiento con Ad, radiación ionizante, o inhibidores de topoisomerasa. Sin embargo, el efecto fue muy variable entre diferentes tejidos y tipos de células. Se ha sugerido más recientemente que el reapareamiento del vADN complementario a partir de las partículas de rAAV infectantes separadas puede ser una vía importante para transducción de rAAV.

45 El requisito de síntesis de la cadena complementaria, o reclutamiento, se considera que es ahora un factor limitante en la eficacia de los vectores de rAAV. La tasa de transducción de rAAV en hígado de ratón se estimó en aproximadamente 5 % de los hepatocitos después de la infusión por la vena porta de 4.2×10^{10} partículas. Los experimentos posteriores revelaron que el vADN de rAAV estuvo alojado en los núcleos de prácticamente todos los hepatocitos hepáticos, y que el potencial de transducción de estos genomas puede rescatarse mediante la co-infección con adenovirus. Esto es coherente con un informe anterior de hasta el 25 % de los hepatocitos de ratón transducidos por 10^{10} partículas de rAAV en la presencia del adenovirus co-infectando. La expresión de rAAV en el tejido hepático coincide con la formación del ADN bicatenario y el vADN parece que se pierde si no se convierte en bicatenario dentro de las semanas 5-13. Otros experimentos sugieren que una subpoblación de hepatocitos de ratón es transitoriamente permisiva para la transducción *in vivo* de rAAV.

50 La publicación internacional de patente WO99/11802 describe vectores autónomos de suministro basados en parvovirus que comprenden una secuencia de ácido nucleico heterólogo y se empaquetan dentro de una cápsida del parvovirus. En consecuencia, la presente invención se refiere a la necesidad en la técnica de mejorar los vectores de suministro de genes

de parvovirus. Particularmente, la presente invención se refiere a la necesidad de la síntesis de la cadena complementaria por vectores convencionales de suministro de genes de AAV.

Resumen de la invención

5

La naturaleza monocatenaria del genoma de AAV puede afectar a la expresión de vectores de rAAV más que cualquier otra característica biológica. En lugar de basarse en mecanismos celulares potencialmente variables para proporcionar una cadena complementaria para vectores de rAAV, recién se encontró que este problema puede evitarse empacando ambas cadenas como una única molécula de ADN. En los estudios descritos en la presente, se observó una eficacia aumentada de la transducción de vectores duplicados sobre rAAV convencional en las células HeLa (5-140 veces). De mayor importancia, a diferencia de los vectores convencionales de VAA monocatenarios, los inhibidores de la replicación del ADN no afectaron la transducción de los vectores duplicados de la invención. Adicionalmente, los vectores de parvovirus duplicados de la invención mostraron una aparición más rápida y un nivel más alto que la expresión del transgen que la que mostraron los vectores de rAAV en hepatocitos de ratón in vivo. Todos estos atributos biológicos soportan la generación y caracterización de una nueva clase de vectores de parvovirus (ADN bicatenario de suministro) que contribuyen significativamente al desarrollo continuo de sistemas de suministro de genes basados en parvovirus.

10

15

20

En general, se construyó y caracterizó un nuevo tipo de vector de parvovirus que transporta un genoma duplicado, que resulta en cadenas co-empacadas de polaridad positiva y negativa atadas conjuntamente en una sola molécula en las investigaciones descritas en la presente.

La presente invención proporciona una partícula de parvovirus duplicado que comprende: una cápsida del parvovirus, un genoma del vector que comprende en la dirección 5' a 3':

25

- (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
- (ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
- (iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
- (iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
- (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';

30

donde dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

35

Como un aspecto adicional, la presente invención proporciona una partícula de parvovirus duplicado que comprende: una cápsida del parvovirus, un genoma del vector que comprende en la dirección 5' a 3':

40

- (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
- (ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
- (iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
- (iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada; y
- (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';

45

en donde las secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de repetición terminal de parvovirus 5' y 3' y la secuencia de repetición terminal no resoluble son al menos 90 % complementarias entre sí; y en donde además dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

50

Preferentemente las secuencias de nucleótidos heterólogas duplicadas formadas por apareamiento de bases intracadena están operativamente asociadas con un elemento promotor o potenciador. En una modalidad adicional de la invención, las secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de repetición terminal de parvovirus 5' y 3' y la secuencia de repetición terminal no resoluble son esencialmente completamente complementarias entre sí.

Preferentemente la partícula de parvovirus duplicado es una partícula de parvovirus híbrida, una partícula de parvovirus

quimérica o una partícula de parvovirus objetivo. Con mayor preferencia, el genoma del vector es aproximadamente el tamaño del genoma del AAV silvestre.

5 La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una plantilla para la producción de un ADN virión que se empaca en una cápsida de parvovirus, la plantilla que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por una secuencia de repetición terminal de parvovirus 5' o 3' y una secuencia de repetición terminal no resoluble. Preferentemente la plantilla es dimérica y comprende, en la dirección 5' a 3':

- 10 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
15 (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';

en donde dicho ADN virión es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogos tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

20 Con mayor preferencia el ácido nucleico de la invención comprende una plantilla dimérica para la producción de un ADN virión que se empaca en una cápsida de parvovirus, la plantilla que comprende en la dirección 5' a 3':

- 25 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada; y
(v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';

30 en donde las secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de repetición terminal de parvovirus 5' y 3' y la secuencia de repetición terminal no resoluble son al menos 90 % complementarias entre sí; y en donde además dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

35 En una modalidad, dicha repetición terminal de parvovirus 5' y 3' de la partícula de parvovirus duplicada o las secuencias de ácido nucleico de la invención son secuencias de repetición terminal 5' y 3' de virus adeno-asociado (AAV), opcionalmente seleccionadas del grupo consistente de las secuencias de repetición terminal 5' y 3' de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.

40 Preferentemente, dicha secuencia de repetición terminal no resoluble de la partícula de parvovirus duplicada o las secuencias de ácido nucleico de la invención es una secuencia de repetición terminal no resoluble de parvovirus. Con mayor preferencia dicha secuencia de repetición terminal no-resoluble de parvovirus es una secuencia de repetición terminal de AAV no-resoluble.

45 En una modalidad de la invención la secuencia de repetición terminal no-resoluble de parvovirus comprende una modificación seleccionada del grupo consistente de:

- 50 (i) eliminación del sitio de resolución terminal (trs);
(ii) eliminación de esencialmente todo el elemento D;
(iii) una inserción en el elemento D;
(iv) inserción en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs);
(v) una o más sustituciones de base de nucleótidos en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs).

En una modalidad alternativa de la invención, la secuencia de repetición terminal no resoluble es una secuencia de repetición terminal de un serotipo AAV que no es reconocido por las proteínas Rep de AAV2 o es una secuencia de repetición terminal de un parvovirus autónomo que no es reconocido por las proteínas Rep de AAV.

5 Preferentemente la secuencia de nucleótidos heteróloga o la secuencia complementaria de ella codifica un polipéptido, en donde opcionalmente el polipéptido es un polipéptido terapéutico o inmunogénico. En una modalidad el polipéptido es un polipéptido terapéutico y se selecciona del grupo que consiste en: endostatina, angiostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina, un anticuerpo monoclonal, Factor IX, Factor X, una enzima lisosomal que incluyen hexosaminidasa A e iduronato sulfatasa, globina, leptina, catalasa, tirosina hidroxilasa, una citocina que incluyen α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina-12, factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos y linfotoxina, un factor de crecimiento peptídico u hormona que incluyen somatotropina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de nervios, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico derivado de la glía, factor α y β de crecimiento transformante, un receptor que incluye el receptor del factor de necrosis tumoral, un producto de gen suicida que incluyen timidina quinasa, citosina deaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, deoxicitidina cinasa y factor de necrosis tumoral, una proteína que confiere resistencia a un fármaco de terapia contra el cáncer, y un producto génico supresor de tumores.

15 La presente invención proporciona además un parvovirus duplicado o ácido nucleico en donde el polipéptido es un polipéptido inmunogénico y se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno de cáncer; antígeno tumoral; antígeno bacteriano; antígeno viral; (v) antígeno protozoario; o (vi) antígeno parasitario.

20 En una modalidad, la secuencia de nucleótidos heteróloga o la secuencia complementaria de ella codifica un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un ARN que efectúa empalme en trans mediado por el empalmosoma, un ARN de interferencia (iARN.), o un ARN guía.

25 En una modalidad alternativa, la cápsida del parvovirus es una cápsida del virus adeno-asociado (AAV), opcionalmente seleccionada del grupo consistente de una cápsida de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6. Preferentemente el ácido nucleico se selecciona del grupo consistente de un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) y un vector viral. Con mayor preferencia el ácido nucleico se incorpora de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.

30 La presente invención proporciona además un ADN virión producido a partir del ácido nucleico de la invención y una célula cultivada que comprende el ácido nucleico de la invención.

35 Como un aspecto adicional, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende una pluralidad de la partícula de parvovirus duplicado de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además un método para producir una partícula de parvovirus duplicados *in vitro*, que comprende proporciona a una célula:

- 40 (a) un ácido nucleico que codifica una plantilla de acuerdo con la invención;
 (b) secuencias de nucleótidos suficientes para la replicación de la plantilla que produce un genoma del vector; y
 (c) secuencias de nucleótidos suficientes para empacar el genoma del vector en una cápsida del parvovirus;

45 bajo condiciones suficientes para la replicación y empaque del genoma del vector en la cápsida del parvovirus, de manera que las partículas de parvovirus duplicado que comprenden el genoma del vector encapsidado dentro de la cápsida del parvovirus se produzcan en la célula.

50 Preferentemente el ácido nucleico que comprende la plantilla es un plásmido o un vector viral, opcionalmente un vector del virus herpes, un vector de adenovirus o un vector de baculovirus. Con mayor preferencia el ácido nucleico que comprende la plantilla se integra de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.

55 La presente invención proporciona además un método *in vitro* para suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula, que comprende poner en contacto una célula con una partícula de parvovirus duplicado de la invención bajo condiciones suficientes para que la partícula de parvovirus duplicado entre en la célula. Preferentemente la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer, célula de tumor, célula neural que incluyen células del sistema nervioso periférico y sistema nervioso central que incluyen célula del cerebro, célula del pulmón, célula de los músculos, célula

epitelial que incluyen células epiteliales del intestino y vías respiratorias, células hepáticas, células dendríticas, células de los ojos que incluyen células de la retina, células pancreáticas que incluyen células de los islotes, células del miocardio, células óseas, células del bazo, queratinocito, fibroblasto, células endoteliales, células de la próstata, células germinales, células progenitoras, célula madre neural y célula madre del hígado.

5

La presente invención proporciona además un parvovirus duplicados de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: fibrosis quística u otra enfermedad pulmonar, hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia u otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia u otro trastorno neurológico, cáncer, diabetes mellitus, distrofia muscular que incluyen distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, enfermedad de Gaucher, enfermedad Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, un enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de Tay-Sach, síndrome de Hunter u otro defecto metabólico, una enfermedad degenerativa de la retina u otra enfermedad del ojo.

10

15

Como un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un parvovirus duplicado de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, en donde el tratamiento de la enfermedad necesita el suministro de un ácido nucleico a una célula.

20

Se proporciona además el uso de un parvovirus duplicado de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, en donde el tratamiento de la enfermedad necesita el suministro de un polipéptido inmunogénico a una célula.

25

La presente invención proporciona además el uso de un parvovirus duplicado de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis quística u otra enfermedad pulmonar, hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia u otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia u otro trastorno neurológico, cáncer, diabetes mellitus, distrofia muscular que incluyen distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, enfermedad de Gaucher, enfermedad Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de Tay-Sach, síndrome de Hunter u otro defecto metabólico, una enfermedad degenerativa de la retina u otra enfermedad del ojo.

30

En consecuencia, la presente descripción describe una partícula de parvovirus que comprende una cápsida de parvovirus (por ejemplo, una cápsida de AAV) y un genoma del vector que codifica una secuencia de nucleótidos heteróloga, donde el genoma del vector es auto-complementario, es decir, el genoma del vector es una repetición dimérica invertida. Preferentemente, el genoma del vector es aproximadamente del tamaño del genoma de parvovirus silvestre (por ejemplo, el genoma de AAV) que corresponde a la cápsida del parvovirus en que se empaquetará y comprende una señal de empaque apropiada. La presente descripción describe además el genoma del vector descrito anteriormente y las plantillas que codifican el mismo.

35

40

Una secuencia bicatenaria se forma mediante el apareamiento de bases entre las secuencias de nucleótidos heterólogas complementarias, que es un sustrato adecuado para la expresión génica (es decir, transcripción. y, opcionalmente, traducción) o un sustrato para la recombinación del huésped (es decir, una plantilla de ADNbc) en una célula huésped sin la necesidad de una maquinaria celular huésped para convertir el genoma del vector en una forma bicatenaria.

45

Las denominaciones de 5' y 3' con respecto al vector del genoma (o plantillas para la producción de la misma, ver más abajo) no indican ninguna dirección particular de la transcripción de la secuencia bicatenaria formada entre las dos secuencias heterólogas complementarias. La "cadena codificante" puede estar ya sea en la mitad 5' o 3' del ADN virión. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que el término "cadena codificante" se usa en su sentido más amplio para indicar la cadena que codifica el transcrito deseado, y abarca las secuencias no traducidas incluyendo, también las secuencias antisentido. Así, se puede iniciar la transcripción a partir del extremo 5' de la primera secuencia de nucleótidos heteróloga en la mitad 5' del genoma del vector, a partir del extremo 5' de la primera secuencia de nucleótidos heteróloga complementaria en la mitad 3' del genoma del vector.

50

Alternativamente como se indica, en el vADN bicatenario formado por el apareamiento de bases intracadena, la

transcripción puede iniciarse desde el extremo abierto o desde el extremo cerrado (*es decir*, a partir del extremo más cercano a la TR no-resoluble) de la estructura de horquilla.

5 Como se ha descrito, la cápsida del parvovirus es preferiblemente una cápsida de AAV. Se prefiere además que las secuencias de repetición terminal de parvovirus y/o las secuencias de repetición terminal no-resoluble sean secuencias de AAV.

10 Como se describe, la partícula de parvovirus duplicado comprende secuencias de control de expresión suficientes (*por ejemplo*, un promotor) para la expresión de la secuencia bicatenaria formada por el apareamiento de bases intracadena en el vADN auto-complementario.

El genoma del vector puede expresar además dos o más transcritos de la secuencia bicatenaria formada por apareamiento de bases intracadena.

15 Se describe además una secuencia de nucleótidos que comprenden una plantilla para la producción de un ADN virión, la plantilla que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por una secuencia de repetición terminal de parvovirus y una secuencia de repetición terminal no-resoluble de parvovirus.

20 Se describe además una secuencia de nucleótidos que comprende una plantilla dimérica para la producción de un ADN virión, la plantilla que comprende en la dirección 5' a 3': una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5'; una primera secuencia de nucleótidos heteróloga; una secuencia de repetición terminal no-resoluble de parvovirus; una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a la primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3'; en donde el ADN virión es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena para formar un ADNbc entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

Preferentemente, las secuencias de repetición terminales de parvovirus y/o las secuencias de repetición terminales no resolubles de parvovirus son secuencias de AAV.

30 Se describen también métodos para producir y administrar los vectores duplicados de parvovirus de la invención.

Un método para administrar una secuencia de nucleótidos a un sujeto, comprende administrar a un sujeto una partícula de parvovirus duplicado en un portador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la partícula de parvovirus duplicado se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que lo necesita.

35 Se describe además un método para suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula, que comprende: poner en contacto una célula con una partícula de parvovirus duplicado que comprende: una cápsida del parvovirus y un genoma del vector que comprende: (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5'; (ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga; (iii) una secuencia de repetición terminal de parvovirus localizada centralmente; (iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a la primera secuencia de nucleótidos heteróloga (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3'; en donde el genoma del vector duplicado es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.

45 Preferentemente la cápsida del parvovirus es una cápsida de AAV, y el genoma del vector es aproximadamente del tamaño del genoma del AAV silvestre. Se prefiere además que las secuencias de repetición terminal de parvovirus sean secuencias de AAV. La célula puede ponerse en contacto con la partícula de parvovirus duplicado *in vitro* o *in vivo*.

50 Estos y otros aspectos de la presente invención se describen con más detalle en la descripción de la invención que se expone más abajo.

Breve descripción de las figuras

55 **Figura 1. Contenido del ADN virión de rAAV y vectores duplicados.** El dibujo ilustra el contenido de ADN de los vectores usados en este estudio y la conformación prevista que adoptan tras la liberación de los viriones. Los transgenes

expresados a partir del promotor temprano de citomegalovirus (CMV) son: proteína fluorescente verde (GFP), β galactosidasa (LacZ), eritropoyetina de ratón (mEpo). La neomicina fosfotransferasa (neo) se expresa a partir del promotor temprano de SV40 (SV40). El tamaño, en nucleótidos (nt) de cada molécula de ADN empacada se indica. Los vectores de GFP dímero y mEpo auto-complementarios o duplicados (scAAV) se pliegan en un ADN bicatenario completo con una copia adicional de la repetición terminal, mientras que los vectores de GFPneo, LacZ, y mEpo λ requieren de la síntesis del ADN de la cadena complementaria mediada por células.

Figura 2. Fraccionamiento del vector en gradientes de CsCl. El ADN virión (vDNA) se extrajo a partir del gradiente de CsCl de vectores rAAV fraccionados CMV-GFP (**Panel a**), GFPneo (**Panel b**), y LacZ (**Panel c**). Geles de agarosa alcalinas del vADN se someten a la transferencia Southern e hibridan con un fragmento de ADN de CMV-GFP. Los marcadores en el extremo izquierdo del panel a eran las secuencias del vector eliminadas de los plásmidos usados para generar los vectores virales (ver resultados). El número de unidad de longitud, ADNmc, copias del vector por molécula se indican por 1x, 2x, y 4x. Los vectores virales usados en los experimentos representados en las Figs. 3 y 4 eran de las fracciones a-11 o a-10 de CMV-GFP (como se indica en las leyendas de las figuras), fracción b-13 de GFPneo y la fracción c-12 de LacZ.

Figura 3. Eficacia de transducción de los vectores duplicados contra rAAV convencional en ausencia y presencia de adenovirus co-infectando. Las eficacias de los tres vectores fraccionados por CsCl (Fig.1) se compararon en las células HeLa rápidamente divididas infectadas con la fracción 11 de scAAV-GFP (0.5 partículas por célula), fracción 13 de rAAV-GFPneo (2 partículas por célula), o fracción 12 de rAAV-LacZ (0.5 partículas por célula). La transducción se cuantificó en 24 horas post-infección mediante el recuento de células positivas GFP usando microscopía de fluorescencia, o mediante la fijación de las células y la tinción X-Gal. La eficacia de transducción se representó gráficamente como el número de partículas físicas por unidad de transducción, según se determina por el número de células de puntuación positiva para la expresión de GFP o LacZ. Las barras gris oscuro indican la eficacia de transducción en presencia de la co-infección con Ad a 5 pfu por célula.

