

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 154**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012** **E 12000554 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2620503**

54 Título: **Parvovirus modificado útil para silenciamiento génico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.01.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARCHINI, ANTONIO;
ROMMELAERE, JEAN;
LEUCHS, BARBARA y
ILLARIONOVA, ANNA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 526 154 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

Parvovirus modificado útil para silenciamiento génico

5 La presente invención se refiere a una entidad para regular por disminución eficazmente la expresión de un gen de interés en una célula. Con este fin, la presente invención proporciona un parvovirus de roedor modificado, de replicación competente, para regular por disminución un gen diana caracterizado porque dicho parvovirus contiene un ácido nucleico específico de diana expresable que puede transcribirse en una iARN. La presente invención también proporciona células u organismos que comprenden dicho parvovirus.

10 La interferencia por ARN (iARN) no sólo ha revolucionado el procedimiento de identificación y caracterización funcional de nuevos genes, sino que representa una opción terapéutica prometedora para tratar enfermedades humanas, en particular cáncer (1, 2). El motivo de este éxito radica en la alta especificidad y eficacia de moléculas pequeñas tales como microARN (miARN) o ARN de interferencia pequeños (ARNip) tienen la capacidad de unirse a secuencias de ARNm complementarias desencadenando su degradación o bloqueando su traducción (1). Pueden diseñarse ARNip para silenciar la expresión de cualquier gen, expandiendo las posibilidades de intervención teóricamente a la totalidad del genoma. Para el cáncer, ya se ha demostrado que los ARNip (y miARN) son una herramienta poderosa en la regulación por disminución de la expresión de genes que controlan la señalización, proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia celulares (1, 2). Esta lista también incluye factores de transcripción que no pueden manipularse generalmente mediante enfoques convencionales. El silenciamiento eficaz de oncogenes mutados o genes antiapoptóticos tales como *K-Ras*, *p53* mutado, *c-myc*, *Her2/neu*, *bcl-2*, *bcr-ab1*, *survivina* y E6 del virus del papiloma humano 16 que conduce a detención y/o apoptosis celular son sólo unos cuantos ejemplos del éxito de tal enfoque en la terapia contra el cáncer al nivel preclínico [para una revisión véanse (3) y (4)].

15 La ruta de iARN se encuentra en muchas eucariotas incluyendo animales y se inicia por la enzima Dicer, que escinde moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) largas en fragmentos cortos de ~20 nucleótidos que se denominan ARNip. Cada ARNip está desenrollado en dos ARNmc monocatenarios, concretamente la hebra pasajera y la hebra guía. La hebra pasajera se degradará, y la hebra guía se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El resultado mejor estudiado es el silenciamiento génico postranscripcional, que se produce cuando la hebra guía experimenta apareamiento de bases con una secuencia complementaria de una molécula de ARN mensajero e induce escisión por la proteína Argonauta, el componente catalítico del complejo RISC. En algunos organismos se sabe que este proceso se disemina de manera sistémica a pesar de las concentraciones molares limitadas inicialmente de ARNip.

20 A pesar de su gran potencial, deben superarse varios inconvenientes para introducir exitosamente terapias a base de iARN en la práctica clínica. Éstos incluyen la evitación de efectos inespecíficos no deseados, la activación de la inmunidad innata y la semivida corta de las moléculas de ARNip con potencial de inactivación diluidas en cada ronda de división celular (5). Sin embargo, el principal obstáculo sigue siendo la administración segura y eficaz de moléculas desencadenantes de iARN en las células diana que da como resultado escasa captación celular y acumulación no específica en tejidos (2, 5).

25 Los ARN en horquilla cortos (ARNhc) son otra clase de efectores de iARN (6). Los ARNhc se transcriben en el núcleo a partir de un vector de expresión que porta un casete de expresión de ARNhc compuesto habitualmente por un promotor de ARN polimerasa II (Pol II) o III (Pol III) y una secuencia de ADN bicatenario corta con un bucle en horquilla. El transcrito de ARNhc se exporta entonces al citoplasma y se procesa como cualquier ARNip (5, 6). Se sintetizan constantemente ARNhc en las células huésped, lo que conduce a un silenciamiento génico más duradero. Sin embargo, la administración intracelular de los vectores que expresan ARNhc a través de transfección es escasamente eficaz, lo que requiere nuevos modos de administración (6). Para este fin, se han dirigido numerosos estudios hacia el aprovechamiento de virus como vehículo de transferencia para ARNhc. Esto también está favorecido por el hecho de que los casetes de ARNhc son habitualmente de tamaño pequeño y pueden insertarse generalmente en cualquier genoma viral sin afectar a la capacidad de empaquetamiento del virus. Ejemplos de viriones modificados por ingeniería genética con este fin se basan en retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus del herpes simple, virus vaccinia y poliovirus (7). Estos virus son normalmente patógenos humanos, por tanto se vuelven de replicación defectuosa a través de modificaciones genéticas de sus genomas. Esto hace que no puedan diseminarse a través del tumor. La incapacidad de propagarse también se encuentra para los virus adenoasociados (VAA) que se usan comúnmente en terapia génica y contra el cáncer y también se investigaron como candidatos para la administración de ARNhc (8, 9). También es importante mencionar que para muchos de los virus mencionados anteriormente, la exposición previa de seres humanos a infección viral que provoca anticuerpos neutralizantes protectores puede poner en peligro el tratamiento a base de virus (10).

30 Por ejemplo, se ha mostrado que es posible insertar un casete de ARNhc en un vector lentiviral y usar este vector para silenciamiento génico. Puesto que los lentivirus son patógenos humanos, se vuelven de replicación defectuosa a través de modificaciones genéticas de su genoma (24). Otro artículo describe un parvovirus Lulll con un promotor P4 modificado mediante ingeniería genética que expresa luciferasa. Puesto que el promotor P4 se ha modificado y

se expresa un transgén heterólogo mediante delección de otras partes del genoma del parvovirus, este vector pierde su capacidad de replicarse (25).

5 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar medios para regular por disminución eficazmente la expresión de un gen deseado en una célula u organismo.

Según la invención esto se consigue proporcionando la materia definida en las reivindicaciones. La presente invención describe el primer parvovirus autónomo que porta un casete de expresión de ARNhc (denominado H-1PV-silencer). Parvovirus de roedor tales como parvovirus de rata H-1PV y su homólogo de ratón virus diminuto del ratón (MVM) han atraído una gran atención por su potencial anticancerígeno dado que no son patógenos para seres humanos y tienen propiedades oncolíticas y oncosupresoras (11). La inmunidad antiviral preexistente no es habitualmente un problema para estos virus puesto que los seres humanos no se exponen normalmente a una infección por parvovirus de roedor. El genoma del parvovirus consiste en un ADN monocatenario de aproximadamente 5100 bases que contiene dos promotores, P4 y P38 que regulan la expresión de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y de la cápsida (VP1 y VP2), respectivamente. La activación del promotor P4 es una etapa crítica en el ciclo vital de PV. La actividad del promotor P4 se modula más tarde mediante su propio producto génico NS1, pero su activación inicial depende completamente de factores celulares del huésped, que se expresan principalmente durante la fase S del ciclo celular (12). Esta dependencia, junto con el hecho de que el virus no puede estimular la proliferación de células quiescentes, contribuye al oncotropismo del virus, que se replica preferentemente en células en proliferación, transformadas o malignas. Además, la citotoxicidad del parvovirus también se estimula por cambios celulares asociados con transformación neoplásica (11, 13). NS1 es la proteína tóxica viral principal (13). Se ha mostrado que H-1PV activa varias rutas de muerte en células cancerosas. En particular, dependiendo del tipo de célula y las condiciones de crecimiento, H-1PV puede inducir apoptosis (14-16), necrosis (17) o muerte celular dependiente de cathepsina B (18). Aunque el potencial anticancerígeno de los PV está respaldado por un gran conjunto de estudios preclínicos, puede esperarse que la eficacia sea un factor limitante en aplicaciones clínicas. Es posible que algunas células cancerosas sobrevivan al tratamiento con virus, provocando recidiva tumoral. El simple hecho de que estos virus se han aislado de tumores en crecimiento, indica que solos no siempre son lo suficientemente potentes como para detener el crecimiento o provocar la regresión completa de lesiones neoplásicas (13).

