

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 990**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10716326 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2421982**

54 Título: **Método para la producción de partículas de vector poliomavírico recombinante**

30 Prioridad:

22.04.2009 EP 09158498

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

22.10.2015

73 Titular/es:

AMARNA HOLDING B.V. (100.0%)

**J.H. Oortweg 21
2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:

DE VRIES, WALTER GERHARDUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 548 990 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

Método para la producción de partículas de vector poliomavírico recombinante.

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos mejorados para la producción de partículas víricas, vectores víricos y partículas de vectores víricos. En particular, la descripción proporciona métodos mejorados para la producción de partículas de vector poliomavírico recombinante y estirpes celulares productoras de vector poliomavírico. Más en particular, la descripción proporciona métodos para la producción de vectores poliomavíricos de simio tales como
10 comprenden vectores víricos y usa los mismos y partículas de vector vírico para tratar trastornos genéticos, rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, alergias o cáncer.

Antecedentes de la invención

15 A lo largo de la última década, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de las tecnologías de suministro de genes o ácidos nucleicos eficaces para la introducción y expresión apropiada de genes o ácidos nucleicos en células diana. Se pueden usar genes o ácidos nucleicos terapéuticos para restituir genes con funcionamiento inadecuado para tratar trastornos genéticos, para inducir una respuesta inmunitaria para tratar cáncer y enfermedades infecciosas o suprimir una respuesta inmunitaria, por ej., induciendo/restituyendo la tolerancia inmunitaria para evitar el rechazo de trasplantes o para tratar enfermedades autoinmunitarias y alergias. Los genes o ácidos nucleicos terapéuticos se pueden administrar como moléculas desnudas o como ácidos nucleicos empaquetados en compuestos lipídicos y/o proteínicos.

20 Puesto que los virus evolucionan para suministrar y expresar su información genética en sus células diana huésped, se han explorado vectores víricos como vehículos de suministro de genes y se encontró que son con diferencia los medios más eficaces para suministrar información genética a una célula viva. Se ha desarrollado y ensayado una serie de sistemas de suministro de genes de vectores víricos en ensayos preclínicos y clínicos. Estos ensayos revelaron que los vectores usados en la actualidad, que proceden de adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus, retrovirus, parvovirus y poliomavirus, son en general seguros de usar y eficaces en el suministro de genes terapéuticos a células diana.

30 Una desventaja principal de los vectores de suministro de genes víricos usados en la actualidad es el hecho de que no se pueden producir en suficientes cantidades para tratar números significativos de pacientes. La mayoría de los vectores víricos es producida por transfección de células productoras con ADN de plásmido que codifica el vector y los componentes del vector. Esto en general proporciona 1 a 10 millones de partículas de vector por mililitro de volumen de cultivo celular. En ensayos clínicos, en general, se tienen que administrar 1×10^{10} a 1×10^{12} partículas de vector a un paciente para conseguir efectos clínicos beneficiosos. Esto significa que para tratar 1.000 pacientes, se requiere más de 1 millón de litros de cultivo celular para proporcionar suficientes cantidades de partículas de vector.

35 Además, los ensayos preclínicos y clínicos revelaron que la mayoría de los vectores de suministro de genes víricos ensayados tales como vectores adenovírico, poxvírico, herpesvírico, alfavírico y retrovírico inducen una fuerte respuesta inmunitaria en pacientes, dirigida a componentes de vectores víricos y los productos génicos terapéuticos. Como consecuencia, estos vectores sólo se pueden administrar una sola vez a un paciente, mientras que los niveles de expresión de los genes terapéuticos introducidos decrecen rápidamente. Los vectores víricos procedentes de virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) no inducen respuestas inmunitarias en animales y son inmunológicamente inertes. Sin embargo, la mayoría de la población humana encontró AAV natural junto con su virus auxiliar, por ej., adenovirus y como resultado desarrolló una fuerte memoria CTL frente a las proteínas de la cápside de AAV. Como consecuencia, las células transducidas de AAV se retiran fácilmente y los niveles de expresión del gen o ácido nucleico terapéutico introducido por un vector vírico de AAV decrecen rápidamente.

45 Los rendimientos de proteínas recombinantes producidas en células de mamífero comparado con aquéllas producidas en células procariotas son bajos en general, a pesar del uso de fuertes activadores y/o inserciones de transgenes multicopia u otras maneras de mejorar la transcripción. Se han usado vectores competentes de replicación vírica o replicones durante mucho tiempo como sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero. El gen diana en dichos vectores se puede expresar bajo control transcripcional de activadores víricos según lo cual los ARNm deseados se pueden acumular a niveles extremadamente altos en el citoplasma pronto después de transfección, proporcionando grandes cantidades de proteína diana.

50 La patente internacional WO 2005/024030 describe el uso de un antígeno T grande poliomavírico en un sistema de expresión de proteínas basado en células de roedores.

55 Hasta ahora, los éxitos con los sistemas de expresión basados en replicones han sido limitados. Los sistemas de replicones basados en virus de ARN en general producen proteínas recombinantes durante sólo un periodo de tiempo breve, mientras que los derivados de virus de ADN en general no se replican bien en las estirpes celulares

usadas comercialmente.

Hasta donde sabemos, sólo hay un vector de suministro de genes vírico que es inmunológicamente inerte en los seres humanos y que se puede producir en cantidades suficientes para tratar un número significativo de pacientes. Por otra parte, se puede emplear este vector de suministro de genes vírico como un sistema de repicones para la producción de proteínas recombinantes en estirpes celulares de mamíferos. Este sistema de vector vírico procede de virus de los simios 40 (SV40), un poliomavirus de simios.

Los poliomavirus están constituidos por una familia de virus de ADN no de envoltura con cápsides icosaédricas. Se aíslan de una variedad de especies animales incluyendo seres humanos, monos, roedores y pájaros. Se han descrito cinco poliomavirus humanos, denominados poliomavirus BK, JC, WU, KI y de Células de Merkel. Se han descrito muchos poliomavirus de mono de los cuales el más conocido es SV40. SV40 se replica deficientemente en células humanas y las infecciones en seres humanos son raras. Las infecciones por SV40 ocasionales tienen lugar por transmisión del virus de monos a personas que viven en estrecho contacto con estos animales o por vacunación con lotes de partículas de poliovirus inactivadas contaminadas con SV40.

SV40 presenta un genoma de ADN bicatenario circular largo de 5,25 pares de kilobase. El genoma de SV40 consta de dos regiones reguladoras, la región activadora/de origen y la región de poliadenilación. La región activadora/origen tiene un largo de 500 pares de bases y comprende dos activadores dirigidos de manera opuesta, el activador temprano y tardío (SVEP y SVLP, respectivamente), el origen de la replicación y la señal de empaquetamiento. La región de poliadenilación tiene un largo de 100 pares de bases y contiene las señales de poliadenilación de los transcritos tanto temprano como tardío. El SVEP conduce la expresión del transcrito primario temprano que es sometido a corte y empalme por factores de corte y empalme codificados por el huésped en 2 ARNm diferentes que codifican antígenos de tumores (T) pequeños y grandes.

El antígeno T grande es la proteína asociada a replicasa requerida para replicación de ADN y para activación del SVLP. Aunque la función precisa del antígeno T pequeño en replicación de virus ha permanecido no clara, se requiere antígeno T pequeño para la transformación de varios tipos de células de mamífero, junto con antígeno T grande. Los efectos primarios de antígeno T pequeño tienen lugar por su interacción con proteína serina-treonina fosfatasa 2A. El dominio de unión de fosfatasa 2A de antígeno T pequeño está localizado en el extremo carboxi-terminal único del antígeno T pequeño.

Está bien documentado en la técnica anterior que se requieren tanto antígeno T grande como antígeno T pequeño para replicación eficaz de poliomavirus (Fahrbach K. M. et al., *Virology* 370 (2): 255 - 263, 2.008).

SVLP conduce la expresión del último transcrito primario que se corta y empalma por factores de corte y empalme codificados por el huésped en diferentes ARNm codificando las proteínas de la cápside vírica VP1, 2 y 3. Los antígenos T son los primordiales y las proteínas de la cápside los componentes inmunogénicos secundarios de los virus de polioma, que provocan respuestas inmunitarias celulares y humorales frente a células infectadas por SV40.