Figura 4. Transducción con vectores de rAAV duplicados y convencionales en presencia del inhibidor de la síntesis de ADN. (Panel a). Cultivos de células HeLa a 30 % de confluencia se trataron con las concentraciones indicadas de hidroxurea 24 hr antes de infectar con 3.8×10^6 partículas del scAAV-GFP, \blacklozenge , (Fig. 2a, fracción 10), el monómero homólogo, \bullet (Fig. 2, panel a, fracción 14), o rAAV-GFPneo, \circ (Fig. 2, panel b, fracción 13). El tratamiento con HU se mantuvo hasta que la transducción se analizó a las 24 horas post-infección. Cada punto de datos se calculó a partir del promedio del número de células GFP positivas en 10 campos aleatorios independientemente del número total de células, que fue variable debido al efecto de la hidroxurea en la división celular. **(Panel b).** El mismo procedimiento se usó para evaluar la transducción en presencia de las concentraciones de afidicolina indicadas. Sólo se compararon el monómero duplicado y homólogo (fracciones 10 y 14).

Figura 5. Transducción *in vivo* del tejido hepático de ratón con vectores rAAV duplicados o monocatenarios. Ratones Balb-c ByJ de diez semanas de edad se infundieron con 2×10^{10} partículas ya sea de scAAV-CMV-mEpo, \blacklozenge , (n=4), o rAAV-CMV-mEpo λ monocatenario completo, \blacktriangle , (n=5), en 200 μ l solución salina normal mediante inyección en la vena porta. Un grupo de ratones de control se infundió con solución salina normal, \square , (n=4), y un sólo ratón, \circ , se flebotomizó en los mismos intervalos de 7 días sin cirugía previa. El hematocrito de sangre se usó como una medida funcional de la expresión de mEpo.

Figura 6 es una representación de una plantilla preferida para la producción los vectores de parvovirus duplicado de la invención.

Figura 7 muestra un gradiente de densidad de CsCl del vector mutante rAAV-CMV-GFP Hpa-trs.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá a continuación con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran las modalidades preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan para

que ésta descripción sea exhaustiva y completa, refleje completamente el alcance de la invención a aquellos con experiencia en la materia.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien con experiencia en la materia a la que pertenece esta invención. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención. Tal como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10 Las secuencias de nucleótidos se presentan en la presente descripción en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha a menos que se indique específicamente de cualquier otra forma. nucleótidos y aminoácidos se representan en la presente descripción de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB, o (para aminoácidos), ya sea por el código de una letra, o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 CFR §1.822 y uso establecido. Ver, por ejemplo, PatentIn Manual de usuario, 99-102 (Nov. 1990) (Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos).

15 Excepto que se indique de cualquier otra forma, los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para la construcción de parvovirus recombinante y constructos de rAAV, vectores de empaque que expresan el rep de parvovirus y/o secuencias de cap, así como células de empaque transfectadas de forma estable y transitoria. Aquellos con experiencia en la materia conocen tales técnicas. Ver, por ejemplo, SAMBROOK y otros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2da Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. AUSUBEL y otros CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

20 Los parvovirus son virus animales de ADN relativamente pequeños y contienen un genoma de ADN monocatenario lineal. El término "parvovirus" como se usa en la presente abarca la familia *Parvoviridae*, que incluyen parvovirus y dependovirus de replicación autónoma. Los parvovirus incluyen miembros del género *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, y *Contravirus*. Los parvovirus autónomos ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, virus diminuto del ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus del pollo, parvovirus felino, virus de la panleucopenia, parvovirus felino, parvovirus del ganso, y virus B19. Otros parvovirus autónomos se conocen para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ra ed., Lippincott-Raven Publishers).

25 El género *Dependovirus* contiene los virus adeno-asociados (AAV), que incluyen pero sin limitarse a, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3, AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, y AAV ovino. Ver, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ra ed., Lippincott-Raven Publishers).

30 Como se usa en la presente, el término "vector" o "vector de suministro de genes" puede referirse a una partícula de parvovirus (por ejemplo, AAV) que funciona como un vehículo de suministro de genes, y que comprende vADN (por ejemplo, el genoma del vector) empacado dentro de una cápsida del parvovirus (por ejemplo, AAV) . Alternativamente, en algunos contextos, el término "vector" puede usarse para referirse al genoma/vADN del vector.

35 Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" típicamente será una secuencia que no existe de manera natural en el virus. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede referirse a una secuencia viral que se coloca en un entorno de origen no natural (por ejemplo, por asociación con un promotor con el cual no está naturalmente asociado en el virus).

40 Como se usa en la presente, un "genoma del vector de parvovirus recombinante" es un genoma de parvovirus (por ejemplo, vADN) en el cual se inserta la secuencia de nucleótidos heteróloga (por ejemplo, extraña) (por ejemplo, transgén). Una "partícula de parvovirus recombinante" comprende un genoma del vector de parvovirus recombinante empacado dentro de una cápsida del parvovirus.

45 Igualmente, un "genoma del vector rAAV" es un genoma de AAV (por ejemplo, vADN) que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga. Los vectores rAAV requieren solamente las repeticiones terminales de 145 bases en *cis* para generar el virus. Todas las otras secuencias virales son prescindibles y pueden suministrarse en *trans* (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Típicamente, el genoma del vector de rAAV sólo conservará las secuencias de

repetición terminal (TR) mínimas para maximizar el tamaño del transgén que puede ser eficazmente empacado por el vector. Una "partícula de rAAV" comprende un genoma del vector de rAAV empacado dentro de una cápsida de AAV.

5 Las partículas de parvovirus de la invención pueden ser una partícula "híbrido" en el que las TR virales y la cápsida viral son de diferentes parvovirus. Preferentemente, las TR virales y cápsida son de diferentes serotipos de AAV (*por ejemplo*, como se describe en publicación internacional de patente WO 00/28004, solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/248,920; y Chao y otros, (2000) *Molecular Therapy* 2:619.

10 Igualmente, el parvovirus puede tener una cápsida "quimérica" (*por ejemplo*, que contiene las secuencias de diferentes parvovirus, de preferencia diferentes serotipos de AAV) o una cápsida "objetivo" (*por ejemplo*, un tropismo dirigido) como se describe en la publicación internacional de patente WO 00/28004.

15 Preferentemente, la partícula de parvovirus duplicado de la invención tiene una cápsida de AAV, que puede ser además una cápsida quimérica u objetivo, como se describió anteriormente.

20 Las partículas de parvovirus "duplicadas" y los genomas del vector de la invención intercambiamente pueden estar referidos en la presente como vectores "diméricos" o "auto-complementarios". La partícula de parvovirus duplicado de la invención comprende una cápsida del parvovirus que contiene un ADN virión (vADN). El vADN es auto-complementario tal que puede formar una estructura en horquilla tras la liberación de la cápsida viral. El vADN duplicado aparece para proporcionar a la célula huésped un ADN bicatenario que puede expresarse (*es decir*, transcribirse y, opcionalmente, traducirse) por la célula huésped sin la necesidad de síntesis de la segunda cadena, como se requiere con los vectores de parvovirus convencionales.

25 El genoma del vector del parvovirus duplicado contiene preferentemente secuencias de empaque suficientes para la encapsidación dentro de la cápsida del parvovirus seleccionado (*por ejemplo*, cápsida de AAV).

30 Los expertos en la técnica apreciarán que el vADN duplicado no puede existir en una forma bicatenaria en todas las condiciones, pero tiene la capacidad de hacerlo bajo condiciones que favorecen la hibridación de bases de nucleótidos complementarias. En consecuencia, el término "vector de parvovirus duplicado" no indica que el vADN se encuentra necesariamente en la forma duplicada o bicatenaria (*por ejemplo*, existe el apareamiento de bases entre las cadenas autocomplementarias) dentro de la cápsida del parvovirus. Claramente, un experto en la técnica entenderá que el vADN probablemente no está en forma bicatenaria, mientras se empaqueta dentro de la cápsida del parvovirus.

35 La expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga (como se describe más abajo) se "mejora" preferentemente a partir de los vectores de parvovirus duplicados de la invención en comparación con el vector de parvovirus comparable (*por ejemplo*, rAAV). Preferentemente, la expresión génica puede detectarse a partir del vector de parvovirus duplicado sustancialmente más rápidamente que a partir del vector de parvovirus monomérico comparable. Por ejemplo, la expresión del gen puede detectarse en menos de aproximadamente 2 semanas, preferentemente menos de aproximadamente una semana, con mayor preferencia menos de aproximadamente 72 horas, aún con mayor preferencia menos de aproximadamente 48 horas, y aún con mayor preferencia menos de aproximadamente 24 horas después de la administración del vector de parvovirus duplicados. La expresión génica puede detectarse por cualquier método conocido en la técnica, *por ejemplo*, mediante la detección de la transcripción, traducción, o actividad biológica o un efecto fenotípico resultante de la expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga (*por ejemplo*, el tiempo de coagulación de la sangre).

45 Alternativamente, la expresión de genes del vector de parvovirus duplicado se puede "mejorar" en que los niveles más altos de expresión génica (según se define en el párrafo anterior) se detectan en comparación con el vector de parvovirus monomérico comparable (*por ejemplo*, vector de rAAV). Las comparaciones pueden hacerse en el nivel de expresión génica en el mismo intervalo tiempo después de la administración del virus. Alternativamente, las comparaciones pueden hacerse entre el nivel máximo de expresión génica alcanzado con cada vector.

50 Los vectores de parvovirus duplicado de la invención pueden tener favorablemente relaciones de unidad de transducción (tu) a partícula mejoradas comparado con los vectores de parvovirus convencionales. En consecuencia, la presente invención abarca además nuevas composiciones del vector de parvovirus con una relación tu/partícula mejorada sobre composiciones de vectores de parvovirus convencionales (*por ejemplo*, vectores de rAAV). Preferentemente, la relación tu/partícula es menor que aproximadamente 50:1, menor que aproximadamente 20:1, menor que aproximadamente 15:1,

menor que aproximadamente 10:1, menor que aproximadamente 8:1, menor que aproximadamente 7:1, menor que aproximadamente 6:1, menor que aproximadamente 5:1, menor que aproximadamente 4:1, o inferior. No existe un límite inferior particular para la relación tu/partícula. Típicamente, la relación tu/partícula será mayor que aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1 o 4:1.

El término "plantilla" o "sustrato" se usa típicamente en la presente descripción para referirse a una secuencia de polinucleótidos que puede replicarse para producir el vADN de parvovirus duplicado de la invención. Para el propósito de producción del vector, la plantilla se incorporará típicamente dentro de una secuencia de nucleótidos o constructo más largo, que incluyen pero sin limitarse a un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o un vector viral (*por ejemplo*, adenovirus, herpesvirus, Virus de Epstein-Barr, vectors de AAV, de baculovirus, retrovirales, y similares). Alternativamente, la plantilla puede incorporarse establemente en el cromosoma de una célula de empaque.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido" abarca los péptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en la presente, "transducción" o "infección" de una célula por AAV se refiere a que el AAV entra a la célula para establecer una infección latente o activa (*por ejemplo*, lítica), respectivamente. *Ver, por ejemplo*, BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ra ed., Lippincott-Raven Publishers). En modalidades de la invención en la que un vector de rAAV se introduce en una célula con el propósito de suministrar una secuencia de nucleótidos a la célula, se prefiere que los AAV se integren en el genoma y establezcan una infección latente.

Vectores de parvovirus duplicados.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento que los vectores de ADN de parvovirus "duplicados" (como se describe anteriormente) pueden emplearse favorablemente para el suministro de genes. Además, las presentes investigaciones demostraron que estos vectores de parvovirus duplicados pueden ser más eficientes que los vectores de AAV, *por ejemplo*, transcripción mejorada de las relaciones de partículas, expresión transgénica más rápida, un mayor nivel de expresión transgénica, y/o la expresión transgénica más persistente. Los inventores demostraron además que los vectores de parvovirus duplicados de la invención pueden usarse para el suministro de genes a células huésped que son típicamente refractarias a la transducción de AAV. Así, estos vectores de parvovirus duplicados tienen una variedad de huésped (*por ejemplo*, más amplia) diferente a la de los vectores AAV.

Los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente son polinucleótidos diméricos auto-complementarios (sc) (típicamente, ADN) empacado dentro de una cápsida viral, preferentemente una cápsida de parvovirus, con mayor preferencia, una cápsida de AAV. En algunos aspectos, el genoma viral que se empaca dentro de la cápsida es prácticamente un intermedio de la replicación "atrapado" que no puede resolverse para producir las cadenas de ADN de parvovirus de polaridad positiva y negativa. En consecuencia, los vectores de parvovirus duplicados de la invención parecen evadir la necesidad de síntesis del ADN complementario mediada por la célula huésped inherente a los vectores AAV recombinante convencional (rAAV), abordando de ese modo una de las limitaciones de los vectores de rAAV.

Este resultado se logra dejando al virus empaquetar repeticiones invertidas esencialmente diméricas del genoma del vector de parvovirus monocatenario (*por ejemplo*, AAV) tal que ambas cadenas, unidas en un extremo, están contenidos dentro de una única cápsida infecciosa. Tras la liberación de la cápsida, las secuencias complementarias se hibridan de nuevo para formar el ADN bicatenario transcripcionalmente activo dentro de la célula objetivo.

Los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente son fundamentalmente diferentes de los vectores de parvovirus convencionales (*por ejemplo*, rAAV), y del parvovirus parental (*por ejemplo*, AAV), en el cual el vADN puede formar una estructura en horquilla bicatenaria debido al apareamiento de bases intracadena, y ambas cadenas de ADN se encapsidan. Así, el vector de parvovirus duplicado es funcionalmente similar a los vectores virales de ADN bicatenario en lugar del parvovirus del cual se derivó. Esta característica se refiere a un defecto previamente reconocido de la transferencia génica mediada por rAAV, que es la propensión limitada de la célula objetivo deseada para sintetizar el ADN complementario al genoma monocatenario normalmente encapsidado en el Parvoviridae.

La cápsida viral puede ser de cualquier parvovirus, tanto de un parvovirus autónomo o dependovirus, como se describió anteriormente. Preferentemente, la cápsida viral es una cápsida de AAV (*por ejemplo*, cápsida de AAV1, AAV2, AAV3,

- 5 AAV4, AAV5 o AAV6). En general, se prefieren la cápsida de AAV1, cápsida de AAV5, y cápsida de AAV3. La elección de la cápsida del parvovirus puede basarse en una serie de consideraciones según se conoce en la técnica, *por ejemplo*, el tipo de célula objetivo, el nivel deseado de expresión, la naturaleza de la secuencia de nucleótidos heteróloga que se expresa, cuestiones relacionadas con la producción viral, y similares. Por ejemplo, la cápsida de AAV1 puede emplearse ventajosamente en el músculo esquelético, hígado, y células del sistema nervioso central (*por ejemplo*, cerebro); AAV5 para las células en las vías respiratorias y pulmón; AAV3 para células de médula ósea; y AAV4 para células particulares en el cerebro (*por ejemplo*, células anexables).
- 10 La partícula de parvovirus puede ser una partícula "híbrido" en el que las TR virales y la cápsida viral son de diferentes parvovirus. Preferentemente, las TR virales y la cápsida son de diferentes serotipos de AAV (*por ejemplo*, como se describe en la publicación internacional de patente WO 00/28004, solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/248,920; y Chao y otros, (2000) Molecular Therapy 2:619;
- 15 Igualmente, el parvovirus puede tener una cápsida "quimérica" (*por ejemplo*, que contiene las secuencias de diferentes parvovirus) o una cápsida "objetivo" (*por ejemplo*, un tropismo dirigido) como se describe en estas publicaciones.
- 20 Como se usa en la presente, una "partícula de parvovirus duplicado" abarca partículas de virus híbridas, quiméricas y objetivo. Preferentemente, la partícula de parvovirus duplicado tiene una cápsida de AAV, que puede ser además una cápsida quimérica u objetivo, como se describió anteriormente.
- 25 Un vector de parvovirus duplicado de acuerdo con la invención puede producirse por un método adecuado. Preferentemente, la plantilla para la producción del vADN es una que preferentemente da lugar a un vADN duplicado, en lugar de monomérico (*es decir*, la mayoría del vADN producido se duplica) que tiene la capacidad de formar un vADN bicatenario. De preferencia, al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más de los productos de replicación de la plantilla se duplican.
- 30 En una modalidad particular, la plantilla es una molécula de ADN que comprende una o más secuencias de repetición terminal (TR). La plantilla comprende además una TR modificada que no puede resolverse (*es decir*, cortarse) por las proteínas parvovirus Rep. Durante la replicación, la incapacidad de la proteína Rep para resolver la TR modificada resultará en un intermedio estable con los dos "monómeros" unidos covalentemente por la TR no resoluble. Esta molécula "duplicada" puede empacarse dentro de la cápsida de parvovirus (AAV) para producir un nuevo vector de parvovirus duplicado.
- 35 Aunque no se desea estar limitado a ninguna teoría en particular de la invención, es probable que el genoma del virión sea conservado en una forma monocatenaria al empacarse dentro de la cápsida viral. Tras la liberación de la cápsida durante la infección, parece que la molécula dimérica "se recupera" o híbrida para formar una molécula bicatenaria mediante el apareamiento de bases intracadena, con la secuencia TR no resoluble formando una estructura de horquilla covalentemente cerrada en un extremo. Este vADN bicatenario evita la síntesis de la segunda cadena mediada por la célula huésped, que se ha postulado es una etapa limitante de la velocidad de transducción de AAV.
- 40 En modalidades preferidas, la plantilla comprende además una secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) (como se describe más abajo) que se empaca para suministrar a una célula objetivo. De conformidad con esta modalidad particular, la secuencia de nucleótidos heteróloga se localiza entre las TR virales en cada extremo del sustrato. En modalidades preferidas adicionales, los genes cap del parvovirus (*por ejemplo*, AAV) y los genes rep del parvovirus (*por ejemplo*, AAV) se eliminan de la plantilla (y se produce vADN de ahí). Esta configuración maximiza el tamaño de las secuencias de ácido nucleico heterólogas que pueden ser portadas por la cápsida del parvovirus.
- 45 En una modalidad en particular, la plantilla para la producción de los vectores de parvovirus duplicados de la invención contiene al menos un TR en los extremos 5' y 3', que flanquea una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés (como se describe más abajo). El TR en un extremo del sustrato es no resoluble, *es decir*, no se puede resolver (cortarse) por la proteína Rep. Durante la replicación, la incapacidad de la proteína Rep de resolver uno de las TR resultará en un intermedio estable con los dos "monómeros" unidos covalentemente por la TR no funcional (*es decir*, no-resoluble). La secuencia de nucleótidos heteróloga puede estar en cualquier orientación con respecto a la TR no resoluble.
- 50 El término "flanqueado" no pretende indicar que las secuencias son necesariamente contiguas. Por ejemplo, en el ejemplo
- 55

en el párrafo anterior, puede haber secuencias intermedias entre la secuencia de nucleótidos heteróloga y la TR. Una secuencia que está "flanqueada" por otros dos elementos indica que un elemento se ubica 5' de la secuencia y el otro se ubica 3' de la secuencia; sin embargo, pueden existir secuencias de intervención entre ellos.