30 Durante los experimentos que dieron como resultado la presente invención pudo mostrarse que la inserción de un casete de ARNhc en un sitio particular del genoma del parvovirus es compatible con la capacidad de empaquetamiento del parvovirus y no interfiere con la replicación viral ni la citotoxicidad. El virus expresa altos niveles de ARNhc y es muy eficaz en el silenciamiento génico. La gran ventaja del H-IPV-silencer en comparación con vectores de replicación defectuosa reside en su capacidad para replicarse y propagarse en células en proliferación, por ejemplo, células cancerosas. Cada célula infectada/transducida podría volverse teóricamente un productor de partículas virales novedosas. Viriones de progenie a través de rondas secundarias de infección podrían diseminarse a través del tumor y suministrar eficazmente y expresar ARNhc terapéuticos. En este entorno, la señal de silenciamiento podría amplificarse más allá del inóculo inicial. Juntos, los vectores a base de parvovirus y la tecnología de ARNhc compensan las limitaciones del otro: el oncotropismo natural de parvovirus debe suministrar específica y eficazmente y mediar en la transducción de los ARNhc en células en proliferación, por ejemplo, células cancerosas, y el ARNhc por otro lado debe capacitar a los virus a destruir células (cancerosas) menos sensibles a virus. Esta invención prepara el camino para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas para tratar enfermedades como cáncer que combinan las propiedades anticancerígenas poderosas de parvovirus de roedor y moléculas desencadenantes de iARN.

Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1: Representación esquemática del pH-1PV silencer que contiene un casete de expresión de ARNhc

Se insertó el casete de iARN que consiste en el promotor H1 de ARN polimerasa III en la región no codificante del genoma en el sentido de 3' del gen de VP que codifica para las proteínas de la cápsida VP1 y VP2. Se insertaron enzimas de restricción BamHI y Not I únicas para la clonación de ARNhc. También se ilustran los promotores P4 y P38 de parvovirus. ITR, repetición terminal invertida. Figura no dibujada a escala.

55 Figura 2: Silenciamiento génico eficaz conseguido usando el vector de pH-1PV silencer

Se transfectaron células HEK 293T con los ADN indicados. Tras 12 h, se infectaron las células con Ad5-GFP y se hicieron crecer durante 48 h adicionales antes de analizarse mediante microscopía de fluorescencia para determinar la intensidad de GFP. Las barras representan el valor medio de un experimento típico realizado por triplicado con desviación estándar relativa. Se cuantificó la intensidad de GFP usando el software ImageJ que usa cinco imágenes diferentes que contienen cada una al menos 200 células (23).

60 Figura 3: Producción del H-1PV silencer

65 (A) Producción de virus. Se produjeron virus según el protocolo descrito en el ejemplo 1. Tras la purificación viral,

se cuantificaron los títulos de virus mediante qPCR en tiempo real y ensayos de placas.

(B) Ejemplo de amplificación viral a través de infección. Se infectaron células NB324K con los virus indicados. Tras 5 días, se lisaron las células, se purificaron los virus de extractos celulares y se cuantificaron los títulos de virus mediante qPCR en tiempo real y ensayos de placas.

(C) Ejemplo de ensayo de placas usando el H-1PV tn y H-1PV-sil-GFP.

Figura 4: La citotoxicidad de H-1PV intrínseca no se ve alterada tras la inserción del casete de iARN

Se sometieron a prueba células NB324K para determinar su sensibilidad a la infección por virus mediante ensayo de LDH. Se usaron virus a MOI de 1, 5 y 10 para la infección. Se realizó la medición de LDH tras 72 h de la infección.

Figura 5: Silenciamiento génico eficaz conseguido usando el H-1PV silencer

(A) Contenido de ARNhc. Se extrajeron ARNhc de células infectadas por virus o transfectadas con plásmido y se detectaron usando el kit de detección de miARN mirVana según el manual de instrucciones. + = control positivo: células transfectadas con pSilencer3.1-GFP; - = control negativo: células transfectadas con pSilencer3.1-control.

(B) qRT-PCR. Se realizó el aislamiento de ARN totales de células infectadas por virus y la síntesis de ADNc según los protocolos descritos en el ejemplo 1. Se realizaron qRT-PCR usando conjuntos de cebadores específicos para *EGFP* y *GAPDH* (usados como gen de mantenimiento).

(C) Análisis de microscopía de fluorescencia: ejemplo de una imagen representativa. Se infectaron células con H-1-sil-GFP y H-1-sil-control y luego se superinfectaron con Ad-GFP. Tras 72 horas, se analizaron las células mediante la señal de GFP de microscopía de fluorescencia. Se usó la tinción de Hoechst para la visualización de núcleos.

(D) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se infectaron células NB324K con H-1-sil-GFP y H-1-sil-control a las MOI indicadas. 12 horas más tarde, se superinfectaron las células con Ad-GFP. Se analizó el contenido de proteína EGFP mediante SDS-PAGE en los extractos celulares totales de estos cultivos celulares. Se usó β -tubulina como control de carga.

Por tanto, la presente invención proporciona un parvovirus de roedor para regular por disminución la expresión de un gen diana en una célula caracterizado porque contiene un ácido nucleico específico de diana que se inserta en una región no traducida en el sentido de 3' del gen de VP de parvovirus y puede expresarse bajo el control de un promotor o región promotora reconocible por una ARN polimerasa en la célula, en el que dicho ácido nucleico específico de diana se transcribe en una iARN, y en el que dicho parvovirus puede replicarse y propagarse en la célula.

El ácido nucleico específico de diana se inserta de tal manera que la replicación viral y la citotoxicidad no se ven afectadas.

El ácido nucleico específico de diana se inserta en el sentido de 3' del gen de VP de parvovirus que codifica para las proteínas de la cápsida del parvovirus.

El término "parvovirus" tal como se usa en el presente documento comprende virus de tipo natural, virus que se replican y derivados de replicación competente modificados de los mismos, virus provistos con CPG así como virus relacionados o vectores basados en tales virus o derivados. Pueden determinarse fácilmente parvovirus, derivados, etc. adecuados que son útiles para terapia, dentro de la experiencia de la técnica basándose en la descripción en el presente documento, sin excesivo esfuerzo empírico. Para la presente invención, se prefieren virus que pueden replicarse y propagarse en la célula huésped.