Los antígenos T de SV40 inmortalizan cooperativamente células primarias de mamífero, transforman estirpes celulares de mamífero establecidas e inducen tumores en roedores jóvenes inmuno-comprometidos. Una serie de informes sugiere que las infecciones de SV40 están asociadas a tumores malignos humanos, producidos por la actividad oncogénica de los antígenos T expresados de manera crónica (Butel J. S. y Lednický J. A. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 119 - 134, 1.999).

Puesto que la expresión de las proteínas de la cápside vírica depende de la presencia del antígeno T grande, se han suprimido secuencias específicas de antígeno T en vectores víricos de polioma, no sólo para hacer los vectores incompetentes para la replicación, sino también para eliminar completamente su inmunogenicidad en seres humanos.

Se han fabricado y ensayado vectores víricos de polioma suprimidos de antígeno T procedentes de SV40, en los que los genes o ácidos nucleicos terapéuticos se expresan in trans en células diana bajo control transcripcional del SVEP vírico. Dichos vectores son conocidos desde hace mucho tiempo como potenciales vectores para transferencia de genes en una pluralidad de tejidos y tipos de células humanos, por ejemplo, médula ósea (Rund D. et al., *Human Gene Therapy* 9: 649 - 657, 1.998), el hígado (Strayer D. S. y Zern M. A., *Seminars in Liver Disease* 19: 71 - 81, 1.999) y células dendríticas (Vera M. et al., *Molecular Therapy* 12: 950 - 959, 2.005).

Khoury et al., *Cell* 18; 85-92 (1.979) se refieren al tratamiento y la expresión de ARNm de SV40 temprano. Los experimentos descritos en la misma sugieren que los casos reguladores principales en la expresión de los genes de SV40 tempranos tienen lugar al nivel de síntesis y tratamiento de ARNm.

Beicheng Sun et al., *Molecular Carcinogenesis* ((2.006) 45; 213-219) describen un estudio tumorigénico sobre hepatocitos en los que se expresan de manera conjunta SV40 y Ras. Concluyen que la expresión de antígeno T de SV40 y HaRasV12 es suficiente para convertir hepatocitos humanos normales en células tumorigénicas en un modelo de trasplante de cápsula subrenal. Se sabe que los vectores poliomavíricos, tales como SV40, infectan células que no se dividen así como que se dividen activamente. Puesto que los vectores carecen de la región que codifica los antígenos T y como consecuencia no expresan las proteínas de la cápside vírica, no son inmunogénicos

(Strayer D.S. y Zern M.A., *Seminars in Liver Disease* 19: 71 - 81, 1.999) permitiendo la administración repetida al mismo individuo. Por otra parte, puesto que las construcciones génicas terapéuticas insertadas se expresan bajo control transcripcional de SVEP, un activador débil pero constitutivo, dichos vectores inducen la expresión a largo plazo de las proteínas terapéuticas in vivo. Así, se sabe que los vectores poliomavíricos, tales como vectores procedentes de SV40 son candidatos prometedores para transferencia de genes o ácidos nucleicos terapéuticos que se pueden usar para las aplicaciones ya mencionadas.

Debido a su potencial replicación, los replicones basados en poliomavirus son también de gran interés para activar la producción de proteínas recombinantes tales como anticuerpos, factores de crecimiento y hormonas en células de mamífero.

Se han producido partículas de SV40 suprimidas de antígeno T en células de simio que son permisivas para crecimiento lítico de SV40 y que suministran los antígenos T en trans. Las estirpes celulares que empaquetan vector de SV40 que se usan en la actualidad son estirpes celulares COS en particular COS-1 y COS-7 (Gluzman Y., *Cell* 23: 175 -182, 1.981). Se generaron estirpes celulares COS por transformación de células CV1 de mono con ADN de SV40. Waheed et al., *Cancer Research* 59: 6.068-6.073 (1.999) muestran que las células COS-7 expresan antígeno T grande así como T pequeño.

Otra estirpe celular que expresa el antígeno T de SV40 en trans es CMT4. Las estirpes celulares CMT derivadas de CV1 fueron generadas usando ADN de SV40 en que los antígenos T se expresaron bajo control transcripcional del activador de metalotioneína de ratón (Gerard R. D. y Gluzman Y., *Molecular and Cellular Biology* 5: 3.231 – 3.240, 1.985).

Hay una desventaja importante sin embargo para el uso de tales estirpes celulares. El pase de vectores de SV40 de antígeno T suprimido en las estirpes celulares de empaquetamiento construidas (COS o CMT) da como resultado en muchos casos la aparición de partículas de SV40 competentes para replicación natural (Gluzman Y., *Cell* 23: 175 - 182, 1.981; Oppenheim A. y Peleg A., *Gene* 77: 79 -86,1.989; Vera M. et al., *Molecular Therapy* 10: 780 - 791, 2.004).

Esto tiene lugar lo más probablemente por recombinación dependiente de la homología de las secuencias de nucleótidos entre las secuencias específicas de SV40 insertadas de manera cromosómica y secuencias específicas del vector de SV40 nucleares. La aparición de las partículas de virus naturales competentes para replicación y la presencia de las oncoproteínas de antígeno T en dichas estirpes celulares de empaquetamiento convencionales han hecho el uso de vectores de SV40 inviable para fines médicos.

La estirpe celular de riñón de embrión humano 293 (HEK293) es semipermissiva para infección de SV40, que significa que sólo un pequeño porcentaje de células infectadas soporta replicación de virus. La mayoría de las células se infectan de manera persistente y muestran niveles muy bajos de replicación de virus.

Un derivado de la estirpe celular HEK293 es la estirpe celular HEK293T, que expresa la región temprana de SV40 bajo control transcripcional del activador de repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous. Se ha descrito que las células HEK293T expresan cantidades muy bajas de antígeno T grande y grandes cantidades de antígeno T pequeño, debido a una inclinación de corte y empalme a favor del ARNm de antígeno T pequeño de SV40. Vera et al. encontraron que HEK293T soporta deficientemente la producción de vector vírico SV40 (Vera M., et al., *Molecular Therapy* 10: 780 - 791, 2.004).

Puesto que las oncoproteínas de antígeno T están presentes en células HEK293T y hay riesgo de que surjan virus de SV40 competentes para la replicación, el uso de esta estirpe celular para la producción de vectores SV40 para fines médicos no es deseado y es inviable.

La estirpe celular HEK293TT se ha desarrollado como un derivado de HEK293T, generada por transfección estable con una construcción génica que codifica el antígeno T grande de SV40. Se usan células HEK293TT para la producción de partículas de pseudo-vector de virus del papiloma humano recombinante (HPV, por sus siglas en inglés). Las partículas de pseudo-vector de HPV recombinante se producen en HEK293TT por transfección de las células con un plásmido que alberga el origen de SV40 de replicación y los genes de la cápside de HPV y uno que alberga el origen de SV40 de replicación y un pseudo-genoma de HPV (Buck C. B. et al., *Methods in Molecular Medicine* 119: 445 - 462, 2.005).

Puesto que HEK293TT como un derivado de HEK293T acumula las oncoproteínas de antígeno T pequeño y grande y soporta deficientemente la replicación de SV40, el uso de esta estirpe celular para producir vectores de SV40 recombinantes para fines médicos es también no deseado e inviable.

La patente internacional WO 03/025189 describe estirpes celulares de complementación de empaquetamiento que permita la producción de partículas de vector de SV40 que son supuestamente seguras para uso médico. Sin embargo, las estirpes celulares de empaquetamiento descritas en la presente memoria aún acumulan cantidades significativas de las oncoproteínas de antígeno T pequeño y grande.

Vera M. et al., *Molecular Therapy* 10: 780-791, 2.004 mostraron que la capacidad de producción de partículas de

vector de SV40 recombinantes de interés en ciertas estirpes celulares tales como CMT4 y HEK293T puede ser muy baja e indican que las estirpes celulares descritas en la patente internacional WO 03/025189, tales como COT-2 tampoco son eficaces como estirpes celulares productoras para las partículas de virus de SV40 recombinantes, posiblemente debido a la inclinación del procedimiento de corte y empalme a favor del ARNm de antígeno T pequeño en estos tipos de células.