5 De acuerdo con esta modalidad, la plantilla para la producción del vADN de parvovirus duplicado de la invención es preferentemente aproximadamente la mitad del tamaño del genoma de parvovirus silvestre (*por ejemplo*, AAV) correspondiente a la cápsida en el que el vADN se empaquetará. Alternativamente, como se indica, la plantilla es preferentemente de aproximadamente 40 % a aproximadamente 55 % en peso, con mayor preferencia de aproximadamente 45 % a aproximadamente 52 % en peso. Así, el vADN duplicado producido a partir de esta plantilla tendrá preferentemente
10 un tamaño total que es aproximadamente el tamaño del genoma de parvovirus silvestre (*por ejemplo*, AAV) correspondiente a la cápsida en la que el vADN se empaquetará, *por ejemplo*, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 105 % en peso. En el caso de AAV, se conoce bien en la técnica que la cápsida de AAV desaprueba el empaque de vADN que se distingue sustancialmente en el tamaño del genoma de AAV silvestre. En el caso de una cápsida de AAV, el ADN duplicado es preferentemente aproximadamente 5.2 kb de tamaño o menos. En otras modalidades, el ADN duplicado es preferentemente mayor que aproximadamente 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, o 4.4 kb de distancia y/o menor que aproximadamente 5.4, 5.2, 5.0 o 4.8 kb de longitud.

Alternativamente se declara que, la o las secuencias de nucleótidos heterólogas típicamente serán menores que aproximadamente 2.5 kb de longitud (con mayor preferencia menores que aproximadamente 2.4 kb, aún con mayor preferencia, menores que aproximadamente 2.2 kb de longitud, todavía con mayor preferencia menores que aproximadamente 2.1 kb de longitud) para facilitar el empaque de la plantilla duplicada por la cápsida del parvovirus (*por ejemplo*, AAV).
20

En otra modalidad en particular, la propia plantilla se duplica, *es decir*, es una molécula dimérica auto-complementaria. De acuerdo con esta modalidad, la plantilla comprende una TR resoluble en cada extremo. La plantilla comprende además una TR no resoluble ubicada centralmente (como se describió anteriormente). En otras palabras, cada mitad de la plantilla en cada lado de la TR no resoluble es aproximadamente de la misma longitud. Cada mitad de la plantilla (*es decir*, entre la TR resoluble y no resoluble) comprende una o más secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) de interés. La(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) en cada mitad de la molécula está flanqueada por una TR resoluble y la TR central no resoluble.
25
30

Las secuencias en cualquier mitad de la plantilla son sustancialmente complementarias (*es decir*, al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 98 %, 99 % de complementariedad de secuencia de nucleótidos o más), tal que los productos de la replicación de la plantilla pueden formar moléculas bicatenarias debido al apareamiento de bases entre las secuencias complementarias. En otras palabras, la plantilla es esencialmente una repetición invertida con las dos mitades unidas por la TR no resoluble.
35

Preferentemente, la(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) en cada mitad de la plantilla son esencialmente completamente auto-complementaria (*es decir*, contiene un número insignificante de bases coincidentes, o incluso bases no-coincidentes). Se prefiere además que las dos mitades de la secuencia de nucleótidos sean esencialmente completamente auto-complementarias.
40

De acuerdo con esta modalidad, la plantilla (y el vADN producido de ahí) es preferentemente aproximadamente del mismo tamaño que el genoma silvestre naturalmente encapsulado por la cápsida del parvovirus (*por ejemplo*, AAV), *es decir*, para facilitar el empaque eficiente dentro de la cápsida del parvovirus. Por ejemplo, en el caso de una cápsida de AAV, la plantilla es de preferencia aproximadamente del tamaño del genoma de AAV silvestre. En modalidades particulares, la plantilla es de un tamaño de aproximadamente 5.2 kb o menor. En otras modalidades, la plantilla es preferentemente mayor que aproximadamente 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, o 4.4 kb de longitud y/o menor que aproximadamente 5.4, 5.2, 5.0 o 4.8 kb de longitud. Como una declaración alternativa, la plantilla está preferentemente en el intervalo de 80 % a 105 % del genoma del parvovirus silvestre (*por ejemplo*, AAV).
45
50

La(s) TR(s) (resoluble y no resoluble) son preferentemente secuencias de AAV, con los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 siendo preferidos. El término "repetición terminal" incluye las secuencias sintéticas que funcionan como una repetición terminal invertida de AAV, tales como la "secuencia doble D" como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,478,745 de Samulski y otros.

- 5 Las TR resolubles de AVV de acuerdo con la presente invención no necesitan tener una secuencia TR silvestre (*por ejemplo*, una secuencia silvestre puede alterarse por inserción, delección, truncamiento o mutaciones de aminoácidos), mientras que la TR media las funciones deseadas, *por ejemplo*, empaque de virus, integración y/o rescate de provirus, y similares. Típicamente, pero no necesariamente, las TR son del mismo parvovirus, *por ejemplo*, ambas secuencias TR son de AAV2.
- 10 Los expertos en la técnica apreciarán que la(s) proteína(s) Rep viral(es) usada para la producción de los vectores duplicados de la invención se seleccionan con la consideración de la fuente de las TR virales. Por ejemplo, la TR de AAV5 interactúa más eficientemente con la proteína Rep de AAV5.
- 15 Las secuencias genómicas de los diversos parvovirus autónomos y los diferentes serotipos de AAV, así como las secuencias de las TR, subunidades de cápsida y proteínas Rep se conocen en la técnica. Dichas secuencias pueden encontrarse en la literatura o e base de datos públicas tales como GenBank. Ver, *por ejemplo*, los números de acceso al banco de genes NC 002077, NC 001863, NC 001862, NC 001829, NC 001729, NC 001701, NC 001510, NC 001401, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC 001358, NC 001540. Ver, *además, por ejemplo*, Chiorini y otros, (1999) J. Virology 73:1309; Xiao y otros, (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu y otros, (1996) Virology 221:208; publicación internacional de patentes WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; patente de los Estados Unidos núm. 6,156,303.
- 20 Una descripción temprana de las secuencias TR de AAV1, AAV2 y AAV3 se proporciona por Xiao, X., (1996), "Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration," Ph.D. Dissertation, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA.
- 25 La TR no resoluble puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la inserción en la TR desplazará el sitio de corte (*es decir*, trs) y resultará en una TR no resoluble. La designación de las diversas regiones o elementos dentro de la TR se conoce en la técnica. Una ilustración de las regiones dentro de la TR de AAV se proporciona en la **Figura 6** (*ver además*, BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69, Figura 5, 3ra ed., Lippincott-Raven Publishers). La inserción se realiza preferentemente en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs). Alternativamente, la inserción puede hacerse en un sitio entre el elemento de unión Rep (RBE) dentro del elemento A y el trs en el Elemento D (*ver Figura 6*). La secuencia núcleo del sitio trs de AAV se conoce en la técnica y es descrita por Snyder y otros, (1990) Cell 60:105; Snyder y otros, (1993) J. Virology 67:6096; Brister & Muzyczka, (2000) J. Virology 74:7762; Brister & Muzyczka, (1999) J. Virology 73:9325.
- 30 Por ejemplo, Brister & Muzyczka, (1999) J. Virology 73:9325 describe una secuencia del trs núcleo de 3'-CCGGT/TG-5' en el elemento D. Snyder y otros, (1993) J. Virology 67:6096 identificaron la secuencia de trs mínima como 3'-GGT/TGA-5', la cual se solapa sustancialmente con la secuencia identificada por Brister & Muzyczka.
- 40 Preferentemente, la inserción es en la región del sitio trs. La inserción puede ser de cualquier longitud adecuada que reducirá o sustancialmente eliminará (*por ejemplo*, el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) la resolución de la TR. Preferentemente, la inserción es de al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20 o 30 nucleótidos o más. No existen límites superiores particulares al tamaño de la secuencia insertada, siempre y cuando se logren los niveles adecuados de la replicación y empaque viral (*por ejemplo*, la inserción puede ser tan larga como 50, 100, 200 o 500 nucleótidos o más).
- 45 En otra modalidad preferida, el TR puede volverse no resoluble por delección del sitio trs. Las delecciones pueden extenderse 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30 nucleótidos o más allá del sitio trs, siempre y cuando la plantilla conserve las funciones deseadas. Además de sitio trs, se pueden eliminar algunos o todos del elemento de D. Las delecciones pueden extenderse más aun en el elemento A, sin embargo los expertos en la técnica apreciarán que puede ser ventajoso conservar el RBE en el elemento A, por ejemplo, para facilitar el empaque eficaz. Las delecciones en el elemento A pueden ser 2, 3, 4, 5, 8, 10, o 15 nucleótidos de longitud o más, siempre y cuando la TR no resoluble conserva cualquiera de las funciones deseadas. Se prefiere más aun que algunas o todas las secuencias de parvovirus (*por ejemplo*, AAV) que vayan más allá del elemento D fuera de la secuencia TR (*por ejemplo*, hacia la derecha del elemento D en la **Figura 6**) se eliminen para evitar la conversión génica que corrige la TR alterada.
- 50
- 55 Todavía como una alternativa adicional, la secuencia en el sitio de corte puede estar mutada tal que se reduzca o elimine

sustancialmente la resolución por la proteína Rep. Por ejemplo, las bases A y/o C pueden sustituirse por las bases G y/o T en o próximo del sitio de corte. Los efectos de las sustituciones en el sitio de resolución terminal sobre la escisión de Rep se describieron por Brister & Muzyczka, (1999) J. Virology 73:9325.

5 Como una alternativa adicional, las sustituciones de nucleótidos en las regiones que rodean al sitio de corte, que se postularon para formar una estructura de tallo-lazo, se pueden usar además para reducir la escisión de Rep en el sitio de resolución terminal (*Id.*).

10 Los expertos en la técnica apreciarán que las alteraciones en la TR no resoluble pueden seleccionarse a fin de mantener las funciones deseadas, si existen, de la TR alterada (*por ejemplo*, empaque, reconocimiento Rep, integración sitio-específica, y similares).

15 En modalidades más preferidas, la TR será resistente al proceso de conversión de genes como se describe por Samulski y otros, (1983) Cell 33:135. La conversión génica en la TR no resoluble restaurará el sitio *srt*, que generará una TR resoluble y resultará en un aumento en la frecuencia de productos de replicación monomérica. La conversión génica resulta de la recombinación homóloga entre la TR resoluble y la TR alterada.

20 Una estrategia para reducir la conversión génica es producir virus usando una línea celular (preferentemente, mamífero) que es defectuosa en la reparación del ADN, como se conoce en la técnica, ya que estas líneas celulares se deteriorarán en su capacidad para corregir las mutaciones introducidas en la plantilla viral.

25 Alternativamente, plantillas que tienen una tasa sustancialmente reducida de conversión génica se pueden generar introduciendo una región de no homología en la TR no resoluble. La no homología en la región que rodea el elemento *trs* entre la TR no resoluble y la TR inalterada en la plantilla reducirá o incluso eliminará sustancialmente la conversión génica.

30 Cualquier inserción o delección adecuada puede introducirse en la TR no resoluble para generar una región de no homología, siempre y cuando la conversión génica se reduce o elimina sustancialmente. Se prefieren las estrategias que emplean delecciones para crear no homología. Se prefiere más aun que la delección indebidamente no perjudique la replicación y empaque de la plantilla. En el caso de una delección, la misma delección puede ser suficiente para deteriorar la resolución del sitio *srt*, así como para reducir la conversión génica.

35 Como una alternativa adicional, la conversión génica puede reducirse por inserciones en la TR no resoluble o, alternativamente, en el elemento A entre RBE y el sitio *srt*. La inserción es típicamente al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20 o 30 nucleótidos o más nucleótidos de longitud. No existe límite superior particular para el tamaño de la secuencia insertada, que puede ser tan larga como 50, 100, 200 o 500 nucleótidos o más larga, sin embargo, se prefiere que la inserción no deteriore indebidamente la replicación y empaque de la plantilla.

40 En modalidades alternativas, la TR no resoluble puede ser una TR de origen natural (o forma alterada de esta) que es no resoluble bajo las condiciones usadas. Por ejemplo, la TR no resoluble puede no ser reconocida por las proteínas Rep usadas para producir el vADN a partir de la plantilla. Para ilustrar, la TR no resoluble puede ser una secuencia de parvovirus autónoma que no se reconoce por las proteínas Rep de AAV. Como un otro ejemplo ilustrativo, la TR resoluble y proteínas Rep pueden ser de un serotipo de AAV (*por ejemplo*, AAV2), y la TR no resoluble será de otro serotipo AAV (*por ejemplo*, AAV5) que no es reconocido por las proteínas Rep de AAV2.

45 Aún como una alternativa adicional, la secuencia no resoluble puede ser cualquier secuencia de repetición invertida que forma una estructura en horquilla y no se puede escindir por las proteínas Rep.

50 Todavía como una alternativa adicional, una plantilla del tamaño de medio-genoma se puede usar para producir una partícula de parvovirus que porta un vADN duplicado, producido a partir de una plantilla de tamaño medio-genoma, como se describe en los ejemplos en la presente descripción y por Hirata & Russell, (2000) J. Virology 74:4612. Este informe describe el empaque de monómeros apareadas e intermedios RF transitorios cuando los genomas de AAV se redujeron a menos de la mitad del tamaño del genoma del AAV silvestre (<2.5 kb). Estos investigadores encontraron que los genomas monoméricos fueron el sustrato preferido para la corrección génica por recombinación homóloga, y que los genomas duplicados funcionaron menos bien que lo hicieron los genomas monoméricos en este ensayo. Este informe no investigó o sugirió el uso de los genomas duplicados como vectores para el suministro de genes.

Preferentemente, de acuerdo con esta modalidad, la plantilla será aproximadamente la mitad del tamaño del vADN que puede ser empacado por la cápsida del parvovirus. Por ejemplo, para una cápsida de AAV, la plantilla es preferentemente aproximadamente la mitad del genoma de VAA silvestre, como se describió anteriormente.

5 La plantilla (como se describió anteriormente) se replica para producir un genome del vector duplicado (vDNA) de la invención, que es capaz de formar un ADN bicatenario, bajo condiciones adecuadas. La molécula duplicada es sustancialmente auto complementaria de manera de ser capaz de formar un ADN viral bicatenario (*por ejemplo*, al menos 90 % , 95 % , 98 % , 99 % de complementariedad de la secuencia de nucleótidos o más). El apareamiento de bases entre bases de nucleótidos individuales o secuencias de polinucleótidos se comprende bien en la técnica. Preferentemente, el ADN viral de parvovirus duplicado es esencialmente completamente auto-complementario (*es decir*, no contiene o contiene un número insignificante de bases no coincidentes). Particularmente, se prefiere que la(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) (*por ejemplo*, las secuencias que se transcriben en la célula) sean esencialmente completamente auto-complementarias.

10 15 En general, los parvovirus duplicados pueden contener no-complementariedad en la medida que la expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) a partir del vector de parvovirus duplicado es más eficiente que la de un vector monomérico correspondiente.

20 25 Los parvovirus duplicados de la presente invención proporcionan la célula huésped con una molécula bicatenaria que direcciona uno de los inconvenientes de los vectores de rAAV, es decir, la necesidad de la célula huésped de convertir el vADN de rAAV monocatenario en un ADN bicatenario. La presencia de cualquiera de las regiones importantes de no-complementariedad dentro del ADN del virión, en particular, dentro de la(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) será reconocida probablemente por la célula huésped, y dará lugar a mecanismos de reparación del ADN que se reclutan para corregir las bases no coincidentes, contrarrestando así las características ventajosas de los vectores de parvovirus duplicados, *por ejemplo*, los vectores de la invención reducen o eliminan la necesidad de la célula huésped de procesar la plantilla viral.

Producción de vectores de parvovirus duplicados.

30 35 En general, los métodos para producir los vectores de AAV son aplicables a la producción de vectores de parvovirus duplicado de la invención; la principal diferencia entre los métodos es la estructura de la plantilla o sustrato que se empaqueta. Para producir un vector de parvovirus duplicado de acuerdo con la presente invención, se usará una plantilla como se describió anteriormente para producir el genoma viral encapsidado.

40 45 La plantilla descrita anteriormente es preferentemente un sustrato de ADN y puede proporcionarse en cualquier forma conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o un vector viral (*por ejemplo*, vectores de adenovirus, herpesvirus, virus Epstein-Barr, AAV, baculovirus, retrovirales, y similares). Alternativamente, la plantilla puede incorporarse establemente en el genoma de una célula de empaque.

50 55 En una modalidad particular, los vectores de parvovirus de la invención pueden portar vADN monomérico duplicado del tamaño de la mitad del genoma como se describe en los ejemplos de la presente descripción. Este medio para proporcionar células con un ADN virión de parvovirus duplicado (*por ejemplo*, AAV) toma ventaja del modo de replicación en horquilla rodante en la cual se genera el vADN monomérico a partir de los intermedios de repetición invertida dimérica (Cavalier-Smith y otros, (1974) Nature 250:467; Straus y otros, (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 73:742). Cuando el genoma es suficientemente pequeño, las repeticiones invertidas diméricas en sí pueden ser encapsidadas dentro del virión. Este enfoque generará una población mixta de moléculas monoméricas y diméricas. Los vectores de parvovirus duplicados pueden aislarse mediante técnicas conocidas, *por ejemplo*, separación en un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Las partículas de parvovirus duplicado de acuerdo con la invención se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica, *por ejemplo*, mediante la introducción de la plantilla a ser replicada y empacada en una célula permisiva o de empaque, tal como estos términos se entienden en la técnica (*por ejemplo*, una célula "permisiva" se puede infectar o transducir por el virus; una célula "de empaque" es una célula transformada de manera estable que proporciona funciones helper).

En una modalidad, un método para producir una partícula de parvovirus duplicado, que comprende: proporcionar a una célula permisiva para la replicación de parvovirus (a) una secuencia de nucleótidos que codifican una plantilla para producir el genoma del vector de la invención (como se describió en detalle anteriormente); (b) secuencias de nucleótidos suficientes para replicación de la plantilla que produce un genoma del vector; (c) secuencias de nucleótidos suficientes para empaquetar el genoma del vector en una cápsida de parvovirus, bajo condiciones suficientes para la replicación y el empaque del genoma del vector en la cápsida de parvovirus, por lo que partículas de parvovirus duplicado que comprenden el genoma del vector encapsidado dentro de la cápsida del parvovirus se producen en la célula. Preferentemente, las secuencias de codificación de la replicación y/o cápsida de parvovirus son secuencias de AAV.

Cualquier método para introducir la secuencia de nucleótidos que llevan la plantilla dentro de un huésped celular para replicación y empaque se puede emplear, incluyendo, pero sin limitarse a, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos y liposomas en conjunto con una señal de localización nuclear. En modalidades en donde la plantilla se proporciona por un vector viral, se pueden usar los métodos estándar para la producción de la infección viral.

Cualquier célula permisiva o de empaque adecuada conocida en la técnica se puede emplear para producir los vectores duplicados. Las células de mamífero son preferidas. Se prefieren además líneas celulares de empaque trans-complementación que proporcionan funciones suprimidas de un virus helper defectuoso en la replicación, *por ejemplo*, células 293 u otras células de trans-complementación E1. Se prefieren además células de mamífero o líneas celulares que son defectuosas para la reparación del ADN como es conocido en la técnica, ya que estas líneas celulares se perjudicarán en su capacidad para corregir las mutaciones introducidas en la plantilla viral.