El término "gen diana" tal como se usa en el presente documento se toma para referirse a cualquier ácido nucleico de interés que está presente en una célula de un animal, hongo o protista. El gen diana puede transcribirse en un ARN biológicamente activo o puede ser parte de una molécula de ARN más grande de la que se transcriben otras partes en un ARN biológicamente activo. El gen diana puede ser un gen endógeno, puede ser un transgén que se introdujo a través de intervención humana en los ancestros de la célula, o puede ser un gen introducido en la célula por un organismo infeccioso o patógeno. El gen diana también puede ser de origen viral. Además, la secuencia que se selecciona como diana puede seleccionarse de regiones traducidas o no traducidas o regiones de intrones o preferiblemente exones, es decir, la región codificante, o la 5'UTR o 3'UTR, o una combinación de cualquiera o todas éstas.

El gen diana usado en la presente invención puede provocar una enfermedad en un organismo o puede estar implicado en la provocación de la enfermedad y es un gen en el que se requiere la reducción de la expresión génica particular para prevenir o aliviar la enfermedad. Los procesos biológicos afectados por la enfermedad que pueden

revertirse mediante regulación por disminución de la diana génica específica incluyen proliferación celular, migración o metástasis celular, apoptosis, señalización de estrés y unión celular. El/los gen(es) diana puede(n) codificar para enzimas, factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento, factores de motilidad o adhesión celular, factores del ciclo celular, supresores de tumores o inhibidores del ciclo celular.

5 El término "ácido nucleico específico de diana" tal como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que comprende al menos 15, 20, 25, 50, 100 ó 200 nt consecutivos que tiene al menos aproximadamente el 75%, particularmente al menos aproximadamente el 80%, más particularmente al menos aproximadamente el 85%, bastante particularmente de manera aproximada el 90%, especialmente de manera aproximada el 95% de identidad de secuencia con el complemento de una secuencia de nucleótidos transcrita del gen diana.

15 En la presente invención un gen diana puede regularse por disminución en una célula *in vivo* o una célula *in vitro*. La célula puede ser una célula primaria o una célula que se ha cultivado durante un periodo de tiempo o las células pueden estar compuestas por una línea celular cultivada. La célula puede ser una célula enferma, tal como una célula cancerosa o célula tumoral o una célula infectada por un virus. La célula puede ser una célula madre que da lugar a células progenitoras, células más maduras y completamente maduras de todos los linajes celulares hematopoyéticos, una célula progenitora que da lugar a células maduras de todos los linajes celulares hematopoyéticos, una célula progenitora asignada que da lugar a un linaje hematopoyético específico, una célula progenitora de linfocitos T, un linfocito T inmaduro, un linfocito T maduro, una célula progenitora mielóide o una célula de monocito/macrófago. La célula puede ser una célula madre o célula madre embrionaria. La célula puede ser una célula nerviosa, célula neural, célula epitelial, célula muscular, célula cardíaca, célula hepática, célula renal, célula madre, célula madre embrionaria o fetal.

25 Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el gen diana es un gen que provoca una enfermedad, por ejemplo, un gen de virus animal patógeno, un gen relacionado con cáncer, un oncogén, un gen antiapoptótico, un gen crítico para el crecimiento de células tumorales, metástasis, angiogénesis o quimiorresistencia, un gen inmunomodulador o un gen que codifica para una citocina, factor de crecimiento, enzima o factor de transcripción.

30 El gen diana puede ser, por ejemplo, un gen de un virus animal patógeno, por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple 1 (VHS-1), VHS-2, citomegalovirus (CMV), un virus de la hepatitis tal como virus de la hepatitis B, hepatitis C o hepatitis D, virus del papiloma, virus de ARN tales como poliovirus, VSV, virus influenza, morbilivirus o un virus de ARN bicatenario tal como un reovirus. El virus puede ser patógeno para animales distintos de seres humanos, por ejemplo virus de la glosopeda, virus de la peste bovina, virus de la lengua azul, virus de la fiebre porcina, circovirus porcino, virus de la viruela caprina, virus del Nilo Occidental, virus Henipah, virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia del pollo, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la gripe aviar, virus de la bursitis infecciosa, virus de acuicultura tales como iridovirus, paramixovirus o virus del síndrome de la mancha blanca.

40 Preferiblemente, dicho parvovirus de roedor se formula como una composición farmacéutica, en la que el parvovirus está presente en una dosis eficaz y se combina con un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no sea tóxico para el paciente al que se le administra. Se conocen bien en la técnica ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles etc. Los portadores farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales de matriz bioabsorbibles, elementos de implantación que contienen el parvovirus (agente terapéutico) o cualquier otro vehículo adecuado, medios o material(es) de administración o de dispensación. Tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis eficaz.

50 Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades de los principios activos que son suficientes para efectuar un tratamiento. Una "dosis eficaz" puede determinarse usando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase por ejemplo, Fingl *et al.*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 ((1975)).

55 La administración del parvovirus puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo mediante administración intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia. Vías de administración preferidas son administración intravenosa (i.v.), intratumoral o endobronquial. Si se usan partículas de virus infecciosas que tienen la capacidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento podría realizarse o al menos iniciarse mediante inyección intravenosa de, por ejemplo, virus H1.

65 El régimen de dosificación del parvovirus puede determinarse fácilmente dentro de la técnica, por el médico encargado basándose en datos, observaciones y otros factores clínicos del paciente, incluyendo por ejemplo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el parvovirus modificado particular, etc. que va a administrarse, el momento y la vía de administración, el tipo de tumor mesenquimatoso, la salud general del

paciente y otras terapias farmacológicas a las que el paciente está sometiéndose.

5 Como otra técnica de administración específica, el parvovirus puede administrarse al paciente desde una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, por ejemplo, de silicona u otro material biocompatible, puede conectarse a un depósito subcutáneo pequeño (depósito Rickham) instalado en el paciente, por ejemplo, durante la eliminación del tumor, o mediante un procedimiento separado, para permitir que el parvovirus se inyecte localmente en diversos momentos sin intervención quirúrgica adicional. El parvovirus también puede inyectarse en un tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante técnicas de direccionamiento de neuronavegación.

10 La administración del parvovirus también puede realizarse mediante infusión continua de partículas virales o líquidos que contienen partículas virales a través de catéteres implantados a bajas velocidades de flujo usando sistemas de bombas adecuados, por ejemplo, bombas de infusión peristálticas o bombas de administración potenciada por convección (CED, *convection enhanced delivery*).

15 Aún otro método de administración del parvovirus es desde un dispositivo implantado construido y dispuesto para dispensar el parvovirus al tejido deseado. Por ejemplo, pueden emplearse obleas que se han impregnado con el parvovirus, por ejemplo, parvovirus H1, en las que la oblea está unida a los extremos de la cavidad de resección al término de la eliminación quirúrgica del tumor. Pueden emplearse obleas múltiples en tal intervención terapéutica. Pueden inyectarse células que producen activamente el parvovirus, por ejemplo, parvovirus H1, en el tumor, o en la cavidad tumoral tras la eliminación de tumor.

25 En una realización preferida adicional de la presente invención, el parvovirus de roedor es parvovirus H1 (H1PV) o un parvovirus relacionado tal como Lull, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de rata (RPV) o virus de rata (RV).