La patente internacional WO 08/000779 describe un método para superar el problema con la producción de stocks de título alto de vectores víricos de SV40 adecuados usando supresores víricos de interferencia de ARN (ARNi), tales como las proteínas E3L de virus vacuna y NS1 de virus de la influenza A. Las estirpes celulares de empaquetamiento descritas en la patente internacional WO 08/000779 no proporcionan una solución a las desventajas de las estirpes celulares de empaquetamiento de la técnica anterior descritas en la presente memoria anteriormente.

Se han proporcionado células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) con la región temprana de poliomavirus de ratón, dando como resultado estirpes celulares de CHOP (Heffeman y Dennis, Nucleic Acids Research 19: 85 - 92, 1.991). Una serie de estirpes celulares de CHOP soportó replicación de CDM8 de plásmido (invitrogen), un vector de expresión de mamífero que soporta el origen de poliomavirus de ratón de replicación. El nivel de replicación en las estirpes celulares de CHOP no fue suficiente para hacer este sistema atractivo para aplicación comercial, posiblemente debido a una inclinación del procedimiento de corte y empalme a favor del ARNm de antígeno T pequeño o antígeno T medio en células CHO.

Queda un deseo en la técnica de sistemas de producción eficaces para partículas de poliomavirus recombinante que sean seguros de usar y produzcan altos títulos de partículas de vector vírico. Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos para la producción segura y eficaz de partículas de poliomavirus y composiciones que se puedan obtener con ello.

Sumario de la invención

Los objetos anteriores han sido satisfechos por la presente invención por que se proporciona un método para la producción de partículas de vector poliomavírico recombinante que no codifique un antígeno T pequeño poliomavírico funcional que comprende las etapas de:

Proporcionar una estirpe celular permisiva para poliomavirus natural, comprendiendo dicha estirpe celular un gen codificador de un antígeno T grande poliomavírico funcional integrado de manera estable en el genoma de la célula, en el que la estirpe celular no comprende un gen codificador de un antígeno T pequeño poliomavírico funcional,

Introducir en dicha estirpe celular un ADN de poliomavirus que no codifique un antígeno T pequeño poliomavírico funcional y que tampoco codifique un antígeno T grande funcional,

Cultivar dichas células en un medio de crecimiento en condiciones en las que la estirpe celular produce el antígeno T grande en trans y que permite la formación de partículas de vector poliomavírico recombinante y

Recoger las partículas de vector poliomavírico recombinante del cultivo celular.

Las partículas de vector poliomavírico recombinante producidas por este método son incapaces de expresar antígeno T pequeño funcional y no se puede revertir a partículas de poliomavirus natural. Esto puede ser debido a una completa ausencia de genes codificadores de un antígeno T pequeño funcional, en el vector poliomavírico así como en la estirpe celular productora de vector poliomavírico.

Esto permite ahora por primera vez la preparación de una composición que comprende un número significativo de partículas de vector poliomavírico recombinante sin una sola partícula de poliomavirus natural. Las partículas de vector vírico producidas en este método son incapaces de replicarse en células que son permisivas para el poliomavirus natural y que no expresan un antígeno T grande funcional. Por lo tanto, esta composición es segura de usar en tratamientos médicos.

Hasta la fecha, no ha sido posible producir grandes cantidades de partículas de vector poliomavírico, libre de partículas revertientes o recombinantes de poliomavirus natural. Con el uso de la descripción proporcionada en la presente memoria, ahora es posible obtener grandes cantidades de partículas de vector vírico uniformes sin que esté presente un solo virus natural. De acuerdo con esto, la invención se refiere a una composición que comprende más de un millón de partículas de vector poliomavírico recombinante que no codifiquen un antígeno T pequeño poliomavírico funcional y que tampoco codifiquen un antígeno T grande, siendo dichas partículas de poliomavirus incapaces de replicación en células que sean permisivas para el poliomavirus natural, caracterizado por que la composición no contiene una sola partícula de poliomavirus que sea capaz de replicación en células que sean permisivas para el poliomavirus natural en el que dichas células no expresan un antígeno T grande poliomavírico funcional.

Las estirpes celulares para uso en la producción de dichas partículas de vector poliomavírico recombinante

pueden ser estirpes celulares de mamífero convencionales permisivas para un poliovirus que se modifiquen genéticamente a fin de que expresen un antígeno T grande poliomavírico funcional y no expresen un antígeno T pequeño poliomavírico funcional.

5 La descripción también describe una composición como se describió anteriormente para uso como un medicamento.

Descripción detallada de la invención

10 El presente autor ha encontrado que el antígeno T grande de un poliovirus por sí mismo activa la expresión de las proteínas de la cápside poliomavírica y que no se requiere el antígeno T pequeño poliomavírico para ese fin. Esto significa que en ausencia de antígenos T poliomavíricos en células, el SVEP un activador constitutivo pero débil, comparado con otros activadores víricos tales como el activador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), mientras el SVLP se desactiva en el nivel transcripcional o postranscripcional. Sorprendentemente, en células permisivas de SV40, se encontró que el antígeno T grande de SV40 por sí mismo era capaz de mantener la multiplicación del ADN de vector vírico de SV40 y de activar SVLP, conduciendo a la acumulación de proteínas de la cápside y dando como resultado la producción eficaz de partículas de vector vírico de SV40.

15 En la técnica anterior, se han generado cepas de SV40 que son deficientes en la codificación del antígeno T pequeño. Gauchat et al. (Nucleic Acids Research 14: 9.339-9.351, 1.988) describen un mutante dl883 de delección de SV40 que carece del antígeno T pequeño pero produce un antígeno T grande funcional en células infectadas. Cuando se usaba esta cepa de virus mutante para infectar células de riñón de mono y cultivos celulares CV-1, la cepa de virus mutante era menos eficaz para inducir división celular mediada por antígeno T grande y posterior replicación de virus que SV40 natural. Los autores concluyeron que el antígeno T pequeño presenta una función auxiliar, favoreciendo que el antígeno T grande induzca división celular y replicación de virus. Esta técnica anterior explica así lejos de la presente invención, puesto que muestra que comparado a células infectadas con SV40 natural, muchas células infectadas con dl883 no se dividen y no producen partículas de virus. La ausencia de antígeno T pequeño en una célula se explica que es perjudicial para producción de vector vírico.

25 La publicación de Gauchat et al. no es concluyente sobre si se producen partículas víricas o no. Miden simplemente la producción de ADN vírico en células, que no es equivalente a la producción de partículas víricas intactas.

30 La presente invención es, por lo tanto, contra-intuitiva para un experto. Por lo tanto, es conocido para un experto que el antígeno T pequeño es un inhibidor eficaz de ARNi. Puesto que se sabe que ARNi sirve como un mecanismo antivírico, se esperaría que una disminución en la cantidad de antígeno T pequeño intracelular conduzca a un aumento en la actividad antivírica basada en ARNi, dando como resultado una producción reducida de partículas de virus. Los autores encontraron sorprendentemente que lo contrario es verdad. Cuando se proporciona el antígeno T grande en trans, es decir, la estirpe celular produce el antígeno T grande, en el que tanto la estirpe celular como la cepa de poliovirus carecen de un antígeno T pequeño funcional, se producen partículas de poliovirus en cantidades altas. La diferencia entre la presente invención y los resultados de Gauchat et al. son que en los experimentos descritos en Gauchat et al. se proporciona un antígeno T grande funcional en cis, es decir, sobre el vector poliomavírico que se replica en la célula infectada. Esto conduce obviamente a muerte celular parcial y a una producción de vector vírico muy ineficaz.

40 La presente descripción proporciona métodos para la replicación de partículas de vector poliomavírico recombinante y estirpes celulares de empaquetamiento de vector poliomavírico y estirpes celulares que soportan replicación de replicones poliomavíricos siendo dichos vectores poliomavíricos y replicones incapaces de expresar un antígeno T pequeño poliomavírico funcional.

En los métodos descritos en la presente memoria, todas las células contribuyen a la producción de vector poliomavírico y se pueden obtener niveles de 1×10^6 o incluso 1×10^{11} partículas de vector vírico por mililitro de volumen de cultivo celular.

45 La expresión "antígeno T grande funcional" o "partes funcionales de los mismos" en este contexto significa un antígeno T grande o un fragmento o análogo del mismo que se puede obtener a partir de un poliovirus que es capaz de realizar la misma función que la requerida para realizar el método como se describe en la presente memoria, como es atribuible para el antígeno T grande del que proceden, más en particular, capaz de mantener la multiplicación de ADN de vector vírico poliomavírico y de activar el SVLP en células permisivas para el poliovirus.