La plantilla puede contener algunos o todos los genes cap y rep de parvovirus (*por ejemplo*, AAV). Preferentemente, sin embargo, algunas o todas las funciones de cap y rep se proporcionan *en trans* mediante la introducción de un(os) vector(es) de empaque que codifica(n) la cápsida y/o proteínas Rep en la célula. Con la máxima preferencia, la plantilla no codifica la cápsida o proteínas Rep. Alternativamente, se usa una línea de células de empaque que se transforma establemente para expresar los genes cap y/o rep (ver, *por ejemplo*, Gao y otros, (1998) Human Gene Therapy 9:2353; Inoue y otros, (1998) J. Virol. 72:7024; patente de los Estados Unidos núm. 5,837,484; WO 98/27207; patente de los Estados Unidos núm. 5,658,785; WO 96/17947).

Adicionalmente, las funciones de virus helper se proporcionan preferentemente para el vector que propaga nuevas partículas de virus. Tanto los adenovirus como el virus de herpes simple pueden servir como virus helper de AAV. Ver, *por ejemplo*, BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ra ed., Lippincott-Raven Publishers). Los virus helper ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, Herpes simple (HSV) varicela zoster, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr. La multiplicidad de infección (MOI) y la duración de la infección dependerán del tipo de virus usado y de la línea de células de empaque empleada. Cualquier vector helper adecuado puede emplearse. Preferentemente, el(los) vector(es) helper es un plásmido, por ejemplo, como es descrito por Xiao y otros, (1998) J. Virology 72:2224. El vector puede introducirse en la célula de empaque por cualquier método adecuado conocido en la técnica, como se describió anteriormente.

En un método, los vectores de parvovirus duplicados de la invención pueden producirse por co-transfección de un vector rep/cap que codifica funciones de empaque de AAV y la plantilla que codifica el vADN de AAV en las células humanas infectadas con adenovirus (Samulski y otros, (1989) J. Virology 63:3822). Bajo condiciones optimizadas, este procedimiento puede producir hasta 10^9 unidades infecciosas de partículas virales por ml. Una desventaja de este método, sin embargo, es que resulta en la co-producción de adenovirus silvestres contaminantes. Ya que se conoce que varias proteínas de adenovirus (*por ejemplo*, fibra, hexón, etc.) producen una respuesta inmune a los linfocitos T citotóxicos (CTL) en humanos (Yang y Wilson, (1995) J. Immunol. 155:2564; Yang y otros, (1995) J. Virology 69:2004; Yang y otros, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:4407), esto representa una desventaja significativa cuando se usan estas preparaciones de rAAV (Monahan y otros, (1998) Gene Therapy 5:40).

Las materias primas de vectores libres de virus helper contaminantes pueden obtenerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los virus duplicado y virus helper pueden diferenciarse fácilmente basado en el tamaño. El virus duplicado puede separarse además del virus helper basado en la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin y otros (1999) Gene Therapy 6:973). Preferentemente, los virus helper delecionados defectuosos en la replicación se usan tal que

cualquier virus helper contaminante no es competente para la replicación. Como una alternativa adicional, un adenovirus helper que carece de expresión génica tardía puede emplearse, cuando sólo se requiera de la expresión génica temprana de adenovirus para mediar el empaque del virus duplicado. Los mutantes de adenovirus defectuosos para la expresión génica tardía se conocen en la técnica (*por ejemplo*, mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

Un método preferido para proporcionar funciones helper emplea un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que porta todos los genes helper necesarios para la producción eficiente de AAV (Ferrari y otros, (1997) Nature Med. 3:1295; Xiao y otros, (1998) J. Virology 72:2224). Los títulos rAAV obtenidos con los miniplásmidos de adenovirus son cuarenta veces más altos que los obtenidos con los métodos convencionales de infección por adenovirus silvestre (Xiao y otros, (1998) J. Virology 72:2224). Este enfoque evita la necesidad de realizar co-transfecciones con adenovirus (Holscher y otros, (1994), J. Virology 68:7169; Clark y otros, (1995) Hum. Gene Ther. 6:1329; Trempe y Yang, (1993), en, Quinto Workshop de Parvovirus, Crystal River, FL).

Otros métodos para producir materia prima de rAAV se describieron, incluyendo pero sin limitarse a, los métodos que dividen los genes *rep* y *cap* en casetes de expresión separados para evitar la generación de AAV competente en la replicación. (*ver, por ejemplo*, Allen y otros, (1997) J. Virol. 71:6816), métodos que emplean líneas de células de empaque (*ver, por ejemplo*, Gao y otros, (1998) Human Gene Therapy 9:2353; Inoue y otros, (1998) J. Virol. 72:7024; patente de los Estados Unidos núm. 5,837,484; WO 98/27207; patente de los Estados Unidos núm. 5,658,785; WO 96/17947), y otros sistemas libres de virus helper (*ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos núm. 5,945,335 de Colosi).

Los herpesvirus pueden ser usados además como un virus helper en los métodos de empaque de AAV. Los herpesvirus híbridos que codifican la(s) proteína(s) Rep de AAV pueden facilitarse favorablemente para esquemas de producción más escalables de vectores AAV. Un vector híbrido de virus herpes simple tipo I (HSV -1) que expresa los genes *rep* y *cap* de AAV-2 se describió (Conway y otros, (1999) Gene Therapy 6:986 y WO 00/17377).

En resumen, la plantilla viral que se replica y empaqueta, los genes *cap* de parvovirus, genes *rep* de parvovirus adecuados, y (preferentemente) funciones helper se proporcionan a una célula (*por ejemplo*, una célula permisiva o de empaque) para producir partículas de parvovirus que portan el genoma duplicado (*es decir*, el genoma es capaz de formar un ADN "recuperado" o auto-complementario después del desnudamiento viral). La expresión combinada de los genes *rep* y *cap* codificados por la plantilla y/o el (los) vector(es) de empaque y/o la célula de empaque transformada de forma estable resulta en la producción de una partícula de parvovirus en la que una cápsida del parvovirus empaqueta un genoma de parvovirus duplicado de acuerdo con la invención. Las partículas de parvovirus duplicados se les permiten ensamblar dentro de la célula, y pueden recuperarse después por cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

Alternativamente, pueden usarse además enfoques de empaque *in vitro*, como se conocen en la técnica, para producir las plantillas de vADN diméricos descritos en la presente. Para ilustrar, la secuencia de vADN duplicado puede amplificarse en bacterias usando el fago M13 monocatenario. Las TR resolvibles en cada extremo del vADN portado por el M13 se hibridarán para formar una secuencia bicatenaria, que puede escindirse con una enzima de restricción adecuada para escindir el vADN dimérico de la cadena principal de M13. Aún como una alternativa adicional, la PCR u otras técnicas de amplificación adecuadas pueden usarse para amplificar la secuencia vADN duplicada a partir de una plantilla auto-complementaria dimérica, como se describió anteriormente.

Los reactivos y métodos descritos en la presente pueden emplearse para producir materia prima de altos títulos de los vectores de parvovirus de la invención, preferentemente esencialmente en títulos del silvestre. Se prefiere además que la materia prima de parvovirus tenga un título de al menos aproximadamente 10^5 unidades de transducción (tu)/ml, con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^6 tu/ml, con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^7 tu/ml, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^8 tu/ml, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^9 tu/ml, todavía con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^{10} tu/ml, y aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 10^{11} tu/ml, o más.

Alternativamente se declara que, la materia prima de parvovirus tiene preferentemente un título de al menos aproximadamente 1 tu/célula, con mayor preferencia al menos aproximadamente 5 tu/célula, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 20 tu/célula, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 tu/célula, aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 100 tu/célula, con mayor preferencia aún al menos aproximadamente 250 tu/célula, con la máxima preferencia al menos aproximadamente 500 tu/célula, o incluso más.

Adicionalmente, los vectores de parvovirus duplicado de la invención, pueden tener una relación mejorada de unidad de transducción (tu)/partícula sobre los vectores de parvovirus convencionales. Preferentemente, la relación tu/partícula es menor que aproximadamente 50:1, menor que aproximadamente 20:1, menor que aproximadamente 15:1, menor que aproximadamente 10:1, menor que aproximadamente 8:1, menor que aproximadamente 7:1, menor que aproximadamente 6:1, menor que aproximadamente 5:1, menor que aproximadamente 4:1, o inferior. No existe un límite inferior particular para la relación tu/partícula. Típicamente, la relación tu/partícula será mayor que aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1 o 4:1.

Aplicaciones de la presente invención.

Un aspecto adicional de la invención es un método para suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula usando los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente descripción. El vector puede suministrarse a una célula *in vitro* o a un sujeto *in vivo* por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Alternativamente, el vector puede suministrarse a una célula *ex vivo*, y la administrar la célula a un sujeto, como se conoce en la técnica.

Los presentes métodos pueden emplearse favorablemente para proporcionar la transducción más eficaz de células objetivo que los vectores AAV silvestre. Para ilustrar, los vectores de parvovirus duplicados se pueden transducir a una velocidad mayor que los vectores AAV silvestre. Alternativamente, o además, los vectores de parvovirus duplicados pueden proporcionar un inicio más rápido de la expresión transgénica, un nivel superior de expresión transgénica, y/o una persistencia más larga de expresión transgénica que los vectores AAV.

Los vectores de parvovirus duplicados y métodos de la invención pueden encontrar uso además en los métodos para administrar una secuencia de nucleótidos a una célula que es típicamente no permisiva para la transducción con AAV, o se transduce sólo de forma ineficiente con AAV. Las células ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a células dendríticas, tipos particulares de cáncer o células tumorales, astrocitos, y células madre de médula ósea. Además, los métodos descritos en la presente pueden practicarse favorablemente con células no replicantes o lentamente replicantes que sólo apoyan ineficientemente la síntesis de la segunda cadena de AAV, tales como el hígado, sistema nervioso central (*por ejemplo*, cerebro), y en particular las poblaciones de células dentro del músculo (*por ejemplo*, fibras de contracción rápida).

En consecuencia, los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente pueden tener un intervalo de células objetivo distintas (*por ejemplo*, un intervalo más amplio de células objetivo) en comparación con los vectores rAAV. Aunque no se desea hacer cumplir cualquier teoría particular de la invención, parece que las células que son refractarias a la transducción por rAAV pueden ser permisivas para los vectores de parvovirus duplicados de la invención, que proporcionan una molécula bicatenaria a la célula huésped. Así, la presente invención encuentra uso para el suministro de una secuencia de nucleótidos a una célula que no es permisiva para vectores rAAV convencionales o sólo escasamente transducidos por los vectores rAAV, porque no pueden soportar eficazmente la síntesis de la segunda cadena del ADN viral.

Una de las características de los vectores AAV silvestre es el período de latencia prolongado antes de observarse la expresión transgénica de alto nivel. Los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente pueden proporcionar un sistema de suministro de genes más rápido y agresivo que los vectores de AAV silvestre porque obvian la etapa de síntesis de la cadena complementaria.

En consecuencia, los vectores de parvovirus duplicados de la invención encuentran uso en los métodos para tratar el cáncer o tumores, *por ejemplo*, mediante el suministro de agentes contra el cáncer o antígenos de cáncer. En modalidades particulares, los métodos de la invención se usan para administrar agentes contra el cáncer o antígenos de cáncer para evitar metástasis, *por ejemplo*, a continuación de la extirpación quirúrgica de un tumor primario.

Los métodos y vectores de parvovirus duplicados de la invención pueden usarse favorablemente además en el tratamiento de individuos con trastornos metabólicos (*por ejemplo*, deficiencia de ornitina transcarbamilasa). Tales trastornos requieren típicamente un inicio relativamente rápido de la expresión de un polipéptido terapéutico por el vector de suministro de genes. Aún como una alternativa adicional, los vectores de la invención pueden administrarse para proporcionar agentes que mejoran la supervivencia del trasplante (*por ejemplo*, superóxido dismutasa) o combatir la sepsis.

Además, los inventores encontraron que las células dendríticas (DC), que son refractarias a vectores AAV silvestre (Jooss y otros, (1998) 72: 4212), son permisivas para los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente. En

consecuencia, aún como un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para suministrar una secuencia de nucleótidos a DC, *por ejemplo*, para inducir una respuesta inmune a un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos codifica un antígeno de un agente infeccioso o un antígeno de cáncer.

5

Aún como un aspecto adicional, la presente invención puede emplearse para suministrar una secuencia de nucleótidos heteróloga en situaciones en las que es deseable regular el nivel de expresión transgénica (*por ejemplo*, transgenes que codifican hormonas o factores de crecimiento, como se describe más abajo). El inicio más rápido de la expresión transgénica por los vectores de parvovirus duplicados descritos en la presente hacen este vehículo de suministro de genes más susceptible a tales regímenes de tratamiento que son vectores rAAV.

10

Cualquier secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s) (como se definió anteriormente) puede suministrarse de acuerdo con la presente invención. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, preferentemente polipéptidos terapéuticos (*por ejemplo*, para uso médico o veterinario) o inmunogénicos (*por ejemplo*, para vacunas).

15

Un "polipéptido terapéutico" es un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un "polipéptido terapéutico" es uno que de cualquier otra forma confiere un beneficio a un sujeto, *por ejemplo*, efectos contra el cáncer o mejoría en la supervivencia del trasplante.

20

Preferentemente, la o las secuencias de nucleótidos heterólogas típicamente serán menores que aproximadamente 2.5 kb de longitud (con mayor preferencia menor que aproximadamente 2.4 kb, aún con mayor preferencia menor que aproximadamente 2.2 kb, aún con mayor preferencia menor que aproximadamente 2.0 kb de longitud) para facilitar el empaque de la plantilla duplicada por la cápsida de parvovirus (*por ejemplo*, AAV). Las secuencias de nucleótidos ilustrativas codifican el Factor IX, Factor X, enzimas lisosomales (*por ejemplo*, hexosaminidasa A, asociada con la enfermedad de Tay-Sachs, o iduronato sulfatasa, asociada con el síndrome de Hunter/MPS II), eritropoyetina, angiostatina, endostatina, superóxido dismutasa, globina, leptina, catalasa, tirosina hidroxilasa, así como también citocinas (*por ejemplo*, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos, linfotoxina, y similares), factor de crecimiento peptídicos y hormonas (*por ejemplo*, somatotropina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de nervios, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico derivado de la glía, factor α y β de crecimiento transformante, y similares), receptores (*por ejemplo*, factor de necrosis tumoral receptor). En otras modalidades ilustrativas, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica anticuerpos monoclonales de preferencia un anticuerpo monoclonal de una sola cadena o un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno tumoral o cáncer (*por ejemplo*, HER2/neu, y como se describe más abajo). Otras secuencias de nucleótidos heterólogas ilustrativas codifican los productos de gen suicida (timidina quinasa, citosina deaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, deoxicitidina cinasa, y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco usado en la terapia contra el cáncer, y producto génico supresor de tumores.

25

30

35

40

Una alternativa adicional, la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar un polipéptido reportero (*por ejemplo*, una enzima tal como la proteína fluorescente verde, fosfatasa alcalina).

45

Alternativamente, en modalidades particulares de la invención, el ácido nucleico de interés puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (*por ejemplo*, como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5,877,022), ARNs que efectúan el corte y empalme en *trans* mediado por el empalmosoma (ver, Puttaraju y otros, (1999) Nature Biotech. 17:246; patente de los Estados Unidos núm. 6,013,487; patente de los Estados Unidos núm. 6,083,702), ARN de interferencia (iARN.) que median el silenciamiento génico (ver, Sharp y otros, (2000) Science 287:2431) u otros ARN no traducidos, tales como los ARN "guía" (Gorman y otros, (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929; patente de los Estados Unidos núm. 5,869,248 de Yuan y otros.), y similares.

50

El vector de parvovirus puede codificar además una secuencia de nucleótidos heteróloga que comparte homología con y se recombina con un locus en el cromosoma huésped. Este enfoque se puede utilizar para corregir un defecto genético en la célula huésped.

55

La presente invención puede usarse además para expresar un polipéptido inmunogénico en un sujeto, *por ejemplo*, para vacunación. El ácido nucleico puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica, que incluye, pero sin

limitarse a, inmunogenes del virus de inmunodeficiencia humana, virus de la influenza, proteínas gag, antígenos tumorales, antígenos cancerígenos, antígenos bacterianos, antígenos virales, y similares.

5 El uso de parvovirus como vacunas se conoce en la técnica (*ver, por ejemplo*, Miyamura y otros, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:8507; patente de los Estados Unidos núm. 5,916,563 de Young y otros, 5,905,040 de Mazzara y otros, patente de los Estados Unidos núm. 5,882,652, patente de los Estados Unidos núm. 5,863,541 de Samulski y otros

10 El antígeno puede presentarse en la cápsida del parvovirus. Alternativamente, el antígeno puede expresarse a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma del vector recombinante. Cualquier inmunógeno de interés puede proporcionarse por el vector de parvovirus. Los inmunógenos de interés son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la influenza, proteínas gag, antígenos tumorales, antígenos de cáncer, antígenos bacterianos, antígenos virales, y similares

15 Un polipéptido inmunogénico, o inmunógeno, puede ser cualquier polipéptido adecuado para proteger al sujeto contra una enfermedad, que incluye, pero sin limitarse a, enfermedades microbianas, bacterianas, protozoáricas, parasíticas, y virales. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus de la influenza, tales como la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la influenza o el gen de nucleoproteína del virus de la influenza, o un inmunógeno del virus de la influenza equina), o un inmunógeno de lentivirus (*por ejemplo*, un
20 inmunógeno del virus de la anemia infecciosa equina, un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), o un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), tal como la proteína de envoltura GP160 del HIV o VIS, proteínas de la matriz/cápsida de HIV o SIV, y los productos génicos de gag, pol y env de HIV o SIV). El inmunógeno puede ser además un inmunógeno de arenavirus (*por ejemplo*, inmunógeno del virus de la fiebre de Lassa, tal como el gen de la proteína de la nucleocápsida del virus de la fiebre de Lassa el gen de la glicoproteína de envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno del poxvirus (*por ejemplo*, vaccinia, tal como genes L1 o L8 de vaccinia), un inmunógeno de flavivirus (*por ejemplo*, un
25 inmunógeno del virus de la fiebre amarilla o un inmunógeno del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus del Ebola, o un inmunógeno del virus de Marburg, tales como los genes NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (*por ejemplo*, virus RVFV, CCHF, y SFS), o un inmunógeno del virus corona (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus corona infeccioso humano, tal como el gen de glicoproteína de envoltura del virus corona humano, o un inmunógeno del virus de gastroenteritis transmisible porcino, o un inmunógeno del virus de la bronquitis infecciosa aviar). El inmunógeno puede ser además un inmunógeno de la polio, antígeno del herpes (*por ejemplo*, inmunógenos CMV, EBV, HSV) inmunógeno de las paperas, inmunógeno del sarampión, inmunógeno de la rubeola, toxina de la difteria u otro
30 inmunógeno de la difteria, antígeno pertussis, inmunógeno de la hepatitis (*por ejemplo*, hepatitis A o hepatitis B), cualquier otro inmunógeno de vacunas que se conocen en la técnica.