30 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el ácido nucleico específico de diana se inserta en el nucleótido 4683 del genoma de H-1PV de tipo natural. Sin embargo, también se considera la inserción del casete en otras regiones del genoma del parvovirus así como otras moléculas desencadenantes de iARN tales como microARN y/o oligonucleótidos antisentido. En una realización particularmente preferida adicional de la presente invención, el promotor o región promotora reconocible por ARN polimerasas son promotores de ARN polimerasa II (Pol II) tales como por ejemplo promotores de CMV y ubiquitina C humana o ARN polimerasa III (Pol III) tales como U6, H1, 7SK y ARNt. Un ejemplo de un promotor de ARN polimerasa III (Pol III) particularmente preferido es el promotor H1 de ARN polimerasa III.

35 En una realización particularmente preferida adicional de la presente invención, el ácido nucleico específico de diana es un ARNhc. Un ARNhc es un ARN en horquilla pequeño o un ARN en horquilla corto que es una secuencia de ARN que produce un giro en horquilla cerrado que puede usarse para silenciar la expresión génica por medio de interferencia por ARN. La estructura de horquilla del ARNhc se escinde mediante la maquinaria celular para dar ARNip, que luego se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este complejo se une a y escinde los ARNm que corresponden al ARNip que está unido al mismo.

40 En una realización particularmente preferida adicional de la presente invención, el ácido nucleico específico de diana, por ejemplo, ARNhc, tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos.

45 La presente invención también se refiere a un parvovirus de roedor tal como se caracterizó anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por un gen de virus animal patógeno, un gen relacionado con cáncer, un oncogén, un gen antiapoptótico, un gen crítico para el crecimiento de células tumorales, metástasis, angiogénesis o quimiorresistencia, o una enfermedad asociada con la expresión aberrante de un gen inmunomodulador o un gen que codifica para una citocina, factor de crecimiento, enzima o factor de transcripción.

50 En una realización preferida, dicho parvovirus puede usarse para tratar un tumor, preferiblemente para tratar un tumor cerebral.

55 En una realización preferida adicional, dicho parvovirus puede usarse para el tratamiento de un tumor caracterizado porque las células de dicho tumor son resistentes a la quimioterapia y/o la radioterapia.

60 Los pacientes que pueden tratarse mediante el parvovirus según la invención incluyen seres humanos así como animales no humanos. Los ejemplos de estos últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

65 La presente invención también proporciona una célula de un animal, hongo o protista que comprende un parvovirus tal como se describió anteriormente en el presente documento. En una realización, la célula está *in vitro*. La célula es preferiblemente una célula de animal, una célula humana aislada, una célula humana *in vitro*, una célula de vertebrado no humano, una célula de mamífero no humano, célula de pez, célula de res, célula de cabra, célula de cerdo, célula de oveja, célula de roedor, célula de hámster, célula de ratón, célula de rata, célula de cobaya, célula de conejo, célula de primate no humano, célula de nematodo, célula de crustáceo, célula de gamba, célula de

cangrejo, célula de langosta, célula de insecto, célula de mosca de la fruta, célula de insecto coleóptero, célula de insecto díptero, célula de insecto lepidóptero o célula de insecto hemíptero.

Finalmente, la presente invención también proporciona un animal, hongo o protista no humano, transgénico que comprende un parvovirus tal como se describió anteriormente en el presente documento. Pueden producirse animales no humanos transgénicos mediante la inyección del parvovirus en el pronúcleo de un ovocito no humano fertilizado, mediante trasplante de células no humanas, preferiblemente células indiferenciadas no humanas en un embrión no humano en desarrollo para producir un embrión quimérico, trasplante de un núcleo de una célula recombinante no humana en un embrión enucleado no humano u ovocito no humano activado y similares. Métodos para la producción de animales transgénicos están bien establecidos en la técnica y, por ejemplo, se describen en la patente estadounidense 4.873.191.

Los ejemplos a continuación explican la invención en más detalle.

15 Ejemplo 1

Materiales y métodos

20 (A) Cultivo celular

Se hicieron crecer células NB324K y HEK293T en medio esencial mínimo (MEM) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) respectivamente, complementados con suero de ternero fetal al 5 (MEM) o al 10% (DMEM), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM (todos de Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Se mantuvieron todas las células a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂, el 95% de humedad.

(B) Construcción de plásmidos

Se clonó el casete de expresión de ARNhc H1 de Pol III en los plásmidos pSR19 (19) y ΔpSR19 (20). El primero contiene la totalidad del genoma de H-1PV tn y el segundo una versión con delección que carece de los nucleótidos 2022-2135 (que codifican para la región del extremo C-terminal de la proteína NS2 de parvovirus). Se usó el sitio de enzima de restricción HPAI (nucleótidos 4687-4693 según la secuencia de referencia del NCBI NC_001358.1) para la clonación. Se amplificó el casete mediante PCR usando como ADN molde el vector pSilencer3.1 (Ambion, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) y los siguientes cebadores Dir H1 POL III 5'-GTTAACGAATTCATATTTGCATGT-3' e INV H1 POL III 5'-GTTAACGCGCCGCGGATCCGAGTGGTCTCATACAGAAC-3'. El casete contiene los sitios de restricción únicos BamH1-NotI para una clonación fácil de los ARNhc en el plásmido. Se nombraron los dos plásmidos pH-1PV-silencer 1 y pH-1PV-silencer 2. Para la clonación del ARNhc se usaron los siguientes pares de oligonucleótidos: hebra superior de ARNhc-EGFP 5'-GATCCGCTGGAGTACAACACTACAACCTCAAGAGAGTTGTAGTTGTACT CCAGCTTTTTTGGAAAGC-3' y hebra inferior de ARNhc-EGFP 5'-GGCCGCTTCCAAAAAGCTGGAGTACAACACTACTCTTGAAGTTGTAGTTGTACTCCAG CG-3'; hebra superior de control negativo de ARNhc 5'-GATCCACAGCAGAGCAGATCGTTCTTCAAGAGAGAACGATCTGCTCTGCTGTTTTTGGAAAGC-3' y hebra inferior de control negativo de ARNhc 5'-GGCCGCTTCCAAAAACAGCAGAGCAGATCGTTCTTCTTGAAGAACGATCTGCTCTGCTGTG-3'. Se aparearon los oligonucleótidos a 96°C y se clonaron directamente en los plásmidos pH-1PV-silencer 1 y 2 previamente digeridos con BamH1-NotI. También se usó un enfoque similar para la clonación de los ARNhc en el vector pSilencer3.1-H1 puro (Ambion). En este caso se usaron los sitios de restricción BamHI/HindIII y los siguientes oligonucleótidos solapantes: hebra superior de ARNhc-EGFP Ambion: 5'-GATCCGCTGGAGTACAACACTCAAGAGAGTT GTAGTTGTACTCCAGCTTTTTTGGAAA-3' y hebra inferior de ARNhc-EGFP Ambion 5'-AGCTTTTCCAAAAAGCTGGAGTACAACACTACTCTTGAAGTTGTAGTTGTACTCCAGC G-3'; hebra superior de control negativo de ARNhc Ambion 5'-GATCCACAGCAGAGCAGATCGTTCTTCAAGAGAGAACGATCTGCTCTGCTGTTTTTGGAAA-3' y hebra inferior de control negativo de ARNhc Ambion 5'-AGCTTTTCCAAAAACAGCAGAGCAG ATCGTTCTTCTTGAAGAACGATCTGCTCTGCTGTG-3'. Se propagaron todos los clones en la cepa SURE de *Escherichia coli* (Invitrogen, Darmstadt, Alemania) y se verificó el ADN mediante secuenciación.