50 Se puede ensayar la funcionalidad de antígeno T grande por co-expresión de un plásmido de expresión que codifica antígeno T grande de poliovirus o un fragmento o análogo del mismo junto con ADN de vector poliomavírico con antígeno T suprimido en células permisivas para el poliovirus natural y determinación de si se producen partículas de vector de poliovirus. Se puede concluir que el antígeno T grande de poliovirus o un fragmento o análogo del mismo es un antígeno T grande funcional si se produce una partícula de poliovirus única en este ensayo. Se puede determinar por microscopía electrónica o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.

La expresión "antígeno T pequeño funcional" o "partes funcionales del mismo" en este contexto significa un antígeno T pequeño o un fragmento o análogo del mismo que se puede obtener de un poliovirus que es capaz de realizar

la misma función que la requerida para realizar el método como se describe en la presente memoria, como es atribuible al antígeno T grande a partir del cual procede, más en particular, capaz de interactuar con y/o inhibir proteína fosfatasa 2A. La funcionalidad de antígeno T pequeño se puede ensayar usando un ensayo de unión entre un antígeno T pequeño poliomavírico o un fragmento o análogo del mismo y proteína fosfatasa 2A como se describe por CHO U.S. *et al.*, PLoS Biology 5 (8): e202, 2.007. Se puede concluir que el antígeno T pequeño o un fragmento o análogo del mismo es un antígeno T pequeño funcional cuando la interacción y/o inhibición de este ensayo está por encima del fondo.

Las estirpes celulares útiles en el método descrito en el momento presente pueden expresar antígeno T grande poliomavírico o partes funcionales del mismo y son incapaces de expresar antígeno T pequeño poliomavírico funcional. Como una consecuencia, las estirpes celulares descritas en la presente memoria no acumulan las oncoproteínas de antígeno T codificadas de poliomavirus y no pueden surgir poliomavirus naturales competentes para replicación de células como se describe en la presente memoria por recombinación entre el vector poliomavírico y las secuencias de antígeno T grande poliomavírico insertado de manera cromosómica.

Se puede obtener una estirpe celular para uso en los métodos como se describe en la presente memoria por el experto usando sus técnicas ordinarias. Además, puede seguir la guía proporcionada en los ejemplos para llegar a una estirpe celular para uso en el método descrito en el momento presente.

La descripción también proporciona una estirpe celular permisiva de poliomavirus, preferiblemente una estirpe celular de primate o incluso más preferido una estirpe celular de simio tal como una estirpe celular Vero (ref., estirpe celular de riñón de Mono Verde Africano ECACC 88020401 Colección Europea de Cultivos Celulares, Salisbury, Wiltshire, RU) que comprende un gen que codifica antígeno T grande poliomavírico funcional o un fragmento funcional del mismo, siendo incapaz la secuencia génica de expresar un antígeno T pequeño poliomavírico funcional, por ejemplo por delección de secuencias específicas de antígeno T pequeño. Dicha estirpe celular es capaz de multiplicar y empaquetar vectores de poliomavirus de antígeno T suprimido.

El destinatario experto apreciará que los vectores poliomavíricos recombinantes, tales como vectores SV40, que se producen en las estirpes celulares como se describe en la presente memoria pueden no comprender secuencias de genes específicos de antígeno T y así serán incapaces de replicación en una célula de mamífero que carezca de antígeno T grande. Los replicones de SV40 de antígeno T suprimido ejemplificados parecían replicarse a una alta velocidad en las estirpes celulares de producción descritas en la presente memoria.

El término "homología de secuencias de nucleótidos" como se usa en la presente memoria indica la presencia de homología entre dos polinucleótidos. Los polinucleótidos presentan secuencias "homólogas" cuando una secuencia de nucleótidos en los dos polinucleótidos es la misma o cuando una secuencia de hebra transcrita del uno y una secuencia de hebra complementaria del otro polinucleótido es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza en general comparando porciones de al menos dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. La ventana de comparación es en general de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos de longitud. El "porcentaje de homología de secuencias" para secuencias de polinucleótidos como se describe en la presente memoria, tal como 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 por ciento de homología de secuencias se puede determinar por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas por una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede incluir adiciones o delecciones (es decir, huecos) cuando se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula por: (a) determinación del número de posiciones a las que tiene lugar la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones igualadas; (b) división del número de posiciones igualadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y (c) multiplicación del resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de homología de secuencias. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede llevar a cabo por implementaciones computerizadas de algoritmos conocidos o por inspección. La comparación de secuencias fácilmente disponible y los algoritmos de alineación de secuencias múltiples son, respectivamente, la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul, S. F., Journal of Molecular Biology 215: 403, 1.990; Altschul, S. F. *et al.*, Nucleic Acid Research 25: 3.389 -3.402, 1.997) y ClustalW programas ambos disponibles en internet. Otros programas adecuados incluyen GAP, BESTFIT y FASTA en el Envase del Programa Informático de Genética de Wisconsin (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA).

La homología entre secuencias de ácidos nucleicos se puede determinar con referencia a la capacidad de las secuencias de ácidos nucleicos para hibridarse entre sí en la desnaturalización (por ejemplo, en condiciones de NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, AEDT 1 mM, a una temperatura de 50 grados Celsius a 65 grados Celsius e hibridación durante 12-16 horas, seguido por lavado) (Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.989 o Current Protocols en Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1.992).

En términos generales, los expertos en la materia podrán construir vectores poliomavíricos y diseñar protocolos para expresión de genes recombinantes. Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias

reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias activadoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias cuando sea apropiado. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.989.

5 El término "heterólogo" se usa ampliamente por todo el documento para indicar que la secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de polinucleótidos, gen o secuencia de nucleótidos en cuestión han sido introducidos en dicha estirpe celular productora de vector vírico de polioma, usando ingeniería genética, es decir, por intervención humana. Un gen heterólogo puede reemplazar en principio un gen equivalente endógeno o ser adicional para los genes endógenos del genoma de la célula huésped o virus de polioma, es decir, que no se encuentra de manera natural en las células de las especies huésped o en virus de polioma.

10 Por "activador" se quiere decir una secuencia de ADN a partir de la cual se puede iniciar transcripción de ADN ligado de manera operable aguas abajo (es decir, en la dirección 3' en la hebra transcrita de ADN bicatenario). "Ligado de manera operable" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, colocada de manera conveniente y orientada para que se inicie la transcripción del activador. El ADN ligado de manera operable a un activador está "bajo regulación de iniciación transcripcional" del activador.

15 El activador puede ser un activador constitutivo, un activador inducible o activador específico del tejido. Los términos "constitutivo", "inducible" y "específico del tejido" como se aplica a un activador es entendido por los expertos en la materia. El activador procede preferiblemente de virus, incluyendo repeticiones terminales largas en 5' a partir de retrovirus y lentivirus, el activador temprano inmediato de citomegalovirus (CMVie), el activador de factor 1 alfa de elongación humano (EF-1 alfa) y similares. Dichos activadores están fácilmente disponibles y son conocidos en la técnica.

20 Por "señal de poliadenilación" se quiere decir una secuencia de nucleótidos a partir de los cuales se puede terminar la transcripción y se añade cola poli-A a la transcripción. Como señal de poliadenilación se puede usar cualquier señal de poliadenilación aplicable en células humanas o animales.

25 Una estirpe celular para uso en un método como se describe en la presente memoria puede proceder de cualquier estirpe celular adecuada conocida en la técnica tal como MDCK, PER.C6, HEK293, CV1 y similares, pero es preferiblemente una estirpe celular Vero o CHO.

Una estirpe celular adecuada es una estirpe celular permisiva de poliomavirus incapaz de expresar el antígeno T pequeño polioma vírico y comprende preferiblemente los siguientes elementos genéticos:

- 30 i) el antígeno T grande polioma vírico que codifica dominio o parte del mismo y opcionalmente
ii) un marcador seleccionable tal como un gen de resistencia a neomicina, gen de resistencia a puromicina, gen de resistencia a higromicina u otro marcador.

Dicha estirpe celular puede estar desprovista del intrón grande de la transcripción temprana de poliomavirus que alberga secuencias de ADN específicas del antígeno T pequeño.