35 Alternativamente, el inmunógeno puede ser cualquier antígeno de célula de cáncer o tumor. Preferentemente, el antígeno de tumor o cáncer se expresa en la superficie de la célula del cáncer. Los antígenos de célula de cáncer o tumor ilustrativos se describen en S.A. Rosenberg, (1999) Immunity 10:281). Otros antígenos de cáncer o tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a: producto génico BRCA1, producto génico BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4., β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPV E, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami y otros, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515); Kawakami y otros, (1994) J. Exp. Med., 180:347); Kawakami y otros, (1994) Cancer Res. 54:3124), que incluyen MART-1 (Coulie y otros, (1991) J. Exp. Med 180:35), gp100 (Wick y otros, (1988) J. Cutan. Pathol. 4:201) y el antígeno de MAGE, MAGE-1, MAGE-2 y MAGE-3 (Van der Bruggen y otros, (1991) Science, 254:1643); CEA, TRP-1, TRP-2, P-15 y tirosinasa (Brichard y otros, (1993) J. Exp. Med 178:489); producto génico HER-2/neu (patente de los EE.UU. núm. 4,968,603), CA 125, LK26, FB5 (endosialina), TAG 72, AFP, CA19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG, STN (Antígeno sialil Tn), c-erbB-2 proteínas, PSA, L-CanAg, receptor de estrógeno, globulina de la grasa de la leche, proteína p53 supresora de tumores (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:623); antígenos de mucina (publicación internacional de patente WO 90/05142); telomerasas; proteínas de matriz nuclear; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y antígenos asociados con los siguientes cánceres: melanomas, metástasis, adenocarcinoma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma de no Hodgkins, linfoma de Hodgkins, leucemias, cáncer uterino, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas y otros (*ver, por ejemplo*, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med 47:481-91).

Alternativamente, la secuencia de nucleótido heteróloga puede codificar cualquier polipéptido que se produce de manera

deseable en una célula *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores de la invención pueden introducirse en las células cultivadas y el producto génico expresado aislarse del mismo.

5 Se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la (s) secuencia (s) de nucleótido (s) heteróloga (s) de interés pueden asociarse operativamente con secuencias de control adecuadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede asociarse operativamente con elementos de control de la expresión, tales como señales de control de la transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación y sitios de entrada de ribosoma interno (IRES), promotores, potenciadores, y similares.

10 Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que una variedad de elementos promotores/potenciadores puede usarse dependiendo del nivel y expresión específica de tejido deseada. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser nativo o extraño y puede ser una secuencia natural o una sintética. Por extraño, se pretende que la región de iniciación transcripcional no se encuentra en el huésped silvestre en el que se introduce la región de iniciación transcripcional.

15 Los elementos promotores/potenciadores que son nativos a la célula objetivo o sujeto que se trata son los más preferidos. Son preferidos además los elementos promotores/potenciadores que son nativos a la secuencia de ácido nucleico heteróloga. El elemento promotor/potenciador se elige de manera que funcionará en la(s) célula (s) objetivo (s) de interés, se prefieren además los elementos promotores/potenciadores de mamíferos. El elemento promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible.

20 Los elementos de control de la expresión inducible se prefieren en aquellas aplicaciones en las que se prefiere proporcionar la regulación sobre la expresión de la secuencia(s) de ácido nucleico heteróloga (s). Los elementos promotores/potenciadores inducibles para el suministro de genes son preferentemente elementos promotores/potenciadores tejido específico, e incluyen elementos promotores/potenciadores específico al músculo (que incluyen músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específico al tejido neural (que incluyen específico al cerebro), específico al hígado, específico a la médula ósea, específico pancreático, específico al bazo, específico a la retina, y específico a pulmón. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles a hormonas e inducibles a metales. Los elementos promotores/potenciadores inducibles ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, un elemento Tet on/off un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina y un promotor de metalotioneína

25 En modalidades de la invención en el que la (s) secuencia (s) de ácido nucleico heteróloga (s) se transcribirá (n) y traducirá (n) después en las células objetivo, las señales específicas de iniciación se necesitan generalmente para la traducción eficaz de las secuencias codificadoras de la proteína insertada. Estas secuencias exógenas de control de la traducción, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto natural como sintético.

30 Como una ventaja adicional, los vectores de parvovirus duplicados de la invención pueden distinguirse de los vectores rAAV en que la orientación de la secuencia codificante con respecto a la TR resoluble se fija y puede controlarse. Así, por ejemplo, la orientación y expresión del transgén puede controlarse con respecto a los elementos de control transcripcional putativo dentro de la TRT resoluble. Además, el control sobre la orientación del transgén con respecto a la TR no resoluble puede proporcionar un mayor nivel de control sobre los productos de recombinación entre los genomas de vectores co-infectantes. Si bien el extremo cerrado del genoma (*es decir*, cerca de TR no resoluble) o el extremo abierto es un sustrato preferido para la recombinación intermolecular, la orientación de la secuencia codificante dentro del producto de recombinación puede predecirse y controlarse.

35 Por último, a diferencia de los vectores rAAV, los vectores de parvovirus duplicados de la presente invención son uniformes en que co-empacan en una sola molécula tanto las más como menos cadenas. Esta característica es deseable desde el punto de vista para producir un reactivo de grado clínico consistente.

40 Tecnología de transferencia de genes.

45 Los métodos de la presente invención proporcionan además un medio para suministrar secuencias de nucleótidos heterólogas en una amplia variedad de células, que incluyen células que se dividen como que no se dividen. La presente invención puede emplearse para suministrar una secuencia de nucleótidos de interés a la célula *in vitro*, *por ejemplo*, para

5 producir un polipéptido *in vitro* o para la terapia génica *ex vivo*. Las células, formulaciones farmacéuticas y métodos de la presente invención son además útiles en un método para entregar una secuencia de nucleótido a un sujeto que lo necesita *por ejemplo*, para expresar un polipéptido inmunogénico o terapéutico. De esta manera, el polipéptido puede producirse así *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede estar en necesidad del polipéptido porque el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido, o porque la producción del polipéptido en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como un método de tratamiento de cualquier otra forma, y como se explica más abajo.

10 Generalmente, la presente invención puede emplearse para suministrar cualquier ácido nucleico extraño con un efecto biológico para tratar o mejorar los síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Los estados de enfermedad ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a: fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (*por ejemplo*, Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, enfermedad de almacenamiento de glucógenos y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo), enfermedades de los órganos sólidos (*por ejemplo*, cerebro, hígado, riñón, corazón), y similares.

20 La transferencia génica tiene uso potencial sustancial para comprender y proporcionar terapia para estados de enfermedad. Existe una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen los genes defectuosos y se han clonados. Generalmente, los estados patológicos anteriores se dividen en dos clases: estados de deficiencia, por lo general de enzimas, que generalmente se heredan de manera recesiva, y los estados de desequilibrio, que pueden implicar proteínas reguladoras o estructurales, y que típicamente se heredan de una manera dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, la transferencia génica podría usarse para introducir un gen normal en los tejidos afectados para la terapia de sustitución, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Para los estados de enfermedad desequilibradas, la transferencia génica podría usarse para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que podría usarse después en esfuerzos para contrarrestar el estado de la enfermedad. Así los métodos de la presente invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Como se usa en la presente, un estado de enfermedad se trata remediando parcialmente o totalmente la deficiencia o desequilibrio que causa la enfermedad o la hace más grave. Es posible además el uso de recombinación sitio específica de secuencias de nucleicos para causar mutaciones o corregir defectos.

35 La presente invención puede emplearse además para proporcionar un ácido nucleico antisentido a la célula *in vitro* o *in vivo*. La expresión del ácido nucleico antisentido en la célula objetivo disminuye la expresión de una proteína particular por la célula. En consecuencia, pueden administrarse ácidos nucleicos antisentido para disminuir la expresión de una proteína particular en un sujeto que lo necesita. Los ácidos nucleicos antisentido pueden administrarse además a las células *in vitro* para regular la fisiología celular, *por ejemplo*, para optimizar el sistema de cultivo celular o de tejidos.

40 Por último, la presente invención encuentra además uso en métodos de diagnóstico y tamizaje, de manera que un gen de interés se expresa transitoriamente o establemente en un sistema de cultivo celular, o alternativamente, un modelo de animal transgénico.

45 Generalmente, la presente invención puede emplearse para suministrar cualquier ácido nucleico heterólogo a una célula *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

Sujetos, Formulaciones farmacéuticas, Vacunas, y Modos de Administración.

50 La presente invención encuentra uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados para los métodos de suministro de genes *ex vivo* como se describió anteriormente incluyen aves y mamíferos, y los mamíferos son los preferidos. El término "aviar" como se usa en la presente incluye, pero sin limitarse a, gallinas, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "mamífero" como se usa en la presente incluye, pero sin limitarse a, humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos son los más preferidos. Los sujetos humanos incluyen neonatos, infantes, jóvenes, y adultos.

55 En modalidades particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y/u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos,

portadores, adyuvantes, diluyentes, etc. Para inyección, el portador será por lo general un líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido. Para administración por inhalación, el portador será respirable, y preferentemente estará en forma de partículas sólida o líquidas. Como un medio de inyección, se prefiere usar agua que contiene los aditivos usuales para las soluciones de inyección, tal como agentes estabilizantes, sales o solución salina, y/o amortiguadores.

Generalmente, un "portador fisiológicamente aceptable" es uno que no es tóxico o perjudicial para las células indebidamente. Los portadores fisiológicamente aceptables ilustrativos incluyen agua libre de pirógeno, estéril y solución salina regulada con fosfato libre de pirógeno, estéril. Los portadores fisiológicamente aceptables incluyen portadores farmacéuticamente aceptables.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de cualquier otra forma indeseable, *por ejemplo*, el material puede administrarse a un sujeto sin provocar ningún efecto biológico indeseable. Por lo tanto, dicha composición farmacéutica puede usarse, por ejemplo, para la transfección de una célula *ex vivo* o para administrar una partícula viral o célula directamente a un sujeto.

Los vectores de parvovirus de la invención pueden administrarse para provocar una respuesta inmunogénica (*por ejemplo*, una vacuna). Por lo general, las vacunas de la presente invención comprenden una cantidad inmunogénica de partículas infecciosas virales como se describe en la presente descripción en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de partículas virales infecciosas que sea suficiente para evocar una respuesta inmune en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Típicamente, una cantidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{15} partículas virales, preferentemente aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} , y con mayor preferencia aproximadamente 10^4 a 10^6 partículas virales por dosis es adecuada, dependiendo de la edad y especie del sujeto que se trata, y el inmunógeno contra el cual se desea la respuesta inmune. Los sujetos e inmunógenos son como se describieron anteriormente.

La presente invención proporciona además un método para suministrar un ácido nucleico a una célula. Típicamente, para los métodos *in vitro*, el virus puede introducirse en la célula por métodos de transducción viral estándar, como se conocen en la técnica. Preferentemente, las partículas virales se añaden a las células a la multiplicidad de la infección adecuada de acuerdo con los métodos de transducción estándar adecuados para las células objetivo particulares. Los títulos de virus a administrar pueden variar, dependiendo del tipo de célula objetivo y el vector viral particular, y puede determinarse por aquellos expertos en la técnica sin experimentación indebida.

Los vectores de virus recombinantes se administran preferentemente a la célula en una cantidad biológicamente eficaz. Una "cantidad biológicamente eficaz" del vector viral es una cantidad que es suficiente para resultar en la infección (o transducción) y expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga en la célula. Si el virus se administra a la célula *in vivo* (*por ejemplo*, el virus se administra a un sujeto como se describe más abajo), una "cantidad biológicamente eficaz" del vector viral es una cantidad que es suficiente para resultar en la transducción y expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula objetivo.

La célula a la que se le administra el vector viral de la invención puede ser de cualquier tipo, que incluyen pero sin limitarse a células neurales (que incluyen células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, célula del cerebro), células de los pulmones, células de la retina, células epiteliales (*por ejemplo*, células epiteliales del intestino y de las vías respiratorias), células de los músculos, células dendríticas, células pancreáticas (que incluyen células de los islotes), células hepáticas, células del miocardio, células de huesos (*por ejemplo*, células madres de la médula ósea), células madres hematopoyéticas, células del bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de la próstata, células germinales, y similares. Alternativamente, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como una alternativa adicional, la célula puede ser una célula madre (*por ejemplo*, célula madre neural, célula madre del hígado). Como una alternativa adicional, la célula puede ser una célula de cáncer o tumor. Además, las células pueden ser de cualquier especie de origen, como se indicó anteriormente.

En modalidades particulares de la invención, las células se retiran de un sujeto, el vector del parvovirus se introduce en la misma, y las células se vuelven a colocar de nuevo en el sujeto. Los métodos para extraer células de un sujeto para tratamiento *ex vivo*, seguido por la re-introducción en el sujeto se conocen en la técnica (*ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos núm. 5,399,346).

Alternativamente, el vector rAAV se introduce en las células de otro sujeto, en células cultivadas, o en células a partir de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran a un sujeto que lo necesita.

5 Células adecuadas para la terapia génica *ex vivo* como se describió anteriormente.

10 Las células transducidas con el vector de la invención se administran preferentemente al sujeto en una "cantidad terapéuticamente eficaz" en combinación con un portador farmacéutico. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente es una cantidad que proporciona expresión suficiente de la secuencia de nucleótido heteróloga suministrada por el vector para proporcionar alguna mejora o beneficio al sujeto. Alternativamente se declara, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico en el sujeto. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando algún beneficio se proporciona al sujeto.

15 En modalidades alternativas, las células que se han transducido con un vector de acuerdo con la invención pueden administrarse para provocar una respuesta inmunogénica contra el polipéptido suministrado. Típicamente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad inmunogénica del polipéptido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad del polipéptido expresado que es suficiente para evocar una respuesta activa inmune en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. El grado de protección conferido por la respuesta inmune activa no necesita ser completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja de estos.

20 Las dosificaciones de las células para administrar a un sujeto variará dependiendo de la edad, afección y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que se expresa por la célula, el modo de administración, y similares. Típicamente, al menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 , de preferencia aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células, se administrarán por dosis. Preferentemente, las células se administrarán en una cantidad "terapéuticamente eficaz".

25 Un aspecto adicional de la invención es un método para tratar sujetos *in vivo* con las partículas virales de la invención. La administración de las partículas de parvovirus de la presente invención a un sujeto humano o un animal que lo necesita puede ser por cualquier medio conocido en la técnica para administrar los vectores de virus.

30 Los modos ilustrativos de administración incluyen la administración oral, rectal, transmucosa, tópico, transdérmico, inhalación, parenteral (*por ejemplo*, intravenoso, subcutáneo, intradérmico, intramuscular, e intraarticular), y similares, así como también inyección directa al órgano o tejido, alternativamente inyecciones, intratecal, intramuscular directa, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular. Las soluciones inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el virus de manera local en lugar de una manera sistémica, por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o de depósito.

35 El vector de parvovirus administrado al sujeto puede transducir cualquier célula o tejido permisivo. Las células adecuadas para la transducción por los vectores de parvovirus de la invención se describieron anteriormente.

40 En modalidades particularmente preferidas de la invención, la secuencia de nucleótidos de interés se suministra al hígado del sujeto. La administración al hígado puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a la administración intravenosa, administración intraportal, administración intrabiliar, administración intra-arterial, e inyección directa en el parénquima hepático.

45 En otras modalidades preferidas, las partículas de parvovirus de la invención se administran por vía intramuscular, más preferentemente por inyección intramuscular o por administración local (según se definió anteriormente). El suministro en el cerebro es además preferido. En otras modalidades preferidas, las partículas de parvovirus de la presente invención se administran en los pulmones.

50 Los vectores de parvovirus descritos en la presente pueden administrarse a los pulmones de un sujeto por cualquier medio adecuado, pero se administran preferentemente administrando una suspensión en aerosol de partículas respirables

- 5 compuestas por los vectores de parvovirus de la invención, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores de parvovirus de la invención pueden producirse por cualquier medio adecuado, tales como con un nebulizador de aerosol impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico, como es conocido por aquellos expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos núm. 4,501,729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores de virus de la invención pueden producirse asimismo con cualquier generador de aerosol de medicamento particulado sólido, por técnicas conocidas en la industria farmacéutica.
- 10 Las dosificaciones de las partículas de parvovirus de la invención dependerán del modo de administración, la enfermedad o afección a tratar, la condición del sujeto individual, el vector viral particular, y el gen a suministrar, y puede determinarse de manera rutinaria. Las dosis ilustrativas para alcanzar los efectos terapéuticos son los títulos virales de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^3 , 10^4 , 10^{15} unidades de transducción o más, de preferencia aproximadamente 10^8 - 10^{13} unidades de transducción; aún con mayor preferencia 10^{12} unidades de transducción.
- 15 En modalidades particulares, las partículas de parvovirus de la invención se administran como parte de un método para tratar cáncer o tumores mediante la administración de agentes contra el cáncer (*por ejemplo*, citocinas) o un antígeno de cáncer o tumor. La partícula de parvovirus puede administrarse a una célula *in vitro* o a un sujeto *in vivo* o usando métodos *ex vivo*, como se describe en la presente descripción y se conocen en la técnica.
- 20 El significado del término "cáncer" se comprende en la técnica, por ejemplo, un crecimiento no controlado del tejido que tiene el potencial de diseminarse a sitios distantes del cuerpo (*por ejemplo*, metastatizar). Los cánceres ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, leucemias, linfomas, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, melanoma, y similares. Se prefieren los métodos para tratar y prevenir los tumores formadores de cánceres. El término "tumor" se entiende en la técnica, por ejemplo, como una masa anormal de
- 25 células no diferenciadas dentro de un organismo multicelular. Los tumores pueden ser malignos o benignos. Preferentemente, los métodos de la invención descritos en la presente descripción se usan para prevenir y tratar tumores malignos.
- 30 Los antígenos tumorales y cancerígenos de acuerdo con la presente invención se describieron anteriormente. Por los términos "tratar el cáncer" o "tratamiento del cáncer", se entiende que la gravedad del cáncer se reduce o el cáncer es al menos parcialmente eliminado. Preferentemente, estos términos indican que la metástasis del cáncer se reduce o se elimina al menos parcialmente. Se prefiere adicionalmente que estos términos indiquen que el crecimiento de los nódulos metastásicos (*por ejemplo*, después de la eliminación quirúrgica de un tumor primario) se reduzca o se elimine al menos parcialmente. Por los términos "prevención del cáncer" o "prevenir el cáncer" se entiende que los métodos de la invención
- 35 reducen o se eliminan al menos parcialmente la incidencia o aparición del cáncer. Alternativamente se declara que los presentes métodos ralentizan, controlan, disminuyen la posibilidad o probabilidad, o retardan la aparición de cáncer en el sujeto.
- 40 Igualmente, por los términos "tratar los tumores" o "tratamiento de los tumores", se entiende que la gravedad del tumor se reduce o el tumor se elimina al menos parcialmente. Preferentemente, estos términos significan que la metástasis del tumor se reduce o se elimina al menos parcialmente. Se prefiere además que estos términos indiquen que el crecimiento de los nódulos metastásicos (*por ejemplo*, después de la eliminación quirúrgica de un tumor primario) se reduzca o se elimine al menos parcialmente. Por los términos "prevención de tumores" o "prevenir los tumores" se entiende que los métodos de la invención reducen o eliminan al menos parcialmente la incidencia o aparición de los tumores. Alternativamente se declara
- 45 que los presentes métodos ralentizan, controlan, disminuyen la posibilidad o probabilidad, o retardan la aparición de tumores en el sujeto.
- 50 En otras modalidades, las células pueden eliminarse de un sujeto con cáncer o un tumor y ponerlas en contacto con las partículas de parvovirus de la invención. La célula modificada se administra después al sujeto, de manera que se produzca una respuesta inmune contra el antígeno de cáncer o tumoral. Este método particularmente se emplea de manera favorable con sujetos inmunocomprometidos que no pueden montar una respuesta suficiente inmune *in vivo* (*por ejemplo*, no producen anticuerpos mejoradores en cantidades suficientes).
- 55 Se conoce en la técnica que las respuestas inmunes pueden potenciarse por citocinas inmunomoduladoras (*por ejemplo*, α -interferón, β -interferón, γ -interferón, ω -interferón, τ -interferón, interleucina-1 α , interleucina-1 β , interleucina-2, interleucina-

3, interleucina-4, interleucina 5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, interleucina-9, interleucina-10, interleucina-11, interleucina 12, interleucina-13, interleucina-14, interleucina-18, factor de crecimiento de células B, ligando CD40, factor- α de necrosis tumoral, factor- β de necrosis tumoral, proteína 1 quimioatrayente de monocitos, factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos, y linfotóxina). En consecuencia, en modalidades particulares de la invención, las citocinas inmunomoduladoras (preferentemente, citoquinas inductivas de CTL) se administran a un sujeto junto con los métodos descritos en la presente descripción para producir una respuesta inmune o proporcionar inmunoterapia.