(C) Producción y titulación de virus

Se produjeron todos los virus en células HEK293T. Se cultivaron las células en frascos de cultivo T75 y se transfectaron de manera transitoria a una confluencia del 12,5% con 4-10 µg/frasco de plásmido viral. Tras 4 días, se recogieron las células dentro de su medio y se lisaron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación. Se amplificaron adicionalmente los virus producidos infectando células NB324K y se purificaron a través de centrifugación en gradiente de iodixanol (21). Se realizó la titulación viral mediante qPCR y ensayo de placas según (22) y se expresó o bien como genoma viral (Gv) o bien como unidad formadora de placas (UFP) por ml.

(D) Transfección de plásmido viral

5 Para el experimento descrito en la figura 2, se hicieron crecer células HEK293T en una placa de 10 cm y se transfectoraron a una confluencia de aproximadamente el 40% usando FuGENE HD (Roche, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 2 pg de ADN en medio libre de suero hasta una concentración final de 20 ng/μl y luego se añadieron 7,5 μl de Fugene a la mezcla. Tras 30 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió la mezcla gota a gota a las células.

10 (E) Infección por virus

15 Para los experimentos descritos en la figura 4, se sembraron $1,5 \times 10^5$ células NB324K en placas de 6 pocillos y se incubaron durante la noche antes de infectarse con H-1PV tn, H-1PV-silencer-GFP o H-1PV-silencer-control, si no se especifica de manera diferente, a la MOI de 5 (UFP/célula). 12 horas tras la infección, se superinfectaron las células con adenovirus, que expresaba la proteína EGFP usado a una MOI de 80 unidades de transducción fluorescentes verdes (GFU)/célula y se hicieron crecer durante 72 horas adicionales antes de procesarse.

(F) Ensayo de LDH

20 Se determinó la actividad lítica de virus mediante el ensayo de LDH (CytoTox 96; Promega, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se sembraron células NB324K en placas de 96 pocillos (2.500 células/pocillo) en 50 μl de medio. Tras 24 h, se infectaron las células añadiendo 50 μl adicionales de medio que contenía el virus a la MOI de 5 (ufp/célula). A las 72 h tras la infección, se procesaron las células para la determinación de la liberación de LDH. Se midieron los cambios colorimétricos usando un lector de microtitulación a 492 nm.

25

(G) Extracción y detección de ARNhc

30 Se llevó a cabo la extracción de ARNhc de células NB324K infectadas por parvovirus usando el kit de aislamiento de miARN mirVana (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Alemania), según el protocolo del fabricante. Se realizó la detección de ARNhc usando el kit de detección de miARN mirVana (Ambion) tal como se describe en el manual de instrucciones.

(H) Extracción de ARN y preparación de ADNc

35 Se aisló el ARN total de células usando el kit de purificación de ARN RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania). Se realizó la síntesis de ADNc usando el kit de RT-PCR QuantiTect Probe (Qiagen) según el protocolo del fabricante usando cebadores hexaméricos al azar (Promega), con (+RT) o sin (-RT) adición de ADN polimerasa Hot-StarTaq.

(I) PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

40

45 Se realizó la QRT-PCR usando un sistema de detección de secuencias TaqMan ABI Prism 7600 (Applied Biosystems, Alemania) usando mezcla madre para PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems, Alemania). Para normalizar cada muestra para el control de ARN, se usó el gen de mantenimiento GAPDH como gen control. Se realizaron PCR usando los siguientes cebadores: GapdDir 5'-AGCAACTCCCCTCTTCCACCTT-3', GapdInv 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTCAT-3', EGFPDir 5'-CCACTACCTGAGCACCCAGTC-3', EGFPInv 5'-CACGAACTCCAGCAGGACCA-3'.

(J) Inmunotransferencia de tipo Western

50 Se tripsinizaron células infectadas con H-1PV-sil-GFP, H-1PV-sil-control y H-1PV de tipo natural y se lavaron dos veces con PBS. Se lisó el sedimento celular en 500 μl de tampón de lisis que consistía en Tris 50 mM-HCl pH 8, NaCl 200 mM, NP-40 al 0,5%, DTT 1 mM, glicerol al 10% y una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania) y se mantuvieron en hielo durante 20 min. Tras la centrifugación (10.000 rpm x 10 min) se recogió el sobrenadante y se midió la cantidad de proteína mediante el ensayo BCA (Perkin Elmer) según el manual del fabricante. Se cargaron los extractos celulares totales (30 μg) y se separaron en geles de SDS al 12% y se transfirieron sobre membrana Hybond-P (GE Healthcare) mediante inmunotransferencia en húmedo (Invitrogen, X-Cell Sure Lock). Se bloquearon las membranas en PBS, Tween 20 al 0,05%, leche desnatada en polvo al 5% durante 1 h a TA. Se incubaron las transferencias con los siguientes anticuerpos primarios durante la noche a 4°C: GFP de conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Alemania), β-tubulina de ratón (Sigma Life Science, Hamburgo, Alemania). Tras el lavado de la membrana se añadió el anticuerpo de cabra anti-conejo o de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las membranas y se visualizaron con el kit de detección Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, Rodgan, Alemania).

65 (K) Microscopía fluorescente

Se hicieron crecer células NB324K en placas de 6 pocillos y luego se infectaron tal como se describió anteriormente. Tras 72 h, se lavaron las células dos veces con 1xPBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) a 4°C y se lavaron de nuevo con PBS. Se realizó la tinción de núcleos usando el colorante Hoechst 33342. Se examinaron las células fijas con el microscopio fluorescente Leica DMIL. Se cuantificó la intensidad de GFP usando el software ImageJ (23).