35 La estirpe celular puede incluir una secuencia activadora transcripcional integrada de manera estable en el ADN cromosómico de la estirpe celular, de manera que se puede seleccionar además sobre la base de la actividad del activador transcripcional. Dichos marcadores y dichos procedimientos de selección son conocidos en la técnica.

40 Se pueden generar estirpes celulares de producción de vectores polioma víricos diferentes, por ejemplo estirpes celulares productoras de vector vírico SV40, por transfección de las células con diferentes sectores, tales como plásmidos, dependiendo de su linaje. La metodología para transfección de estirpes celulares es conocida en la técnica. Por ejemplo, la estirpe celular Vero se usa ampliamente para la producción de partículas víricas para vacunas. Esto ha encontrado muchas aplicaciones en profilaxis de enfermedades víricas.

Una estirpe celular adecuada se puede obtener por transfección con un primer plásmido que comprende los siguientes componentes:

45 i) el antígeno T grande polioma vírico que codifica dominio o parte del mismo, desprovisto del intrón grande de la transcripción temprana de poliomavirus que alberga secuencias específicas de antígeno T pequeño y opcionalmente

ii) un marcador seleccionable tal como un gen de resistencia a neomicina, gen de resistencia a puromicina, gen de resistencia a higromicina u otro marcador.

50 Así un solo vector o plásmido podía soportar tanto el dominio que codifica antígeno T grande polioma vírico como una secuencia marcadora seleccionable. También es posible que se utilicen dos vectores o plásmidos soportando ADN separados, uno soportando el dominio codificador de antígeno T grande polioma vírico y un segundo soportando el marcador seleccionable, dependiendo del diseño. Cualquier elemento genético adicional que se pueda

requerir para conferir una capacidad de producción de vector poliomavírico en una estirpe celular productora también se puede poner en uno o más vectores de ADN o plásmidos que se puedan usar después para transinfectar la estirpe celular de producción de elección. Por ejemplo, la estirpe celular de producción Vero no contiene ya secuencias de antígeno T poliomavírico en ella, así se le puede añadir el dominio codificador de antígeno T grande, y las células productoras nacientes resultantes que albergan el dominio codificador de antígeno T grande en ellas se pueden seleccionar después, usando un sistema marcador seleccionable.

La presente descripción permite ahora por primera vez la preparación de composiciones que comprenden vectores poliomavíricos recombinantes en cantidades suficientes para fines terapéuticos, sin el riesgo de contaminación con poliomavirus naturales que se encuentran a partir de recombinación entre ADN de vector poliomavírico y ADN de célula huésped. Este fenómeno se describe bien en la bibliografía (Gluzman Y., Cell 23: 175 - 182, 1.981; Oppenheim A. y Peleg A., Gene 77: 79 - 86, 1.989; Vera M. et al., Molecular Therapy 10: 780-791, 2.004).

La frecuencia con la que tiene lugar esta recombinación está menos bien documentada sin embargo. Los cálculos varían enormemente. Shaul et al estimaron que la recombinación podía tener lugar con una frecuencia de al menos 10^{-6} (Shaul et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3.781-3.784, 1.985), mientras que cálculos más recientes muestran una tasa de recombinación mucho mayor, del orden de 10^{-3} (Arad et al., Virology 304: 155-159, 2.002).

Un factor de complicación en la estimación de la frecuencia de recombinación es que el poliomavirus natural se replica más rápido que el vector poliomavírico recombinante que carece de antígenos T funcionales codificadores de genes.

Por lo tanto, se establece el número máximo de partículas de vector SV40 recombinante que se podía producir en un cultivo celular convencional de acuerdo con la técnica anterior, sin el aspecto de cualquier partícula revertiente de tipo natural.

Por lo tanto, se infectaron células COS-1 con partículas de vector SV40 recombinante de acuerdo con un protocolo clásico (Vera M. et al., Molecular Therapy 10: 780 - 791, 2.004) y se calculó el número máximo de partículas de vector vírico que se podían producir sin la aparición de un solo genoma detectable del virus natural como se detecta por un ensayo PCR cuantitativo muy sensible.

Se encontró que hasta 1×10^4 partículas de vector vírico se podían producir con seguridad sin la aparición de una cantidad detectable de partículas revertientes naturales en la mayoría de los experimentos realizados. Un número significativo de preparaciones comprendiendo 1×10^5 partículas de vector vírico sin embargo, fue positivo para partículas revertientes naturales, mientras que todas las preparaciones comprendiendo 1×10^6 partículas de vector vírico estaban contaminadas con virus naturales y así no eran seguras para uso médico.

El hecho de que las preparaciones de vector poliomavírico de acuerdo con la técnica anterior no son seguras para uso médico se subraya por el hecho de que las partículas SV40 naturales en las preparaciones que comprenden más de 1×10^6 partículas de vector SV40 recombinante fueron capaces de infectar células permisivas de SV40 in vitro cuando se ensayaron de acuerdo con un método de la técnica anterior como se describe por Katzman R. B. et al., (Journal of Virological Methods 150: 7 - 13, 2.008).

La presente descripción permite ahora por primera vez la preparación de una composición que comprende más de 1×10^6 partículas de vector poliomavírico sin que esté presente ninguna partícula de poliomavirus natural en la composición. La descripción proporciona por lo tanto una composición que comprende más de un millón de partículas de vector poliomavírico recombinante que no codifican un antígeno T pequeño poliomavírico funcional y que tampoco codifican un antígeno T grande, siendo incapaces dichas partículas de poliomavirus de replicación en células que son permisivas para el poliomavirus natural, caracterizada por que la composición no contiene una única partícula de poliomavirus que sea capaz de replicación en células que sean permisivas para el poliomavirus natural en el que dichas células no expresan un antígeno T grande poliomavírico funcional. Dichas preparaciones pueden contener ventajosamente 1×10^7 partículas de vector o más, tal como hasta 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} ó 1×10^{11} partículas de vector o más.

La expresión "incapaz de replicación en células que son permisivas para el poliomavirus natural" significa que la composición no contiene una sola partícula de poliomavirus revertiente natural entre al menos 1×10^6 partículas de vector poliomavírico. Esto se puede medir por el ensayo PCR cuantitativo como se describe por Vera M. et al., Molecular Therapy 10: 780 - 791, 2.004 o infectando una estirpe celular permisiva para el poliomavirus natural presente en la composición. En el último caso, la ausencia de una única placa en el ensayo de placa (Katzman R. B. et al., Journal of Virological Methods 150: 7 - 13, 2.008) indica la ausencia de una sola partícula de poliomavirus natural.

En una realización preferida, la preparación como se describe en la presente memoria se refiere a una composición que comprende un poliomavirus de primate, tal como un poliomavirus de simio, más en particular un SV40, virus de simio 12 (SV12), poliomavirus linfotrópico, poliomavirus de mono verde africano o poliomavirus de chimpancé. Las estirpes celulares permisivas para el poliomavirus de primate se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en: células Vero, células CV1, células PerC.6, células HEK293 y similares.

En otra realización, la preparación como se describe en la presente memoria se refiere a una composición que comprende un poliomavirus de roedor tal como poliomavirus de ratón o hámster, más en particular un virus de polioma de Murina o poliomavirus de hámster. Las estirpes celulares permisivas para el poliomavirus de ratón o de hámster se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en células CHO y similares.

- 5 La presente descripción también describe la generación de estirpes celulares de producción de vectores para la producción de partículas de vector vírico de polioma recombinante que sean seguras para uso médico.

De acuerdo con esto, la descripción proporciona una estirpe celular permisiva para un poliomavirus, siendo capaz dicha estirpe celular de expresar un antígeno T grande funcional e incapaz de expresar un antígeno T pequeño. Dicha estirpe celular soporta de manera adecuada la producción segura de partículas de vector poliomavírico recombinante sin el riesgo de obtener partículas de poliomavirus revertientes naturales puesto que las células carecen de cualquier secuencia homóloga entre el ADN cromosómico de la célula y el ADN de poliomavirus recombinante. El gen que codifica el antígeno T grande se integra de manera estable en el genoma de la célula.