Las citocinas pueden administrarse por cualquier método conocido en la técnica. Las citocinas exógenas pueden administrarse al sujeto, o alternativamente, una secuencia de nucleótidos que codifican una citocina puede suministrarse al sujeto usando un vector adecuado, y la citocina producida *in vivo*.

Habiendo ahora descrito la invención, la misma se ilustrará con referencia a ciertos ejemplos, que se incluyen en la presente descripción para solamente propósitos de ilustración, y que no se pretende que sean limitativos de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Plásmidos. Los plásmidos rAAV que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) se construyeron a partir de pTR_{BS}UF-2 descrito previamente (un regalo de Nick Muzyczka). En primer lugar, la secuencia codificante de GFP humanizada se sustituyó con la GFP mejorada (eGFP) (Clontech) para crear el plásmido, pTR-CMV-GFPneo. Este plásmido generó el vector rAAV-GFPneo. En segundo lugar, el fragmento *Sal* I que contiene la región codificante *neo* y promotor SV40 se suprimió para crear pTR-CMV-GFP. El vector a partir de este plásmido se denominó como rAAV-GFP en este informe.

El plásmido, p43mEpo, un regalo de Barry Byrne, contuvo el gen de eritropoyetina de ratón bajo el control del promotor CMV y generó un replicón rAAV (rAAVmEpo) de menos de la mitad de la longitud de AAV silvestre. Una versión más extensa de este constructo (pmEpo- λ) se preparó insertando el fragmento *Hind* III de 2.3 kb a partir del fago λ en un sitio *Cla* I entre la señal de poliadenilación y la repetición terminal de AAV corriente abajo. El vector rAAV- *LacZ* se generó a partir de pDX11-*LacZ*, que se ha descrito en otra parte (McCown y otros, (1996) Brain Research 713:99).

Vectores virales Los vectores virales se generaron en células 293 (10^8 - 10^9 células por preparación) co-transfectando 3 plásmidos que contienen: 1) el constructo rAAV específico, 2) los genes *rep* y *cap* de AAV (pACG), o 3) los genes helper esenciales de adenovirus (PXX-6; Xiao y otros, (1998) J. Virology 72:2224). En 40 horas post- transfección, las células se rasparon en los medios y se lisaron por tres ciclos de congelación-descongelación. Los lisados se incubaron a 37 °C con 2 μ g/ml de ADNasa I hasta que se dispersó el debris floculante. Los lisados se aclararon por centrifugación y se precipitó el rAAV usando sulfato amónico (Snyder y otros, Production of recombinant adeno-associated virus vectors. en: Dracopoli y otros, editores. Current Protocols in Human Genetics. Nueva York: John Wiley & Sons Ltd.: 1996. p. 12.1.1-12.2.23). El virus ppt se resuspendió con 8 ml de 10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de MgCl₂ y el cloruro de cesio se añadió para alcanzar una densidad final de 1.4 g/cm³ y un volumen final de 12.5 ml. La solución se centrifugó por 36 horas a 38 krpm en un rotor SW41. Las fracciones (0.75 ml) se recogieron puncionando con una aguja hipodérmica en la parte inferior de cada tubo y bombeando el líquido a un colector de fracciones. Los vectores se almacenaron a 4 °C en cloruro de cesio.

El ADN del virión (vADN) se extrajo a partir de 10 μ l de cada fracción por digestión en 50 μ l de reacciones que contienen 0.4 mg/ml de proteasa K, 1 % de sarcosil, y 10 mM de EDTA a 50 °C por 1 hora, seguido por extracción con fenol/cloroformo. Las muestras se diluyeron 3 veces con agua y se precipitaron con etanol para el análisis por electroforesis en gel de agarosa alcalina e hibridación por membrana de Southern.

Células e infecciones. Las células HeLa y HEK 293 se cultivaron en medios DMEM que contienen 10 % de SFB y Pen/Strep. Las materias primas de vectores virales se diluyeron en los medios antes de añadir a los cultivos sub-confluentes y se dejaron sobre las células hasta que se observó por microscopía de fluorescencia la transducción de GFP a las 24 horas post-infección.

Para la expresión de eritropoyetina en los hígados de ratón, 200 μ l de solución salina normal, que contiene 2×10^{10} partículas físicas de cualquier rAAV convencional o virus duplicado (scAAV), se inyectó directamente en las venas portales

de ratones Balb-c ByJ de 10 semanas de edad (Jackson Laboratory Las muestras de sangre se recogieron por flebotomía retro-orbital en el momento de la infección y en intervalos de 7 días para la determinación del hematocrito.

Ejemplo 2

Generación de Vectores Duplicados

Un constructo del plásmido rAAV (pTR-CMV-GFP), con un tamaño de replicón de 2299 nucleótidos, se usó para generar una materia prima de vector viral (rAAV-GFP) por métodos convencionales. El tamaño predicho de la forma dimérica replicativa de este vector fue 4474 nucleótidos (**Figura 1**), que fue 95.6 % de la longitud del genoma de AAV silvestre. Los vectores virales se fraccionaron por centrifugación en gradiente isopícnico en CsCl y el contenido de vADN de cada fracción se analizó en geles de agarosa alcalina (**Figura 2**). Las exploraciones PhosphorImager se usaron para cuantificar las bandas específicas de vADN de cada fracción. Bajo condiciones de desnaturalización, el ADN dímero autocomplementario (**Figura 2**, panel a, fracciones 10-13) corrieron en aproximadamente dos veces la longitud del genoma monomérico. El material de hibridación en las fracciones 2-4 es la forma replicativa de ADN sin empaquetar que sedimenta en la parte inferior del gradiente. Aunque una etapa de ADNasa se incluyó en la purificación del vector (ver métodos), el tratamiento no se pretendió ser exhaustivo y este material demostró ser sensible a la ADNasa en experimentos posteriores, mientras que el material de las fracciones 10 -14 fue resistente a la ADNasa (datos no mostrados). Los vectores que contienen genomas de ADN principalmente diméricos (fracciones 10 y 11) se designaron como duplicado o virus "auto-complementario" (scAAV). La estructura de repetición invertida de estas moléculas se confirmó por digestión con enzimas de restricción (datos no mostrados).

Dos vectores rAAV adicionales (**Figura 1**) se generaron y purificaron en paralelo, y se analizaron de la misma manera (**Figura 2**, paneles b y c). La primera, rAAV-GFPneo, contuvo un gen *neo* además de la GFP y tuvo una longitud de genoma replicante de 3398 nucleótidos. Este fue 72.6 % del tamaño del genoma AAV silvestre, y fue demasiado grande para ser empaquetado como un dímero. El segundo fue un constructo rAAV-CMV-LacZ de 4898 nucleótido, que fue ligeramente mayor (104.7 %) que el tamaño del genoma de AAV silvestre, pero dentro del límite para el empaque eficaz (Dong y otros, (1996) Human Gene Therapy 7:2101). La densidad inferior, movilidad superior del material de hibridación en las fracciones 14 y 15 (**Figura 2**, panel c) comprendió genomas que experimentaron eliminaciones y estas fracciones no se usaron en experimentos posteriores.

Ejemplo 3

Transducción con Vectores Duplicados contra monoméricos y Efectos de co-infección de Ad

La eficacia de la transducción del scAAV-GFP (**Figura 2**, panel a, fracción 11) se comparó con el monómero homólogo (fracción 13), así como los vectores GFPneo y LacZ (**Figura 2**, paneles b y c, fracciones 13 y 12, respectivamente) en células HeLa infectadas a baja multiplicidad (**Figura 3**). Los números de partículas se calcularon a partir de señales PhosphorImager específicas de vADN completo, en cada fracción en la membrana de Southern, después de la corrección del número de copias de ADN monomérico contra el dimérico. Así, cada virus duplicado contiene dos copias del transgén como una sola molécula, en la orientación repetida invertida, mientras que cada partícula monomérica contiene una copia monocatenaria.

El vector scAAV-GFP (fracción 11), que contiene aproximadamente 90 % de virus dímero, produjo una relación 5.9:1 de partículas físicas por unidades de transducción, teniendo así la predicción de alta eficacia de transducción. La fracción 13 del mismo gradiente, que contiene por el contrario aproximadamente 80-90 % de virus monómero, tuvo una relación 24.6:1 partículas por unidad de transducción. Esta diferencia de 4 veces en la eficacia representó una diferencia mínima cuando se consideró que la contaminación de dímero en la fracción de monómero tendría un mayor impacto en su potencial de transducción que el componente monómero que contribuiría a la fracción de dímero. Por el contrario, los vectores ADNmc GFPneo y LacZ monoméricos tuvieron relaciones de partículas por unidad de transducción de **125:1** y 828:1, respectivamente, comparable a eficacias reportadas previamente para estos vectores (Fisher y otros, (1996) J. Virology 70:520; Zolotukhin y otros, (1999) Gene Therapy 6:973).

La eficacia de la transducción de vectores rAAV convencionales puede potenciarse enormemente (hasta 100 veces) por co-infección con Ad, o por tratamiento con agentes que dañan el ADN u otros tipos de estrés celular. Esta mejora se había

asociado con transformación mediada por la célula del genoma de ADNmc en plantillas de transcripción ds-ADN activos. Debido a que el vector duplicado contiene las dos cadenas complementarias empaçadas como una sola molécula, se predijo que la transducción sería independiente de la mejora por el adenovirus. Esta fue en gran medida el caso cuando las células HeLa se co-infectaron con los vectores duplicados y 5 unidades infecciosas por célula de adenovirus (**Figura 3**). El número de células GFP positivas en los cultivos infectados con el virus duplicado se aumentó por sólo 1.6 veces, un efecto que podría atribuirse a los efectos transcripcionales de la infección por adenovirus en la actividad del promotor CMV como se informó previamente (Clesham y otros, (1998) *Gene Therapy* 5:174; Loser y otros, (1998) *J. Virology* 72:180). La velocidad de transducción del vector monómero se aumentó 2.4 veces por co-infección de Ad, mientras que los vectores GFPneo y LacZ se indujeron 6.0 veces y 12.8 veces, respectivamente.

En resumen, en las células HeLa cultivadas, el vector duplicado fue mayor que cuatro veces más eficaz que el vector homólogo que contiene sólo un genoma de ss-ADN monomérico. Esta diferencia sería probablemente mayor si no fuera por el aproximadamente 10-20 % de contaminación de las fracciones de monómero con vectores de dímero. De acuerdo con esta interpretación, el vector duplicado fue 20 veces más eficaz que un vector rAAV-GFPneo convencional y 140 veces más eficaz que un vector rAAV-LacZ.

Ejemplo 4

Transducción con Vectores Duplicados en la Ausencia de Síntesis de ADN de la Célula Huésped.

Debido a que el vADN de los vectores duplicados contuvo las dos cadenas de ADN en una sola molécula, permitiendo la rehibridación eficiente tras el desnudamiento, se predijo que estos vectores podrían obviar el papel de síntesis de ADN de la célula huésped en la transducción. El vector scAAV-GFP se comparó con el monómero homólogo, y el vector GFPneo, en células HeLa se pretrataron con hidroxurea (HU) 24 horas antes de la infección para inhibir la síntesis de ADN de la célula huésped. Se continuó el tratamiento con hidroxurea, sin interrupción, a las mismas concentraciones a continuación de la infección y se mantuvo en las células por las siguientes 24 horas, hasta que se consiguió la transducción de GFP.

La transducción de scAAV-GFP se estimuló por hasta 1.9 veces en respuesta a concentraciones crecientes de HU (**Figura 4**). Esta estimulación, similar en magnitud a la observada con la co-infección de Ad, se afectó probablemente a través de una combinación de transactivación transcripcional del promotor CMV provocado aproximadamente por estrés celular, y la acumulación de GFP en las células que no se dividen. En contraste, la transducción de la fracción de vector monómero homólogo se estimuló en la concentración de HU más baja y se inhibió a concentraciones más altas. La actividad de transducción residual del vector monómero a concentraciones de HU superiores, a un nivel de aproximadamente 5 veces menor que la de la fracción de virus duplicado, es consistente con la contaminación del 10-20 % de las fracciones de monómero con partículas que contienen dímero (**Figura 2**, panel a). El vector de transducción de rAAV-GFPneo se inhibió más de 10 veces bajo las mismas condiciones. Idénticos resultados se obtuvieron por el tratamiento con afidicolina, un inhibidor específico de la polimerasa α/δ (**Figura 4**, panel b). Esto confirma la hipótesis de que la transducción del vector duplicado fue independiente de la síntesis de ADN de la célula huésped.

Ejemplo 5

Transducción por Vectores Duplicados *in vivo*

Un reportero diferente se usó para la comparación de la eficiencia *in vivo* de rAAV monocatenario convencional y duplicado. El constructo que produce dímero contuvo sólo el gen de eritropoyetina de ratón (mEpo) transcrito a partir del promotor de CMV. El tamaño del elemento replicante de este vector mínimo fue 2248 nucleótidos. La forma dimérica de esta molécula, 4372 nucleótidos de longitud (**Figura 1**), fue 93 % del tamaño del genoma de AAV silvestre y se empacó fácilmente. Un segundo constructo contuvo el transgén idéntico, con la adición de una secuencia heteróloga corriente abajo (fago λ) para llevar el tamaño del vector recombinante a 4570 nucleótidos, o 98 % del tamaño del genoma de AAV silvestre. Estudios previos han usado el ADN de fago lambda como un fragmento central dispensable sin efectos perjudiciales sobre el vector (Muzyczka y otros, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97). Ambos vectores se purificaron por cromatografía de heparina-agarosa. El vector más pequeño se purificó además en un gradiente de CsCl para aislar los viriones que contienen ADN diméricos (no mostrado). Las dos materias primas de vectores se cuantificaron usando membrana de Southern a partir de geles de agarosa alcalinos para determinar el número de partículas que contienen ADN. En este caso, aproximadamente 25 % de las partículas en la fracción de dímero contuvo dos genomas de monómeros separados. Debido a que no podían

ser separados del dímero verdadero por densidad, y porque su comportamiento no se ha caracterizado, éstos se contaron como partículas de dímero, para el propósito de comparación con el vector completo, de manera que el efecto dímero sólo puede ser subestimado y no sobrestimado.

5 Números iguales de partículas físicas rAAV (2×10^{10} por animal en 200 μ l de solución salina normal) se administraron a ratones por inyección en la vena portal. La expresión del gen mEpo se evaluó observando los cambios del hematocrito a intervalos de 7 días. Los ratones de control recibieron ya sea inyecciones intraportal de solución salina o no se operaron, pero flebotomizaron a intervalos de 7 días. Los ratones que reciben el vector duplicado respondieron con un rápido aumento en el hematocrito (**Figura 5**), y con aumentos permanentes durante las siguientes dos semanas. Teniendo en cuenta el tiempo de retraso entre la expresión de eritropoyetina y la producción de células rojas de la sangre, esto sugirió que el vector duplicado se expresó en niveles elevados dentro de la primera semana. Los ratones que recibieron el vector ADNmc completo, no mostraron un aumento significativo en el hematocrito hasta 21 días post-inyección, y no alcanzaron niveles comparables con los animales tratados con el vector duplicado en el transcurso del experimento.

15 La infección de ratones con scAAVmEpo conduce a una respuesta más rápida y un mayor aumento en el hematocrito, que el vector ADNmc completo que lleva el mismo gen. Estos resultados apoyan nuestras observaciones en células cultivadas y es consistente con la opinión de que los vectores diméricos están dispuestos a expresar el transgén inmediatamente tras el desnudamiento y entrada en el núcleo. Los niveles superiores de expresión logrados en última instancia pueden reflejar la incapacidad de muchas células infectivas para formar ADNbc a partir de rAAV convencional y/o la pérdida/degradación de ssvADN antes de la formación del bicatenario (Miao y otros, (1998) *Nature Genetics* 19:13).

20 Como hemos demostrado por el pre-tratamiento de células con HU, la transducción con el vector de scAAV es independiente de la síntesis de ADN de la célula huésped. La capacidad para transducir células en ausencia de síntesis de ADN representa un punto de partida fundamental en la biología de los vectores scAAV a partir del virus parental, lo que les permite funcionar bajo circunstancias donde fallarían los vectores rAAV convencionales. Ciertos tipos de células son extremadamente ineficientes para la transducción de rAAV ostensiblemente debido a la incapacidad de sintetizar o reclutar una cadena complementaria (Fisher y otros, (1996) *J. Virology* 70:520; Alexander y otros, (1996) *Human Gene Therapy* 7:841; Miao y otros, (1998) *Nature Genetics* 19:13). El scAAV no sufre tal limitación y puede usarse con genes marcadores para determinar directamente si una célula es permisiva para la transducción de rAAV en todas las otras etapas, independientemente de la síntesis de ADN.

25 Independientemente de la capacidad de la célula objetivo para preparar la cadena complementaria de rAAV, está claro que estos reactivos proporcionan un sistema de suministro de AAV alternativo para genes que pueden requerir un inicio rápido. Más importante, nuestros datos sugieren que los vectores de scAAV logran niveles totales superiores de producto terapéutico cuando se administra un número idéntico de partículas. Así, los vectores scAAV demostrarán ser útiles donde se requiere una respuesta más oportuna, robusta o cuantitativa a la dosis de vector. El potencial para alcanzar niveles críticos de expresión transgénica en dosis mínima es importante además con respecto a los requisitos de producción de vectores para ensayos clínicos y para minimizar la exposición del paciente al virus.