Ejemplo 2

10 Construcción de H-1PV de replicación competente para el suministro y la expresión de ARNhc

Se concibió una estrategia para generar un virus H-1PV de replicación competente que alberga un casete de expresión de ARNhc. Para la expresión de ARNhc se empleó el promotor H1 de ARN polimerasa III (tamaño total de 170-180 bases) debido a la capacidad de empaquetamiento de ADN limitante de los PV (máx. 300 pb) que lo más probablemente no tolerarían la inserción de otros casetes. Con el fin de evitar que la inserción altere cualquier ORF viral, se decidió incorporar el casete en la región no traducida de H-1PV en el sentido de 3' del gen de VP (que codifica para las proteínas de la cápsida), concretamente en el nucleótido 4683 (sitio de enzima de restricción HpaI dentro del genoma de parvovirus). Se introdujeron sitios de restricción únicos para facilitar la clonación de ARNhc en el casete usando oligonucleótidos apareados con proyecciones apropiadas (figura 1). Se usaron dos estructuras principales de parvovirus diferentes para la inserción del casete, la pSR19 que contenía el genoma de H-1PV de longitud completa (19) y la H-1 dr que contenía una delección que abarcaba los nucleótidos 2022-2135 (20). Esta delección no interfiere con la replicación del parvovirus ni la infección de células humanas y por tanto proporciona un espacio genético un poco más grande para la inserción de un transgén foráneo. Se nombraron los nuevos plásmidos pH-1PV Silencer 1 y pH-1PV Silencer 2. Los resultados presentados en el presente documento se refieren al pH-1PV Silencer 2 (abreviado pH-1sil a continuación en el presente documento) pero también se obtuvieron resultados similares usando el otro plásmido. Con el fin de someter a prueba la eficacia del nuevo plásmido para inducir silenciamiento génico, se introdujeron ARNhc dirigidos contra el gen que codifica para la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) (pH-1sil-GFP) y ARNhc control (una secuencia de ARNhc desordenada que no reconoce ninguna secuencia génica conocida) (pH-1sil-control) y se transfectaron de manera transitoria los dos plásmidos en células HEK293T. Como controles positivo y negativo se usó un plásmido disponible comercialmente, concretamente el pSilencer3.1 (Ambion, Austin, Texas, EE.UU.) que portaba la misma EGFP o ARNhc desordenados. 16 horas tras la transfección, se infectaron células con virus Ad 5 recombinante que portaba el gen *EGFP*. Entonces se analizaron las células bajo un microscopio de fluorescencia. De manera similar al plásmido pSilencer3.1, pH-1sil-GFP era muy eficaz en el silenciamiento de *EGFP*, reduciendo su expresión en más del 60% (figura 2).

Se usaron los dos plásmidos pH-1sil para la producción de parvovirus en comparación con el plásmido H-1PV original (tn) (pSR19) según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Se produjeron virus H-1PV tn y mutante a títulos similares indicando que la inserción del casete no interfería la aptitud biológica global del virus (figura 3A). Ensayos de placas y de LDH en células NB324K confirmaron la capacidad de los virus que contenían ARNhc para replicarse e inducir lisis celular (figuras 3B-C y figura 4). Se nombraron los nuevos virus H-1PV-sil-GFP y H-1PV-sil-control.

Ejemplo 3

45 El virus H-1PV-sil expresa ARNhc

A continuación, se demostró la capacidad del virus H-1PV-sil para expresar ARNhc. Se infectaron células NB324K con H-1PV-sil-GFP y H-1PV tn (usado como control negativo). Como control positivo para la expresión de ARNhc se transfectaron las células con el vector de ARNhc-EGFP pSilencer3.1. Tras 72 horas, se analizaron las células para determinar el contenido de ARNhc-GFP. Se detectaron altos niveles de ARNhc en células infectadas por H-1PV-sil-GFP (figura 5A).

Ejemplo 4

55 El virus H-1PV-sil puede reducir la expresión de EGFP

A continuación, se examinó la capacidad de H-1PV-silencer para inactivar la expresión de *EGFP*. Se infectaron células NB324K con virus H-1PV-sil-GFP o H-1PV-sil-control y 12 horas más tarde se superinfectaron con Ad5 que expresaba proteína EGFP. Se hicieron crecer las células durante 72 h adicionales antes de procesarse para la extracción de ARN. La PCR cuantitativa en tiempo real mostró que se redujo drásticamente la expresión de EGFP en células infectadas con H-1-sil-GFP en más del 80% en comparación con la expresión encontrada en virus control (figura 5B).

65 Se realizó un experimento similar para comprobar la eficacia del silenciamiento al nivel de proteínas. Los análisis de inmunofluorescencia e inmunotransferencia de tipo Western confirmaron ambos que H-1PV-silencer-GFP, pero no el

virus control, era muy eficaz en el silenciamiento de la expresión de *EGFP* y que lo hace de una manera dependiente de la dosis (figuras 5C y D).

5 Conjuntamente estos resultados proporcionan una prueba de concepto de que H-1PV o sus derivados pueden usarse como vehículo para el suministro de ARNhc.

Bibliografía

10 1. Petrocca F y Lieberman J J Clin Oncol 29, 747-754.

2. Wang Z, Rao DD, Senzer N y Nemunaitis J Pharm Res.

3. Gartel AL y Kandel ES (2006) Biomol Eng 23, 17-34.

15 4. Takeshita F y Ochiya T (2006) Cancer Sci 97, 689-696.

5. Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G y Sood AK Nat Rev Cancer 11, 59-67.

6. Snove O, Jr. y Rossi JJ (2006) Nat Methods 3, 689-695.

20 7. Sliva K y Schnierle BS Virol J 7, 248.

8. Grimm D, Pandey K y Kay MA (2005) Methods Enzymol 392, 381-405.

25 9. Grimm D y Kay MA (2007) Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 473-481.

10. Power AT y Bell JC (2007) Mol Ther 15, 660-665.

30 11. Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR y Raykov Z (2010) Cytokine Growth Factor Rev 21, 185-195.

12. Cotmore SF y Tattersall P (2007) Adv Virus Res 70, 183-232.

35 13. Cornelis JJ, Lang SI, Stroh-Dege AY, Balboni G, Dinsart C y Rommelaere J (2004) Curr Gene Ther 4, 249-261.

14. Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, Sugiyama F, Nakajima T, Fukamizu A y Yagami K (1998) J Gen Virol 79 (Pt 12), 3067-3071.

40 15. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J y Dinsart C (1998) J Virol 72, 8893-8903.

16. Ueno Y, Harada T, Iseki H, Ohshima T, Sugiyama F y Yagami K (2001) J Virol 75, 3965-3970.

17. Ran Z, Rayet B, Rommelaere J y Faisst S (1999) Virus Res 65, 161-174.

45 18. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L y Rommelaere J (2007) J Virol 81, 4186-4198.

19. Kestler J, Neeb B, Struyf S, Van Damme J, Cotmore SF, D'Abramo A, Tattersall P, Rommelaere J, Dinsart C y Cornelis JJ (1999) Hum Gene Ther 10, 1619-1632.

50 20. Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, Jauniaux JC, Rhode SL y Rommelaere J (1995) J Virol 69, 4538-4543.

21. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ y Muzyczka N (1999) Gene Ther 6, 973-985.

55 22. El-Andaloussi N, Endelev M, Leuchs B, Bonifati S, Kleinschmidt J, Rommelaere J y Marchini A (2011) Cancer Gene Ther 18, 240-249.

60 23. Rasband WS (1997-2011.) U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU., <http://imagej.nih.gov/ij/>.