10 El término “vector poliomavírico recombinante” en este contexto se tiene que interpretar como un poliomavirus incapaz de expresar un antígeno T grande poliomavírico funcional, incapaz preferiblemente de expresar un antígeno T grande y pequeño funcional. Dicho vector vírico recombinante puede carecer por ejemplo de la secuencia codificadora para el antígeno T grande o tanto el antígeno T grande como el antígeno T pequeño.

15 La expresión “permisiva para un poliomavirus” en este contexto significa que la estirpe celular soporta la replicación de partículas de poliomavirus en la infección con el poliomavirus o en la introducción de ADN de poliomavirus por transinfección u otros medios para suministrar ADN a una célula.

20 En más aspectos como se describe en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un individuo que padece de una enfermedad. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más vectores de poliomavirus tales como SV40, preparado de acuerdo con un procedimiento como se describe en la presente memoria y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas como se describe en la presente memoria se pueden formular de cualquier forma adecuada para administración al individuo con necesidad de las mismas. Tales formulaciones pueden estar en cualquier forma para administración tal como administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, intralinfática, subcutánea, intraocular o incluso transdérmica.

25 Las composiciones farmacéuticas como se describe en la presente memoria comprenden en general un agente tampón, un agente que ajusta la osmolaridad de las mismas, opcionalmente uno o más portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes complementariamente activos a las composiciones como se describe en la presente memoria. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez correcta se puede mantener por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

35 La invención se describirá además ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción del vector de suministro de genes derivado de SV40.

Se diseñaron seis oligonucleótidos:

40 WdV101: CCGCTCGAGTTGCGGCCGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC (SEC ID N° 1) (que contiene un sitio de restricción XhoI y uno NotI) y

WdV102: GGTACCATAGAGCCCACCGCATCCCAGCATGCC (SEC ID N° 2) (que contiene un sitio de restricción KpnI) y

45 WdV103: GGCCGCTTTATTAATTAAGCCCTGCAGGTTGTTAAACTTGGCGC GCCTTAT (SEC ID. N° 3) (contiene de 5' a 3' con posterioridad un sitio de restricción adherente NotI, un PstI, SbfI, Pml y un sitio de restricción intacto AscI y un sitio de restricción adherente ClaI) y

WdV104: CGATAAGGCGCGCCAAGTTTAAACAACCTGCAGGGCTTAATTAAT AAAGC (SEC ID N° 4) (contiene de 3' a 5' con posterioridad un sitio de restricción adherente NotI, un PstI, SbfI, Pml y un sitio de restricción intacto AscI y un sitio de restricción adherente ClaI) y

50 WdV105: CGGGATCCAGACATGATAAGATACATTG (SEC ID N° 5) (que contiene un sitio de restricción BamHI) y

WdV106: ATAGTTTAGCGGCCGCAACTTGTATTGCAGCTTATAATGG (SEC ID N° 6) (que contiene un sitio de restricción NotI).

El ADN de plásmido purificado del vector SV40 pSL-PL (De La Luna, S. et al., Journal of General Virology 74: 535 - 539, 1.993) se sometió a PCR usando oligonucleótidos WdV105 y WdV106. El fragmento de ADN multiplicado resultante comprendía la señal de poliadenilación de SV40 flanqueada por un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Este fragmento de señal de poliadenilación de SV40 se digirió con BamHI y NotI y el fragmento de ADN largo de 150 pb resultante se aisló de un gen de agarosa y se clonó en un plásmido pBluescript SK digerido asimismo (Promega), proporcionando pAM002.

Se sometió ADN de plásmido pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) purificado a PCR usando los oligonucleótidos WdV101 y WdV102. El fragmento de ADN multiplicado resultante que comprendía la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH, por sus siglas en inglés) flanqueada por un sitio de restricción XhoI y uno NotI con posterioridad en el extremo 5' y un sitio de restricción KpnI en el extremo 3'. Este fragmento de señal de poliadenilación de BGH se digirió con KpnI y NotI, y se aisló el fragmento de ADN largo de 250 pb resultante de un gel de agarosa y se ligó al plásmido pAM002 digerido asimismo. Se realizó la transformación con esta mezcla de ligadura en una cepa *E. coli* insensible a metilación. Esto dio como resultado plásmido pAM003.

Se hibridaron los dos oligonucleótidos complementarios WdV103 y WdV104 incubándolos en un baño de agua que se dejó enfriar de manera autónoma desde la temperatura de ebullición a temperatura ambiente, proporcionando un dictador de and que contenía con posterioridad un sitio de restricción adherente NotI, un PacI, SbfI, PmeI y un sitio de restricción intacto AscI y un sitio de restricción adherente ClaI. Se ligó este ligador al plásmido pAM002 que se digirió con NotI y ClaI y se aisló de un gel de agarosa. Se usó con posterioridad la mezcla de ligadura para transformar una cepa *E. coli* insensible a metilación, proporcionando pAM004.

Se digirió ADN de plásmido purificado del vector de SV40 pSL-PL con ClaI y BamHI. El fragmento de ADN de 2,6 kb resultante que contiene el origen de SV40 y la región última de SV40 se purifica de agarosa y se clona en pAM004 digerido asimismo. Esto dio como resultado el nuevo plásmido de vector de SV40 pAM005.

Ejemplo 2: Clonación molecular de un vector de expresión de luciferasa de SV40 y la producción de partículas de vector de luciferasa de SV40 recombinante.

Se usó el plásmido de expresión pGL3 (Promega) como plantilla para clonar la luciferasa de luciérnaga usando PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos WdV389: 5'-TTGGCGCGCCATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGC-3' (SEC ID N° 7) y WdV407: 5'-CCCTTAATTAATTACACGGCGATCTTCCGCCCTTC-3' (SEC ID N° 8) que contenía respectivamente los sitios de restricción AscI y PacI. El fragmento de luciferasa multiplicado de PCR se digirió con AscI y PacI con posterioridad y se ligó en pAM005, dando como resultado pAM006.

Se diseñaron dos oligonucleótidos WdV437 5' GGGATCCAGACATGATAAGATACATTG 3' (SEC ID N° 9) y WdV442: ATAGTTTAGCGGCCGAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTG (SEC ID N° 10) que contenían sitio de restricción respectivamente BamHI y NotI. Se usó el vector pSL-PL como plantilla para clonación de la secuencia remolque de antígeno T grande usando PCR. Se digirió el fragmento PCR resultante con BamHI y NotI y se clonó en el pAM006 de BamHI y NotI (parcialmente digerido), dando como resultado pAM020.

Se produjeron partículas de vector SV40 recombinante codificando la luciferasa de luciérnaga (SV-Luc) según Vera M. et al., Molecular Therapy 10: 780 - 791, 2.004. Se transinfectaron células COS-1 con ADN de pAM020 digerido y recircularizado con NotI y tres días después de transfección se prepararon lisados brutos del cultivo celular por congelación-descongelación repetida. Se multiplicaron las partículas de vector SV-Luc en una vuelta en células COS-1 creciendo en un matraz T175. Las partículas de vector SV-Luc se concentraron finalmente y se purificaron del lisado bruto por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, proporcionando un stock de vector con 5×10^{11} copias de genoma de SV-Luc por mililitro de cultivo celular.

Ejemplo 3: Construcción de un plásmido de expresión que codifica el antígeno T grande de SV40.

Se diseñó un sitio de clonación múltiple sintético (MCS, por sus siglas en inglés) conteniendo los sitios de restricción para NotI, PacI, SbfI, PmeI, AscI y ClaI. Se diseñaron dos oligonucleótidos WdV436: 5'-GCCGCTTTATTAATTAAGCCCTGCAGGTTGTTAACTTGGCGCGCCTTAT-3' (SEC ID N° 11) y WdV437: 3'-CGATAAGGCGCGCCAAGTTAAACAACCTGCAGGGCTTAATTAATAAAGC-5'. (SEC ID N° 12). Se hibridaron ambos oligonucleótidos WdV436 y WdV437 entre sí y se ligaron en pBluescript SK- (Promega), proporcionando el plásmido recombinante pAM007.

Se diseñaron dos oligonucleótidos para introducir un sitio de restricción NotI adicional WdV452: CGGCGGCCGCGTAC (SEC ID N° 13) y WdV453: GCGGCCGC. Se hibridaron ambos oligonucleótidos y se ligaron a pAM007, proporcionando el vector recombinante pAM008.