40 Ejemplo 6

Sustratos Mejorados para Producir Vectores de Parvovirus Duplicados

45 Para hacer más eficiente la producción de materias primas del vector duplicado, y eliminar las complicaciones de las poblaciones mixtas de genomas bicatenario y monómero, un vector mutante se creó el cual sólo genera los genomas dímeros (**Figura 6**). Este constructo tiene una mutación en un TR, tal que el sitio de corte Rep (*trs*) se elimina, mientras que el otro TR es silvestre. El efecto es que la replicación en horquilla rodante se inicia a partir del extremo silvestre del genoma, avanza a través del extremo mutante sin resolución terminal, y después continúa hacia atrás en todo el genoma de nuevo para crear el dímero. El producto extremo es un genoma autocomplementario con la TR mutante en el medio y TRs silvestre ahora en cada extremo. La replicación y empaque de esta molécula procede después normal a partir de TRs silvestre, excepto que la estructura dimérica se mantiene en cada ronda.

50 Las materias primas de vectores tanto de rAAV-CMV-GFP-Hpa-trs como rAAV-CMV-mEpo-HPA-trs se generaron usando este fondo de mutante y analizaron los productos en gradientes de CsCl como anteriormente (**Figura 7**). Estos constructos producen aproximadamente 90 % de vectores duplicados. Esto permitirá mayores rendimientos del vector de parvovirus

duplicado y el uso de la purificación iodixanol/heparina para estos vectores sin la etapa adicional de purificación con gradiente de densidad de CsCl.

5 El constructo de plásmido usado para generar estos vectores contuvo una delección en el 5' TR, con respecto a la cadena codificante del transgén expresado. Esta delección incluye todo el elemento D y 3 pb del elemento A, abarcando así el sitio de corte (**Figura 6**). Se eliminan todas las secuencias AAV entre el resto del elemento A y el transgén. Esto impide la recombinación homóloga entre secuencias que flanquean el TR mutado y el TR silvestre, reduciendo así la posibilidad de conversión génica según se describe por Samulski y otros, (1983) Cell 33:135. Esta delección se construyó cortando en los
10 sitios de restricción únicos inmediatamente 5' al transgén (*KpnI*) y dentro del gen Amp de las secuencias de plásmidos bacterianos (*XmnI*). El fragmento eliminado, que contiene un TR, se sustituyó con un fragmento de un segundo plásmido rAAV, que se había cortado en el mismo sitio dentro del gen Amp, y en un sitio sintético *HpaI* insertado previamente en el sitio *BalI* a la izquierda de la unión A/D.

15 En una modalidad alternativa, una plantilla para producir preferentemente el vector duplicado se genera con un AAV TR resoluble en un extremo y un AAV TR modificado se produce insertando una secuencia en el TR. En una modalidad particular, el plásmido AAV silvestre psub201 se usa para producir esta plantilla (Samulski y otros, (1987) J. Virology 61:3096). Este constructo contiene un par único de sitios Xba I así como sitios PvuII que flanquean las TRs virales. Dos productos intermedios de plásmidos AAV derivados de psub201, Hpa7 y Hpa9, tienen un enlazador único HpaI (CCAATTGG) insertado en el sitio Bal I entre el nucleótido 121 y 122 (Hpa9) y entre 4554 y 4555 (Hpa7) en la secuencia TR del genoma de AAV, respectivamente (Xiao, X., (1996), "Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration", Ph.D. Disertación, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, Pensilvania). La inserción de estos enlazadores desplaza el sitio de corte de AAV silvestre hacia dentro alejándolo de la posición nativa, resultando en una incapacidad para ser resuelto por la proteína Rep de AAV después de la replicación.

25 Estos sustratos acumulan un producto intermedio dimérico hasta que tiene lugar la conversión de gen. La digestión de Hpa7 o Hpa9 con enzima de restricción HpaI más la digestión parcial con XbaI, resulta en TRs nuevos que carecen del sitio de corte de AAV silvestre, así como el elemento D (de la izquierda para Hpa9 y de la derecha para Hpa7). Este sustrato no es adecuado para la conversión de genes como se describió por Samulski y otros, (1983) Cell 33:135, debido a la ausencia del elemento D, y continúa para acumular un producto intermedio de replicación dimérica después de la infección viral. Al
30 comenzar con una molécula que es de tamaño medio o menos del genoma de AAV silvestre, este producto intermedio se empaca preferentemente por la cápsida de AAV. Estas moléculas están en forma dimérica (enlazadas covalentemente a través de la TR modificada), más específicamente, debido a que son auto-complementarias proporcionan una fuente única de vectores de parvovirus que transportan sustratos bicatenarios. Estas partículas de vectores evitan la etapa limitante de la velocidad requerida para todos los vectores AAV utilizados actualmente, es decir, la segunda síntesis de la cadena (ver Ferrari y otros, (1996) J. Virology 70:3227-34).

Ejemplo 7

Transducción de Células Dendríticas

40 Las células dendríticas (DC) se postulan para jugar un papel importante en la presentación de antígenos e iniciación de varias respuestas inmunes dependientes de células T. Las DC han demostrado ser células presentadoras de antígenos más potentes (APC) que lo que son los macrófagos o monocitos. Además, se ha informado que las DC estimulan la proliferación de células T hasta diez veces más eficientemente que lo que hacen los monocitos (Guyre y otros, (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45:146, 147 col. 2). En consecuencia, existen numerosos esfuerzos para dirigir los vectores a células dendríticas para producir una respuesta inmune más eficaz. Se ha informado previamente que las DC son refractarias a los
45 vectores AAV (Jooss y otros, (1998) J. Virology 72:4212).

50 Se obtuvieron DC a partir de dos pacientes humanos y cultivaron *in vitro*. Las células de cada paciente se transdujeron con vector AAV silvestre-GFP o pHpa7GFP (vector duplicado, descrito en el **Ejemplo 1**) a un MOI de 10. No se detectó expresión de GFP en células transducidas con AAV silvestre-GFP después de 7 días. Por el contrario, la expresión de GFP se observó en 5-15 % de DC transducidas con el vector dimérico pHpa7GFP.

55 Estos resultados sugieren que la etapa limitante para la transducción de AAV silvestre de DC está en el nivel de la capacidad de la célula huésped para mediar la síntesis de la segunda cadena. Los vectores de parvovirus de la invención

parecen obviar esta etapa al proporcionar la célula con un sustrato bicatenario. En consecuencia, los vectores de parvovirus diméricos de la invención tienen un tropismo diferente (*por ejemplo*, más amplio) y el intervalo de célula objetivo que lo que hacen los vectores AVV silvestre.

5 Ejemplo 8

Administración *in vivo* de pHPa7GFP

10 Para evaluar el tropismo de los vectores duplicados *in vivo*, los ratones se administran por vía intramuscular (im) con aproximadamente 1.5×10^{11} de los vectores AAV silvestre-GFP o pHPA7GFP descritos en el **Ejemplo 7**. En varias horas post-administración (*por ejemplo*, 4, 8, 16, 32, 64 días, etc.), los ratones se sacrifican y las autopsias se realizan para determinar la expresión transgénica en varias células huésped y tejidos. El inicio, cinética y persistencia de la expresión se evalúan además y comparan para los vectores AAV silvestre y bicatenario. De particular interés son las células que son típicamente refractarias a los vectores AAV silvestre, tales como las células madre de la médula ósea, astrocitos, y células epiteliales pulmonares. Además de interés son las células no replicantes o lentamente-replicantes que apoyan ineficientemente la síntesis de la segunda cadena de AAV, tales como células del músculo, hígado y del sistema nervioso central.

20 Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle en forma de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad y comprensión, resultarán evidentes que ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de estas.

Lo que se describe es:

25 Una partícula de parvovirus duplicado que comprende:

una cápsida del parvovirus
un genoma del vector que comprende en la dirección 5' a 3' :

- 30 (i) una secuencia de repetición terminal en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
35 (v) una secuencia de repetición terminal en 3';

en donde dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras liberación de la cápsida del parvovirus

40 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal son secuencias de repetición terminal de virus adeno-asociado (AAV).

La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV se seleccionan del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.

45 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV son secuencias AAV2.

50 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde el sitio de resolución terminal (trs) se elimina de la secuencia de repetición terminal no resoluble.

La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde esencialmente se elimina todo el elemento D de dicha secuencia de repetición terminal no resoluble.

ES 2 505 700 T3

- La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde la eliminación del elemento D de la secuencia de repetición terminal no resoluble se extiende a través de la unión A/D en el elemento A.
- 5 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de repetición terminal no resoluble comprende una inserción en el elemento D.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la inserción en el elemento D está en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs).
- 10 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de repetición terminal no resoluble comprende uno o más sustituciones de nucleótidos en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs).
- La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde el genoma del vector es aproximadamente del tamaño del genoma adeno-asociado (AAV) silvestre.
- 15 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde un polipéptido es codificado por el genoma del vector.
- 20 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina, y un anticuerpo monoclonal.
- La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dicha cápsida del parvovirus es una cápsida del virus adeno-asociado (AAV).
- 25 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dicha cápsida del parvovirus se selecciona del grupo que consiste en una cápsida de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 30 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dicha cápsida del parvovirus es una cápsida de AAV1.
- La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dicha cápsida del parvovirus es una cápsida de AAV2.
- 35 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde dicha cápsida del parvovirus es una cápsida del virus adeno-asociado (AAV) y dichas secuencias de repetición terminal son secuencias de repetición terminal de AAV.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la dirección de transcripción es hacia la secuencia de repetición terminal no resoluble.
- 40 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la dirección de transcripción es lejos de la secuencia de repetición terminal no resoluble.
- 45 La partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en donde las mitades 5' y 3' del genoma del vector son esencialmente completamente complementarias entre sí.
- Una formulación farmacéutica que comprende una pluralidad de las partículas de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 Una secuencia de nucleótidos que comprende una plantilla para producir un ADN del virión, la plantilla comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por una secuencia de repetición terminal y una secuencia de repetición terminal no resoluble.
- 55 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal son secuencias de repetición terminal del virus adeno-asociado (AAV).

- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV se seleccionan del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 5 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV son secuencias de AAV2.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde el sitio de resolución terminal (trs) se elimina de la secuencia de repetición terminal no resoluble.
- 10 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde esencialmente se elimina todo el elemento D de dichas secuencias de repetición terminal no resolvibles.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la eliminación del elemento D de la secuencia de repetición terminal no resoluble se extiende a través de la unión A/D en el elemento A.
- 15 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de repetición terminal no resoluble comprende una inserción en el elemento D.
- 20 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la inserción en el elemento D está en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs).
- [La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de repetición terminal no resoluble comprende una o más sustituciones de nucleótidos en la secuencia del sitio de resolución terminal (tra).
- 25 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la plantilla es aproximadamente la mitad del tamaño del genoma del virus adeno-asociado (AAV) silvestre.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga o una secuencia complementaria a ella es una secuencia codificante para un polipéptido.
- 30 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina, y un anticuerpo monoclonal.
- 35 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en un vector plasmídico, vector ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o un vector viral.
- 40 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la plantilla se incorpora de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.
- Un ADN del virión producido a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción.
- 45 Una partícula de parvovirus duplicado que comprende el ADN del virión de acuerdo con la descripción.
- Una secuencia de nucleótidos que comprende una plantilla dimérica para producir un ADN del virión, la plantilla que comprende en la dirección 5' a 3':
- 50 una secuencia de repetición terminal en 5';
una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
una secuencia de repetición terminal no resoluble;
una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
una secuencia de repetición terminal en 3';
- 55

- en donde el ADN del virión es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.
- 5 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal son secuencias de repetición terminal de virus adeno-asociada (AAV).
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV se seleccionan del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 10 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde dichas secuencias de repetición terminal AAV son secuencias AAV2.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde el sitio de resolución terminal (trs) se elimina de la secuencia de repetición terminal no resoluble.
- 15 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde se elimina todo el elemento D de dicha secuencia de repetición terminal no resoluble.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la eliminación del elemento D de la secuencia de repetición terminal no resoluble se extiende a través de la unión A/D en el elemento A.
- 20 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la plantilla es aproximadamente del tamaño del genoma adeno-asociado (AAV) silvestre.
- 25 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o un vector viral.
- La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde la plantilla se incorpora de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.
- 30 La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción en donde las mitades 5' y 3' de la plantilla dimérica son esencialmente completamente complementarias entre sí.
- 35 Un ADN del virión producido a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la descripción.
- Una partícula de parvovirus duplicado que comprende el ADN del virión de acuerdo con la descripción.
- Una célula cultivada que comprende la plantilla de acuerdo con la descripción.
- 40 Un método para producir una partícula de parvovirus duplicado, que comprende proporcionar a la célula permiso para la replicación del parvovirus:
- 45 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una plantilla de acuerdo con la descripción.
(b) secuencias de nucleótidos suficientes para la replicación de la plantilla para producir un genoma del vector;
(c) secuencias de nucleótidos suficientes para el empaque del genoma del vector en una cápsida del parvovirus,
- bajo condiciones suficientes para la replicación y empaque del genoma del vector en la cápsida del parvovirus,
- 50 de manera que la partícula de parvovirus duplicado que comprende el genoma del vector encapsidado dentro de la cápsida del parvovirus se produzca en la célula.
- El método de acuerdo con la descripción que comprende además la etapa de recoger la partícula de parvovirus duplicado.

- El método de acuerdo con la descripción que comprende además la etapa de lisar la célula antes de recoger la partícula de parvovirus duplicado.
- 5 El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias codificantes rep y cap del parvovirus se proporcionan por un plásmido.
- El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias codificantes rep del parvovirus se integran de manera estable en la célula.
- 10 El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias codificantes cap del parvovirus se integran de manera estable en la célula.
- El método de acuerdo con la descripción en donde la secuencia de nucleótidos que comprende la plantilla es un plásmido.
- 15 El método de acuerdo con la descripción en donde la plantilla se integra de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.
- Un método para producir una partícula de parvovirus duplicado, que comprende proporcionar a la célula permiso para la replicación de AAV:
- 20
- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una plantilla de acuerdo con la descripción.
 - (b) secuencias de AAV suficientes para la replicación de la plantilla para producir un genoma del vector;
 - (c) secuencias de AAV suficientes para el empaque del genoma del vector en una cápsida de AAV,
- 25 bajo condiciones suficientes para la replicación y empaque del genoma del vector en la cápsida de AAV, de manera que la partícula de parvovirus duplicado que comprende el genoma del vector encapsidado dentro de la cápsida de AAV se produzca en la célula.
- 30 El método de acuerdo con la descripción que además comprende proporcionar secuencias del virus helper que proporcionan que el virus helper funcione para una infección de AAV productiva, en donde las secuencias del virus helper no pueden empacarse en partículas virales de rAAV infecciosas.
- El método de acuerdo con la descripción que comprende además la etapa de recoger la partícula de parvovirus duplicado.
- 35 El método de acuerdo con la descripción que comprende además la etapa de lisar la célula antes de recoger la partícula de parvovirus duplicado.
- El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias codificantes rep y cap del AAV se proporcionan por un plásmido.
- 40 El método de acuerdo con la descripción en donde el plásmido comprende además secuencias del virus helper que proporcionan las funciones del virus helper para una infección por AAV productiva.
- 45 Un método para suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula, que comprende poner en contacto una célula con una partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la reivindicación 1 bajo condiciones suficientes para que la partícula de parvovirus duplicado entre a la célula.
- 50 El método de acuerdo con la descripción en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer, célula de tumor, célula del cerebro, célula de los músculos, célula epitelial de las vías respiratorias, células hepáticas, células dendríticas, y célula del ojo .
- El método de acuerdo con la descripción, en donde un polipéptido es codificado por el genoma del vector.

- El método de acuerdo con la descripción en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en endostatina, anglostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina y un anticuerpo monoclonal.
- 5 El método de acuerdo con la descripción en donde la cápsida del parvovirus es una cápsida de virus adeno-asociado (AAV).
El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias de repetición terminal son secuencias de virus adeno-asociados (AAV).
- 10 El método de acuerdo con la descripción en donde la cápsida del parvovirus es una cápsida de AAV y las secuencias de repetición terminal son secuencias AAV.
Un método para administrar un ácido nucleico a un sujeto que comprende administrar la célula de acuerdo con la descripción a un sujeto.
- 15 Un método para administrar una secuencia de nucleótidos a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con la descripción en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 El método de acuerdo con la descripción, en donde la cápsida del parvovirus es una cápsida de virus adeno-asociado (AAV).
El método de acuerdo con la descripción en donde las secuencias de repetición terminal son secuencias de virus adeno-asociados (AAV).
- 25 El método de acuerdo con la descripción en donde la cápsida del parvovirus es una cápsida de virus adeno-asociado (AAV) y las secuencias de repetición terminal son secuencias AAV.
El método de acuerdo con la descripción en donde el sujeto se selecciona del grupo que consiste en sujetos aves y sujetos mamíferos.
- 30 El método de acuerdo con la descripción en donde el sujeto es un sujeto mamífero.
El método de acuerdo con la descripción en donde el sujeto es un sujeto humano.
- 35 El método de acuerdo con la descripción en donde el sujeto es un paciente de cáncer o paciente de tumor.
El método de acuerdo con la descripción en donde la partícula de parvovirus duplicado se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, rectal, transmucosal, transdérmica, inhalación, intravenosa, subcutáneo, intradérmica, intracraneal, intramuscular, e intraarticular.
- 40 El método de acuerdo con la descripción en donde la partícula de parvovirus duplicado se administra en un sitio seleccionado del grupo que consiste en un tumor, el cerebro, músculo esquelético, epitelio de las vías respiratorias, el hígado, y el ojo.
- 45 El método de acuerdo con la descripción en donde un polipéptido es codificado por el genoma del vector.
El método de acuerdo con la descripción en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en endostatina, anglostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina, y un anticuerpo monoclonal.
- 50 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> University of North Carolina at Chapel Hill Samulski, R. Jude McCarty, Douglas M.
- 55 <120> VECTORES DE PARVOVIRUS DUPLICADOS

ES 2 505 700 T3

<130> 5470-282WO
<140>PCT/US01/17587
5 <141> 2001-05-31
<160> 1
<170> PatentIn versión 3.1
10 <210> 1
<211> 198
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Repetición terminal invertida del vector AAV-2 plásmido pSub 201
20 <400> 1
ttggccactc cctctctgcg cgtctgctcg ctcaactgagg ccgcccgggc aaagcccggg 60
cgtcggggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
25 gccaaactcca tcaactagggg ttcttgtag ttaatgatta acccgccatg ctacttatct 180
acgtagccat gctctaga 198
30

Reivindicaciones

1. Una partícula de parvovirus duplicado que comprende:
- 5 una cápsida del parvovirus
un genoma del vector que comprende en la dirección 5' a 3' :
- 10 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
15 (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';
- en donde dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida del parvovirus.
2. Una partícula de parvovirus duplicado que comprende:
- 20 una cápsida del parvovirus
un genoma del vector que comprende en la dirección 5' a 3' :
- 25 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada; y
30 (v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';
- en donde las secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de repetición terminal 5' y 3' de parvovirus y la secuencia de repetición terminal no resoluble son al menos 90 % complementarias entre sí; y además en donde dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas del apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida de parvovirus.
3. La partícula de parvovirus duplicado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las secuencias de nucleótidos heterólogas duplicadas formadas por el apareamiento de bases intracadena se asocian operativamente con un elemento promotor o potenciador.
4. La partícula de parvovirus duplicado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las secuencias de nucleótido entre cada secuencias de repetición terminal 5' y 3' de parvovirus y la secuencia de repetición terminal no resoluble son esencialmente completamente complementarias entre sí.
5. La partícula de parvovirus duplicado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la partícula de parvovirus duplicado es una partícula de parvovirus híbrida, una partícula de parvovirus quimérica o una partícula de parvovirus objetivo.
6. La partícula de parvovirus duplicado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el genoma del vector es aproximadamente del tamaño del genoma del AAV silvestre.
7. Un ácido nucleico que comprende una plantilla para producir un ADN del virión para empacar en una cápsida del parvovirus, la plantilla comprende un secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5' o 3' y una secuencia de repetición terminal no resoluble.

8. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la plantilla es dimérica y comprende, en la dirección 5' a 3' :
- 5 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
10 (iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada que es esencialmente completamente complementaria a dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga; y
(v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';
- en donde dicho ADN del virión es capaz bajo condiciones adecuadas de apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras de liberación de la cápsida del parvovirus.
- 15 9. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una plantilla dimérica para producir un ADN del virión para empacar en una cápsida del parvovirus, la plantilla comprende en la dirección 5' a 3' :
- 20 (i) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 5';
(ii) una primera secuencia de nucleótidos heteróloga;
(iii) una secuencia de repetición terminal no resoluble que no puede ser resuelta por proteínas Rep en parvovirus;
(iv) una secuencia de nucleótidos heteróloga separada; y
(v) una secuencia de repetición terminal de parvovirus en 3';
- 25 en donde las secuencias de nucleótidos entre cada una de las secuencias de repetición terminal 5' y 3' de parvovirus y la secuencia de repetición terminal no resoluble son al menos un 90 % complementarias entre sí; y además en donde dicho genoma del vector es capaz bajo condiciones adecuadas de apareamiento de bases intracadena entre las secuencias de nucleótidos heterólogas tras la liberación de la cápsida de parvovirus del.
- 30 10. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas secuencias de repetición terminal de parvovirus en 5' y 3' son secuencias de repetición terminal en 5' y 3' del virus adeno-asociado (AAV), opcionalmente seleccionadas del grupo que consiste en secuencias de repetición terminal en 5' y 3' de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 35 11. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha secuencia de repetición terminal no resoluble no es una secuencia de repetición terminal de parvovirus no resoluble.
- 40 12. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de la reivindicación 11, en donde dicha secuencia de repetición terminal de parvovirus no resoluble es una secuencia de repetición terminal de AAV no resoluble.
13. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de la reivindicación 12, en donde la secuencia de repetición terminal de parvovirus no resoluble comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:
- 45 (i) eliminación del sitio de resolución terminal (trs);
(ii) eliminación de esencialmente todo el elemento D;
(iii) una inserción en el elemento D;
(iv) inserción en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs);
50 (v) una o más sustituciones de base de nucleótidos en la secuencia del sitio de resolución terminal (trs).
14. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de repetición terminal no resoluble es una secuencia de repetición terminal de un serotipo AAV que no es reconocido por las proteínas Rep de AAV2 o es una secuencia de repetición terminal de un parvovirus autónomo que no es reconocido por las proteínas Rep de AAV.

- 5
15. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga o la secuencia complementaria de ella codifica un polipéptido, opcionalmente en donde el polipéptido es un polipéptido terapéutico o inmunogénico.
- 10
16. El parvovirus duplicado o el ácido nucleico de la Reivindicación 15, en donde el polipéptido es un polipéptido terapéutico y se selecciona del grupo que consiste en: endostatina, angiostatina, superóxido dismutasa, eritropoyetina, un anticuerpo monoclonal, Factor IX, Factor X, una enzima lisosomal que incluye hexosaminidasa A e iduronato sulfatasa, globina, leptina, catalasa, tirosina hidroxilasa, una citocina que incluyen α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina-12, factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos y linfoxina, un factor de crecimiento peptídico o hormona que incluyen somatotropina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de nervios, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico derivado de la glía, factor $-\alpha$ y $-\beta$ de crecimiento transformante, un receptor que incluye el receptor del factor de necrosis tumoral, un producto de gen suicida que incluyen timidina quinasa, citosina deaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, deoxicitidina cinasa y factor de necrosis tumoral, una proteína que confiere resistencia a un fármaco de terapia contra el cáncer, y un producto génico supresor de tumores.
- 15
- 20
17. El parvovirus duplicado o el ácido nucleico de la reivindicación 15, en donde el polipéptido es un polipéptido inmunogénico y se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno de cáncer antígeno tumoral; antígeno bacteriano; antígeno viral; (v) antígeno protozoario; o (vi) antígeno de parásito.
- 25
18. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 14 , en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga o la secuencia complementaria a ella codifica un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un ARN que efectúa empalme en trans mediado por empalmosoma, un ARN interferente (iARN), o un ARN guía.
- 30
19. La partícula de parvovirus duplicado o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha cápsida del parvovirus es una cápsida de virus adeno-asociado (AAV), opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en una cápsida de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 35
20. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) y un vector viral.
- 40
21. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20, en donde el ácido nucleico se incorpora de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.
- 45
22. Un ADN del virión producido del ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 21.
23. Una célula cultivada que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 21.
24. Una formulación farmacéutica que comprende una pluralidad de la partícula de parvovirus duplicado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o reivindicaciones 10 a 19 en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50
25. Un método para producir una partícula de parvovirus duplicado *in vitro*, que comprende proporcionar a una célula:
- (a) un ácido nucleico que codifica una plantilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 21;
 - (b) secuencias de nucleótidos suficientes para replicación de la plantilla para producir un genoma del vector; y
 - (c) secuencias de nucleótidos suficientes para el empaque del genoma del vector en una cápsida del parvovirus;

bajo condiciones suficientes para la replicación y empaque del genoma del vector en la cápsida del parvovirus, de manera que la partícula de parvovirus duplicado que comprende el genoma del vector encapsidado dentro de la cápsida del parvovirus se produzca en la célula.

- 5 **26.** El método de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico que comprende la plantilla es un plásmido o un vector viral, opcionalmente un vector del virus herpes, un vector de adenovirus o un vector de baculovirus.
- 10 **27.** El método de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico que comprende la plantilla se integra de manera estable en el cromosoma de una célula de mamífero.
- 15 **28.** Un método para suministro *in vitro* de una secuencia de nucleótidos a una célula, que comprende poner en contacto una célula con una partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21 bajo condiciones suficientes para que la partícula de parvovirus duplicado entre en la célula.
- 20 **29.** El método de la reivindicación 28, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer, célula de tumor, célula neural que incluyen células del sistema nervioso periférico y sistema nervioso central que incluyen célula del cerebro, célula del pulmón, célula de los músculos, célula epitelial que incluyen células epiteliales del intestino y vías respiratorias, células hepáticas, células dendríticas, células de los ojos que incluyen células de la retina, células pancreáticas que incluyen células de los islotes, células del miocardio, células óseas, células del bazo, queratinocito, fibroblasto, células endoteliales, células de la próstata, células germinales, células progenitoras, célula madre neural y célula madre del hígado.
- 25 **30.** Un parvovirus duplicado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: fibrosis quística u otra enfermedad pulmonar, hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia u otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia u otro trastorno neurológico, cáncer, diabetes mellitus, distrofia muscular que incluye distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, enfermedad de Gaucher, enfermedad Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de Tay-Sach, síndrome de Hunter u otro defecto metabólico, una enfermedad degenerativa de la retina u otra enfermedad del ojo.
- 30 **31.** Uso de un parvovirus duplicado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, en donde tratamiento de la enfermedad necesita el suministro de un ácido nucleico a una célula.
- 35 **32.** Uso de un parvovirus duplicado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, en donde tratamiento de la enfermedad necesita el suministro de un polipéptido inmunogénico a una célula.
- 40 **33.** Uso de una partícula de parvovirus duplicado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis quística u otra enfermedad pulmonar, hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia u otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia u otro trastorno neurológico, cáncer, diabetes mellitus, distrofia muscular que incluyen distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, enfermedad de Gaucher, enfermedad Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de Tay-Sach, síndrome de Hunter u otro defecto metabólico, una enfermedad degenerativa de la retina u otra enfermedad del ojo.
- 45
- 50

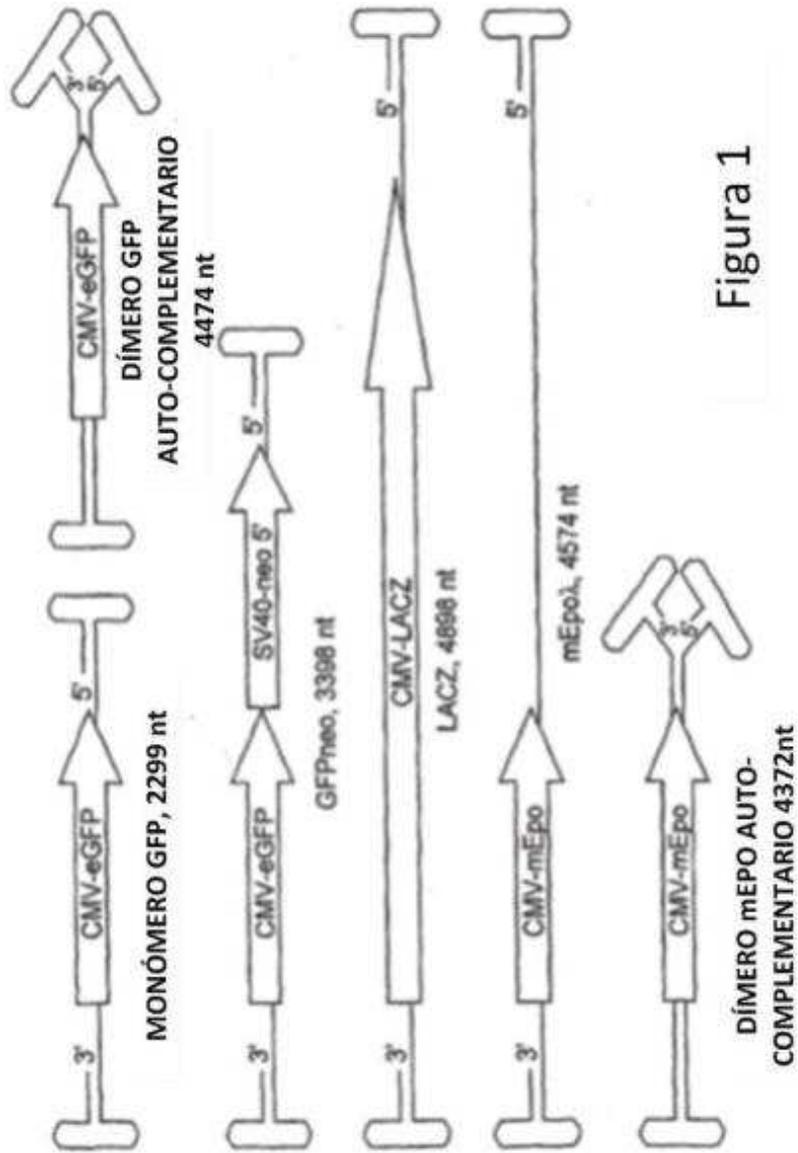


Figura 1

FIG. 2

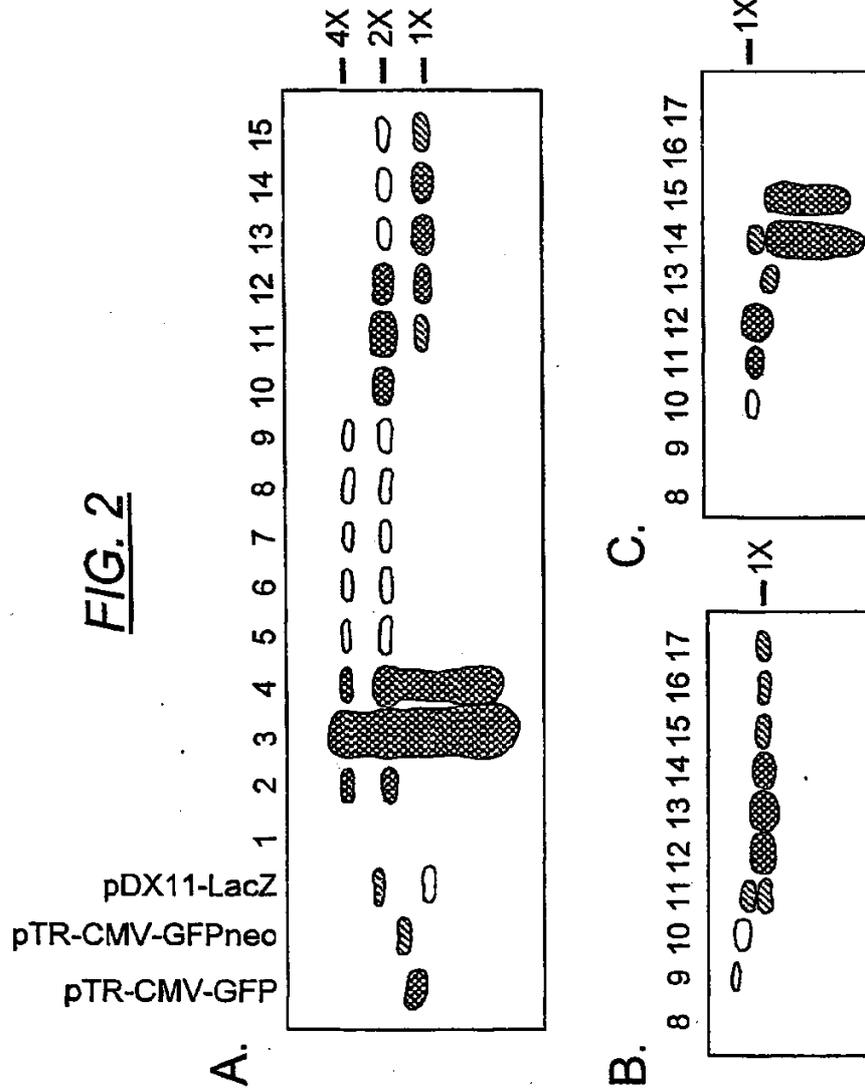


Figura 3

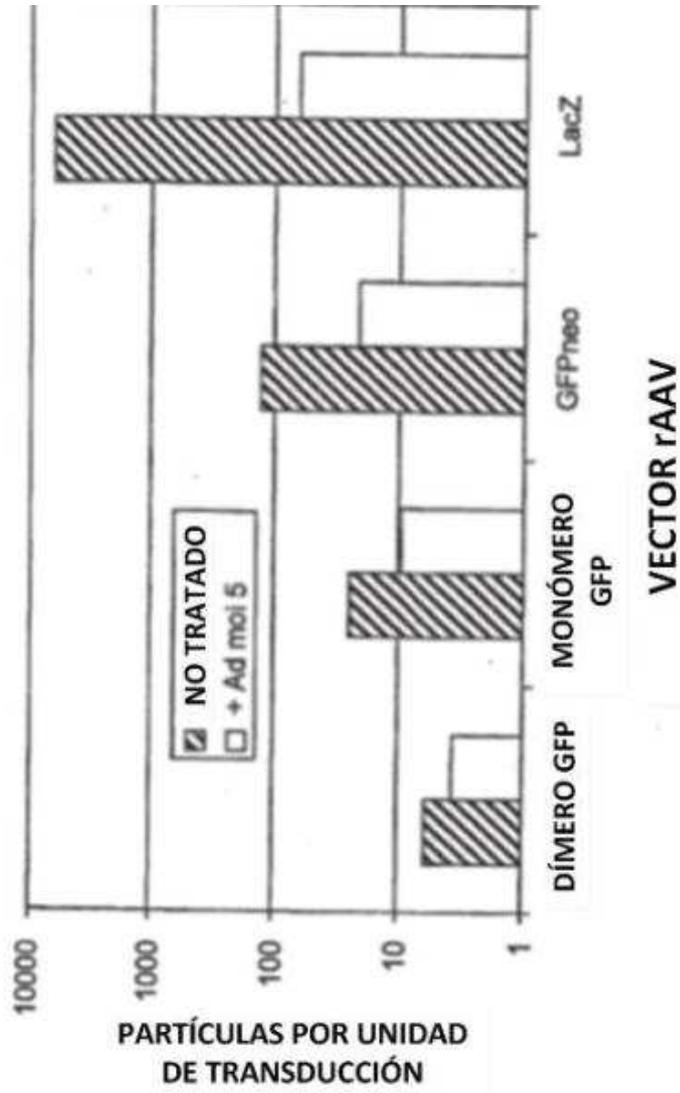


Figura 4



Figura 5

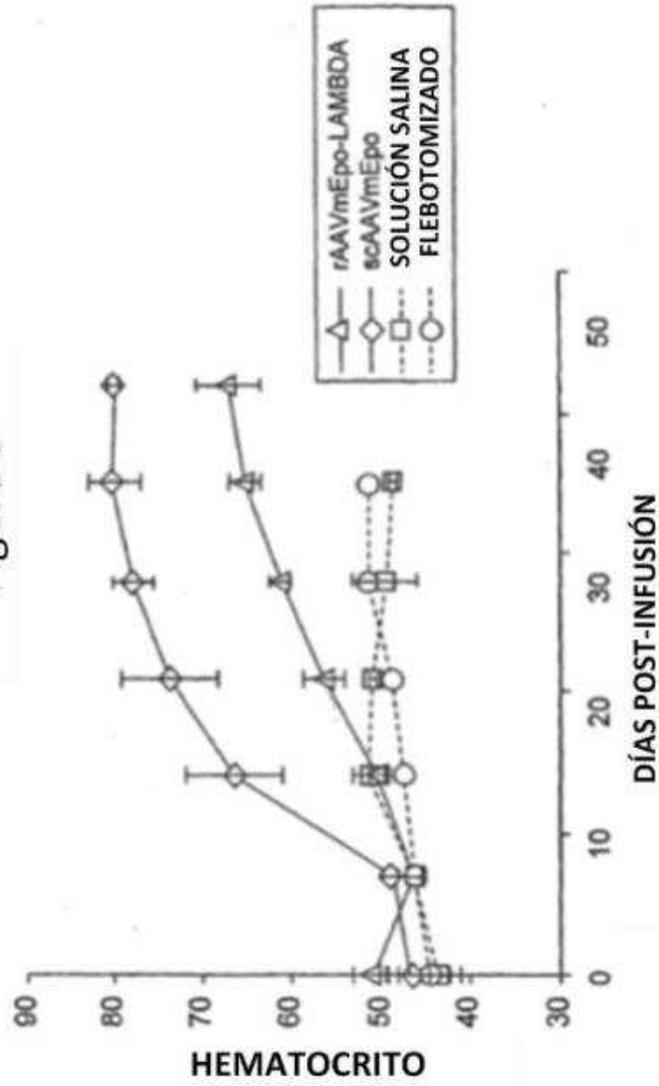


Figura 7