24. ABBAS-TERKI T ET AL: "Lentiviral-mediated RNA interference", HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NUEVA YORK, NY, EE.UU., vol. 13, n.º 18, 10 de diciembre de 2002 (10-12-2002), páginas 2197-2201, XP002978528, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/104303402320987888

65

25. BASE DE DATOS BIOSIS [en línea] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFIA, PA, EE.UU.; 1996, MAXWELL I H *ET AL*: "Autonomous parvovirus transduction of a gene under control of tissue-specific or inducible promoters", número de registro de la base de datos PREV199698727175

REIVINDICACIONES

1. Parvovirus de roedor para regular por disminución la expresión de un gen diana en una célula caracterizado porque contiene un ácido nucleico específico de diana que se inserta en una región no traducida en el sentido de 3' del gen de VP de parvovirus y puede expresarse bajo el control de un promotor o región promotora reconocible por una ARN polimerasa en la célula, en el que dicho ácido nucleico específico de diana puede transcribirse en una iARN, y en el que dicho parvovirus puede replicarse y propagarse en la célula.
2. Parvovirus según la reivindicación 1, en el que el gen diana es un gen que provoca una enfermedad.
3. Parvovirus según la reivindicación 2, en el que el gen que provoca una enfermedad es un gen de virus animal patógeno, un gen relacionado con cáncer, un oncogén, un gen antiapoptótico, un gen crítico para el crecimiento de células tumorales, metástasis, angiogénesis o quimiorresistencia, un gen inmunomodulador o un gen que codifica para una citocina, factor de crecimiento, enzima o factor de transcripción.
4. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho parvovirus de roedor es Lulll, virus diminuto de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de rata (RPV), virus de rata (RV) o H1 (H-1PV).
5. Parvovirus de roedor según la reivindicación 4, en el que el ácido nucleico específico de diana se inserta en el nucleótido 4683 del genoma de H-1PV de tipo natural.
6. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el promotor o región promotora reconocible por una ARN polimerasa de la célula es un promotor de ARN polimerasa II (Pol II) o III (Pol III).
7. Parvovirus según la reivindicación 6, en el que el promotor de ARN polimerasa III (Pol III) es el promotor H1 de ARN polimerasa III.
8. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido nucleico específico de diana es un ARNhc.
9. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el ácido nucleico específico de diana tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos.
10. Parvovirus de roedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por un gen de virus animal patógeno, un gen relacionado con cáncer, un oncogén, un gen antiapoptótico, un gen crítico para el crecimiento de células tumorales, metástasis, angiogénesis o quimiorresistencia, o una enfermedad asociada con la expresión aberrante de un gen inmunomodulador o un gen que codifica para una citocina, factor de crecimiento, enzima o factor de transcripción.
11. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según la reivindicación 10 caracterizado porque el uso es para tratar un tumor.
12. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según la reivindicación 11 caracterizado porque el tumor es un tumor cerebral.
13. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según la reivindicación 11 ó 12 caracterizado porque las células de dicho tumor son resistentes a la quimioterapia y/o la radioterapia.
14. Parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 caracterizado porque dicho parvovirus se administra mediante administración intravenosa (i.v.), intratumoral o endobronquial.
15. Célula que contiene un parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
16. Animal no humano transgénico que comprende una célula según la reivindicación 15.