El vector de expresión pLenti6.3/V5DEST__verA (Invitrogen) se usó como una plantilla para clonar el activador temprano inmediato de citomegalovirus (CMVie) usando PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos:

WdV286: 5'-TTGGCGCGCCTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGG-3' (SEC ID N° 14) y

5 WdV220: 3'-GACAAGCTTCCAATGCACCGTTCCCGGCCGCGGAGGCTGGATCG-5' (SEC ID N° 15) flanqueando el activador de CMV. Los oligonucleótidos WdV286 y WdV220 contenían los sitios de restricción Ascl y HindIII respectivamente. Con posterioridad, se sometió pLenti6.3/V5DEST_verA purificado a PCR usando los oligonucleótidos WdV286 y WdV220, proporcionando un fragmento de ADN activador de CMV. Este fragmento fue digerido con Ascl y HindIII y ligado en pBluescript SK-, proporcionando pAM009.

El vector de expresión pGL4.22 (Promega) se usó como una plantilla para clonar el gen de resistencia a los antibióticos de puromicina N-acetiltransferasa usando PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos:

WdV454: 5'-CCACCCAAGCTTATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCG-3' (SEC ID N° 16) y

10 WdV455: 3'-TATCCGCTCGAGTCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCATGC-5' (SEC ID N° 17) flanqueando el gen de resistencia a los antibióticos de puromicina N-acetiltransferasa y conteniendo los sitios de restricción HindIII y XhoI, respectivamente. Se sometió plásmido pGL4.22 a PCR usando los oligonucleótidos WdV454 y WdV455, proporcionando el ADNc de puromicina N-acetiltransferasa. Este fragmento fue digerido con HindIII y XhoI y ligado en pAM009, proporcionando pAM010.

15 El vector de expresión pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) se usó como una plantilla para clonar la señal de poliadenilación de BGH usando PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos: WdV456: 5'-CAACCGCTCGAGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATC-3' (SEC ID N° 18) y WdV457: 5'-CGGGGTACCCCATAGAGCCACCGCATCCCC-5' (SEC ID N° 19) flanqueando la señal de poliadenilación y conteniendo los sitios de restricción XhoI y KpnI, respectivamente. Se sometió el pEF5/FRT/V5-DEST de plásmido a PCR usando los oligonucleótidos WdV456 y WdV457, proporcionando el ADNc de la señal de poliadenilación de BGH. Este fragmento se digirió con XhoI y KpnI y se ligó en pAM010, proporcionando pAM011.

20 Se digirió pAM008 de plásmido con Ascl y PmeI y el fragmento de ADN que comprendía el dominio codificador de puromicina N-acetiltransferasa se purificó de un gel de agarosa y se ligó a pAM008, proporcionando pAM012. Se usó ADN de un clon de ADN de SV40 de longitud completa (número de ATCC VRMC-2) como plantilla para clonar la región codificadora de antígeno T de SV40 usando PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos: WdV408: ACCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGC (SEC ID N° 20) conteniendo un sitio de recombinación attB1 y WdV409:

30 TTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG (SEC ID N° 21) conteniendo un sitio de recombinación attB2. WdV408 y WdV409 fueron usados para multiplicar por PCR la región codificadora de antígeno T genómico. Con posterioridad se generó un clon de puerta de entrada del fragmento de ADN generado y pDONR221, dando como resultado pAM013. Se generó un plásmido de expresión de antígeno T por recombinación de la puerta entre pAM013 y pEF5/FRT/V5-DEST, dando como resultado pAM014.

35 Los sitios de restricción de NotI y PmeI en pAM014 de plásmido fueron eliminados por digestión con NotI y PmeI de pAM014 seguido por un tratamiento de ADN polimerasa T4 y ligadura de nuevo, proporcionando pAM015. Se aisló con posterioridad la casete de expresión de antígeno T por una digestión con SphI seguido por un tratamiento de ADN polimerasa T4 y una digestión con NruI.

Para generar un plásmido de lanzadera se diseñaron dos oligonucleótidos:

WdV448:

TCCTGCAGGCGGGGTACCCTAGTCTAGACTAGCCGCGGGGAGTTTTAAACAGCT (SEC ID N° 22) y

WdV449:

40 GTTTAAACTCCCCGCGGCTAGTCTAGACTAGGGTACCCCGCTGCAGGAGTAC (SEC ID N° 23) Se hibridaron los oligonucleótidos WdV448 y WdV449 generando un fragmento de ADN conteniendo los sitios de restricción KpnI, SbfI, KpnI, XbaI, SacII, PmeI y SacI. Este fragmento de ADN se ligó en pBluescript SK- (Promega) digerido con KpnI y SacI, proporcionando pAM016. Se digirió pBluescript SK- de plásmido con KpnI y XbaI y se aisló el fragmento de ADN MCS de un gel de agarosa. El fragmento de ADN de MCS se ligó en pAM016 digerido con KpnI y XbaI, dando como resultado pAM017.

45 Se aisló la casete de expresión de antígeno T conducido por EF1 alfa de pAM015 por una digestión con NruI y SphI seguido por un tratamiento de ADN polimerasa T4. El fragmento de ADN resultante se clonó en pAM017 digerido con EcoRV, dando como resultado pAM018.

50 Se digirió pAM018 de plásmido con SbfI y PmeI y el fragmento de ADN que comprendía la casete de expresión de antígeno T se aisló de un gel de agarosa y se clonó en pAM012 digerido con SbfI y PmeI, dando como resultado pAM019.

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos: WdV487: 5'-GCAGGCTACCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG-3' (SEC ID N° 24) y WdV490: 3'-CCATTCATCAGTTCCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGCCTCCAAAG-5' (SEC

ID N° 25) WdV:489 5'

CTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGATTCCAACCTATGGAAGCTGATGAATGGG-3' (SEC ID N° 26) y WdV488: 5' - AGGAATGTTGTACACCATGCATTTTAAAAAGTC -3' (SEC ID N° 27).

5 Los oligonucleótidos WdV487 y WdV490 y los oligonucleótidos WdV489 y WdV488 se usaron para multiplicar el primer y el segundo exón del antígeno T grande de SV40, respectivamente. Los dos fragmentos de ADN generados se sometieron con posterioridad a un PCR de fusión usando los oligonucleótidos WdV487 y WdV488.

El fragmento de ADN generado comprendiendo la región codificadora de antígeno T grande de SV40 se digirió con NcoI y NsiI y se clonó en pAM019 digerido asimismo, dando como resultado pAM001.

10 En resumen, pAM001 contiene un activador de EF1 alfa aguas arriba de la región codificadora de antígeno T grande y un activador de CMV_{ie} aguas arriba de la región codificadora de puromicina N-acetiltransferasa.

Ejemplo 4: Generación de la estirpe celular productora de Vero y producción de partículas de vector SV40 recombinante.

Se propagaron células Vero (Sigma-Aldrich número de orden: 88020401) y se adaptaron a medio DMEM de cultivo exento de suero (Invitrogen, código del producto: 41966-052).

15 Se realizó adaptación a las condiciones exentas de suero por reducción de manera gradual de suero fetal bovino de 8, 6, 4, 2 y 0 por ciento en el medio cada pase. Desde entonces se cultivaron las células exentas de suero Vero (Vero-SF) en medio OptiPro SFM (Invitrogen) conteniendo 2 por ciento de L-glutamina a 37 grados Celsius y 5 por ciento de CO₂.

20 Se transfectaron células Vero-SF con ADN de pAM001 usando el agente de transfección Exgen 500 (Fermentas, código del producto: R0511) según las prescripciones del suministrador. Se seleccionaron con posterioridad las células Vero-SF transfectadas para integración de la casete génica de expresión de T grande de SV40 en el ADN cromosómico por adición de 2 µg/ml de puromicina al medio de cultivo celular. Se aislaron colonias supervivientes y se propagaron en medio OptiPro SFM conteniendo 2 µg/ml de puromicina y 2 por ciento de L-glutamina. Se transfirieron células resistentes a puromicina a medio OptiPro SFM conteniendo 2 por ciento L-glutamina y 10 por ciento de DMSO y se almacenó a -156 grados Celsius.

Ejemplo 5: Selección de subclones SuperVero productores de alto SV40.