Figura 1

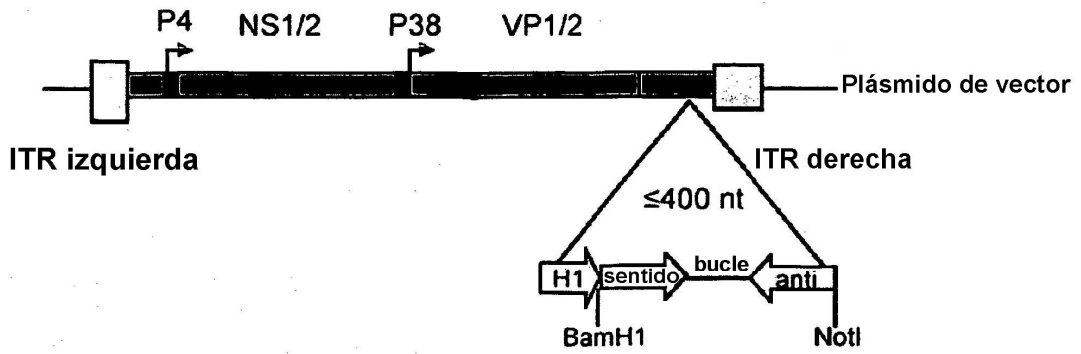


Figura 2

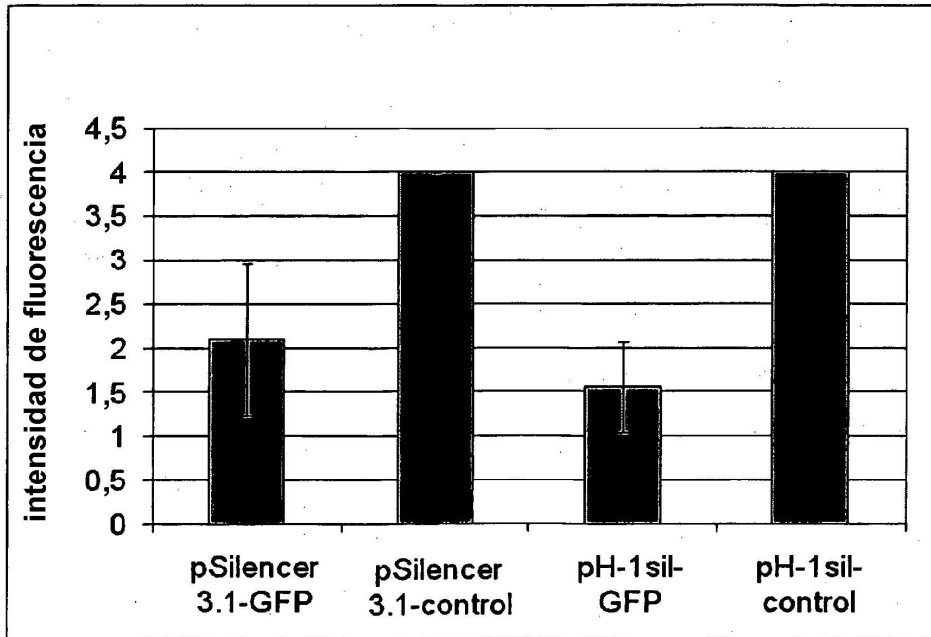


Figura 3 A

Producción mediante transfección en células HEK293T

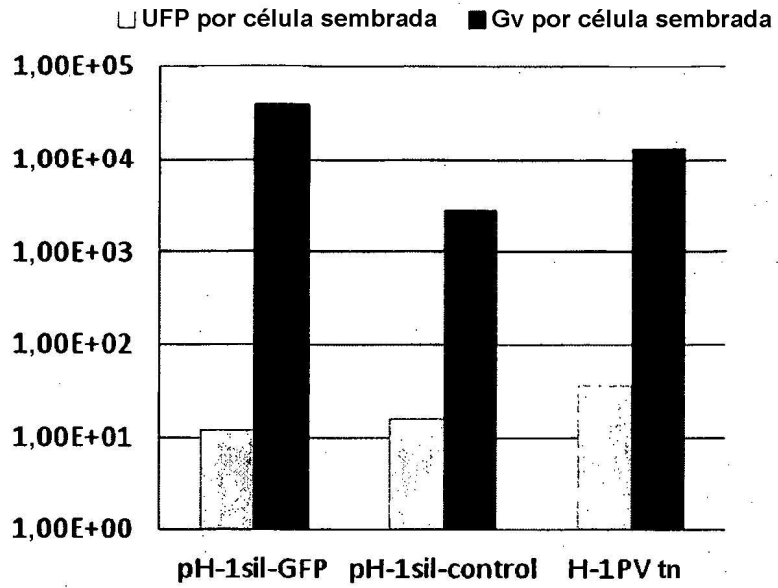


Figura 3 B

Producción mediante infección en células NB324K

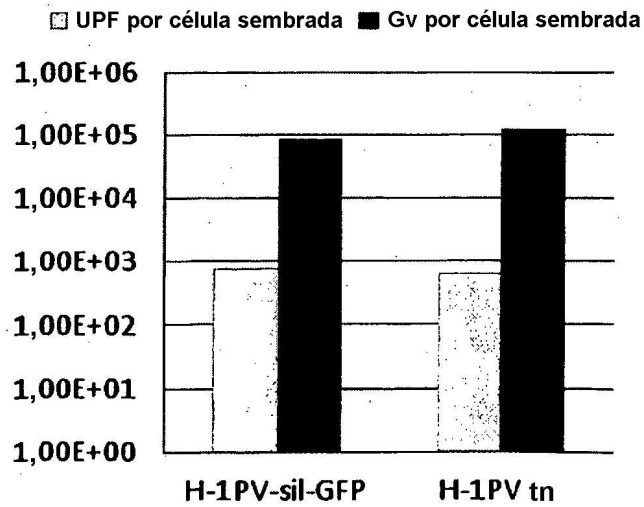


Figura 3 C

Ensayo de placas

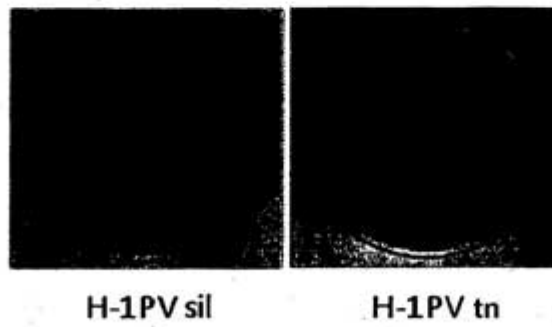


Figura 4

Citotoxicidad

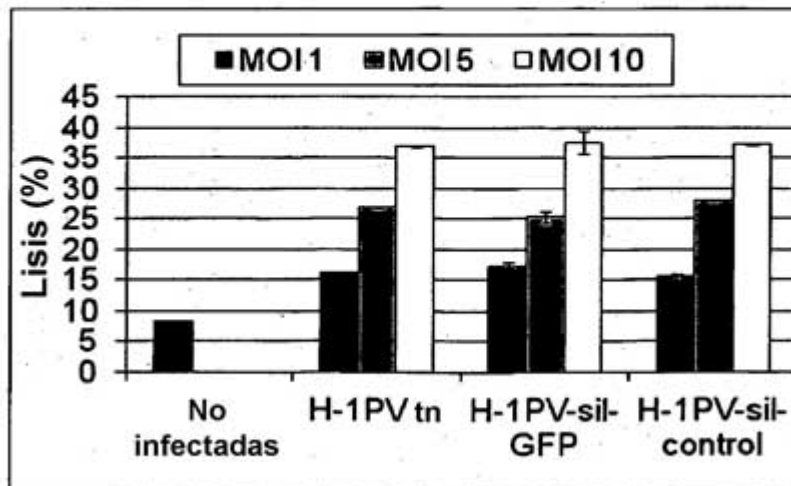


Figura 5 A

Expresión de ARNhc

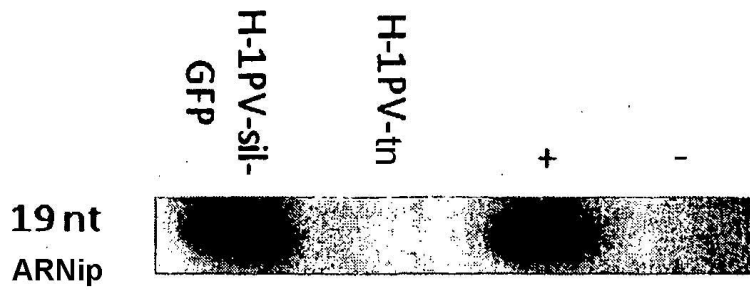


Figura 5 B

qRT-PCR

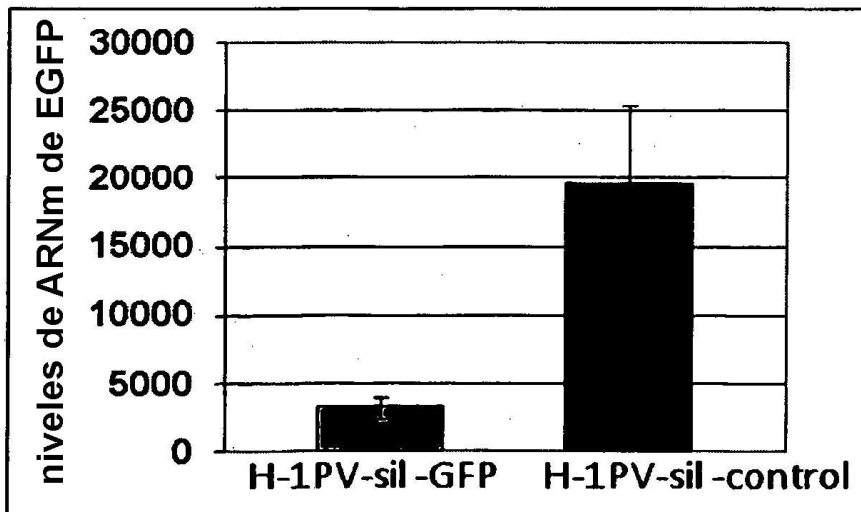


Figura 5 C

Fluorescencia

Fluorescencia de GFP Tinción de Hoechst

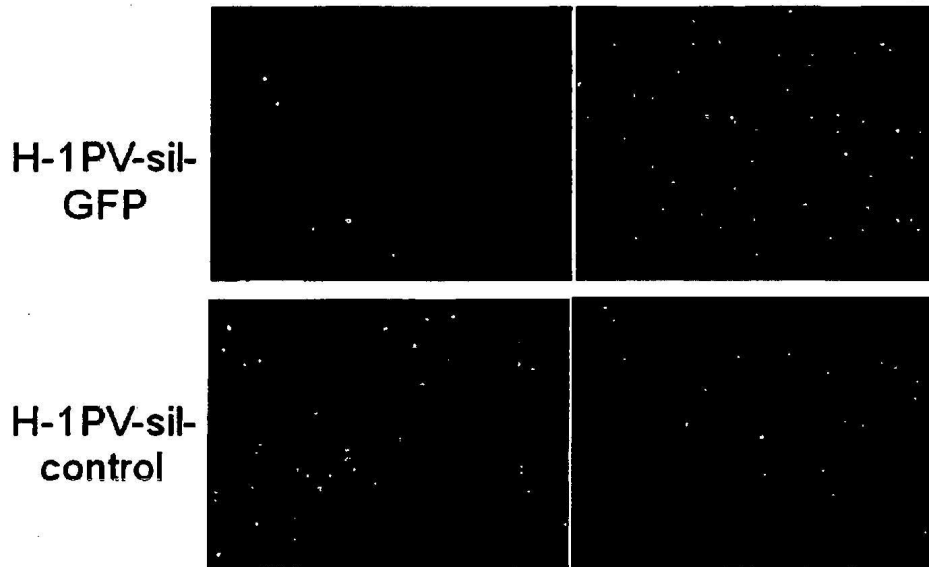


Figura 5 D