Se cultivaron clones Vero resistentes a puromicina transfectados con pAM001 y células de control de VERO-SF hasta que alcanzaron una confluencia de 50 por ciento. Se transdujeron los cultivos celulares con 50 µl del stock de vector SV-Luc conteniendo aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ copias de genoma del vector.

30 Cuatro horas post-transducción se reemplazó el medio de cultivo por medio OptiPro SFM fresco conteniendo 2 µg/ml de puromicina y 2 por ciento de L-glutamina. Tres días post-transducción se prepararon lisados brutos de las células transducidas por congelación-descongelación (Vera M. *et al.*, Molecular Therapy 10: 780 - 791, 2.004). Se transdujeron células COS-1 cultivadas en DMEM enriquecido con 10 por ciento de suero fetal bovino (Invitrogen) con 100 microlitros de lisado bruto de cada clon de células Vero SF resistentes a puromicina y transfectadas con pAM001. Dos días post-transducción se ensayaron con posterioridad las células COS-1 para expresión de luciferasa de luciérnaga como una medición para la cantidad de producción de vector SV-Luc en el correspondiente clon de células Vero SF resistentes a puromicina y transfectadas con pAM001. Los clones de células que presentaron un nivel de expresión de luciferasa comparable a células COS-1 se seleccionaron, se propagaron y se expandieron para crear un banco de células. Se controló repetidamente clon de células Vero-SF001-86 para producción de SV-Luc y produce cantidades similares de partículas de vector SV40 recombinante como COS-1. Un subclon de células de Vero-SF001-86 indicado Vero-SF001-86-01 se generaba por dilución limitada que produce de manera repetida cantidades similares de partículas de vector SV40 recombinante como el clon de células Vero-SF001-86 parental. PCR cuantitativo según Vera M. *et al.*, Molecular Therapy 10: 780 - 791, 2.004, reveló que el clon celular Vero-SF001-86-01 indicado SuperVero produce de manera rutinaria $1 - 10 \times 10^{11}$ copias de genoma de vector por mililitro de cultivo celular.

Ejemplo 6: Clonación molecular de un vector usado para producción de proteínas recombinantes en células SuperVero.

50 El origen de SV40 de replicación fue aislado por PCR de pTracer-SV40 (Invitrogen) y clonado en el plásmido pGL3 de expresión de luciferasa de luciérnaga (Promega dando como resultado vector de expresión pAM006. Con posterioridad, se transfectaron células SuperVero con pAM006 purificado y el ADN de vector de expresión de pGL3 de control. Se midió la expresión de la luciferasa tres días después de transfección. Las células SuperVero transfectadas con pAM6 produjeron significativamente más luciferasa de luciérnaga comparado con las células transfectadas de pGL3 de control.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amarna Therapeutics BV

<120> MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULA DE VECTOR POLIOMAVÍRICO RECOMBINANTE

<130> 085 WO

<150> EP09158498.7

<151> 2009-04-22

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sondas y cebadores

<400> 1

ccgctcgagt tgcggccgct gtgccttcta gttgccagcc atc

43

<210> 2

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sondas y Cebadores

<400> 2

ggtaccatag agcccaccgc atccccagca tgcc

34

<210> 3

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sondas y Cebadores

<400> 3

ggccgcttta ttaattaagc cctgcagggt gtttaaactt ggcgcgcctt at

52

<210> 4

ES 2 548 990 T3

<211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 4
 cgataaggcg cgccaagttt aaacaacctg cagggettaa ttaataaagc 50

<210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 5
 cgggatccag acatgataag atacattg 28

<210> 6
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 6
 atagtttagc ggccgcaact tgtttattgc agcttataat gg 42

<210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 7
 ttggcgcgcc atggaagacg caaaaacat aaagaaaggc 40

<210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 548 990 T3

<p><223> Sondas y Cebadores <400> 8 cccttaatta attacacggc gatctttccg cccttc</p>	36
<p><210> 9 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sondas y Cebadores <400> 9 gggatccaga catgataaga tacattg</p>	27
<p><210> 10 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sondas y Cebadores <400> 10 atagtttagc ggccgcaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttg</p>	44
<p><210> 11 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sondas y Cebadores <400> 11 gccgctttat taattaagcc ctgcaggttg tttaaacttg gcgcgcctta t</p>	51
<p><210> 12 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sondas y Cebadores <400> 12 cgaaataatt aattcgggac gtccaacaaa tttgaaccgc gcggaatagc</p>	50

ES 2 548 990 T3

<210> 13
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 13
 cggcggccgc gtac 14

<210> 14
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 14
 ttggcgcgcc tcaatattgg ccattagcca tattattcat tgg 43

<210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 15
 gctaggtcgg aggcgcgggc ccttgccacg taaccttcga acag 44

<210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 16
 ccaccaagc ttatgaccga gtacaagccc acggtgcg 38

<210> 17
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 17
 cgtactgggc gttcgggcca cggactgagc tgcctat 38

<210> 18
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 18
 caaccgctcg agctgtgcct tctagttgcc agccatc 37

<210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 19
 ccctacgcc acccgagata ccccatgggg c 31

<210> 20
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 20
 accatggata aagttttaa cagagaggaa tctttgcagc 40

<210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 21
 ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg agg 33

ES 2 548 990 T3

<210> 22
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 22
 tcctgcaggc ggggtaccct agtctagact agccgcgggg agtttaaaca gct 53

<210> 23
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 23
 gtttaaactc cccgcggcta gtctagacta gggtagcccg cctgcaggag tac 53

<210> 24
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 24
 gcaggctacc atggataaag ttttaaacag agag 34

<210> 25
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sondas y Cebadores
 <400> 25
 gaaacctccg aagaccctac gttgactcta aggttgata ccttgactac ttacc 55

<210> 26
 <211> 56
 <212> ADN

ES 2 548 990 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sondas y Cebadores

<400> 26

ctttggaggc ttctgggatg caactgagat tccaacctat ggaactgatg aatggg 56

<210> 27

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sondas y Cebadores

<400> 27

aggaatggtg tacacatgc attttaaaaa gtc 33

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de partículas de vector poliomavérico recombinante que no codifiquen un antígeno T pequeño poliomavérico funcional, que comprende las etapas de:
 - 5 a. Proporcionar una estirpe celular permisiva para poliomavirus natural, comprendiendo dicha estirpe celular un gen codificador de un antígeno T grande poliomavérico funcional integrado de manera estable en el genoma de la célula, en el que la estirpe celular no comprende un gen codificador de un antígeno T pequeño poliomavérico funcional,
 - b. Introducir en dicha estirpe celular un ADN de poliomavirus que no codifique un antígeno T pequeño poliomavérico funcional y que tampoco codifique un antígeno T grande funcional,
 - 10 c. Cultivar dichas células en un medio de crecimiento en condiciones en las que la estirpe celular produzca el antígeno T grande en trans y que permita la formación de partículas de vector poliomavérico recombinante y
 - d. Recoger las partículas de vector poliomavérico recombinante del cultivo celular.
- 15 2. Composición que comprende más de un millón de partículas de vector poliomavérico recombinante que no codifican un antígeno T pequeño poliomavérico funcional y que tampoco codifican un antígeno T grande, siendo dichas partículas de poliomavirus incapaces de replicación en células que sean permisivas para el poliomavirus natural, caracterizada por que la composición no contiene una sola partícula de poliomavirus que sea capaz de replicación en células que sean permisivas para el poliomavirus natural en el que dichas células no expresan un antígeno T grande poliomavérico funcional.
- 20 3. Composición según la reivindicación 2, en la que el poliomavirus es un poliomavirus de primate.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que el poliomavirus es un poliomavirus de simio.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que el poliomavirus se selecciona del grupo que consiste en SV40, SV12, poliomavirus linfotrópico, poliomavirus de mono verde africano y poliomavirus de chimpancé.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que el poliomavirus es SV40.
- 25 7. Estirpe celular permisiva para un poliomavirus, que comprende partículas de vector poliomavérico recombinante que no comprenden un gen codificador de un antígeno T pequeño poliomavérico funcional y tampoco comprenden un gen codificador de un antígeno T grande funcional, comprendiendo dicha estirpe celular un gen integrado de manera estable en el genoma de la célula que codifica un antígeno T grande poliomavérico funcional y no comprendiendo un gen codificador de un antígeno T pequeño poliomavérico funcional.
- 30 8. Composición según las reivindicaciones 2 a 6, para uso como un medicamento.