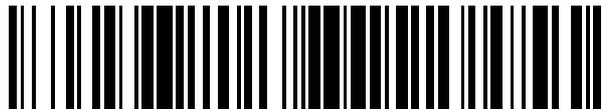


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 990**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/864** (2006.01)

**C07K 14/015** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 07747521 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2035564**

54 Título: **Vectores con codón de iniciación modificado para la traducción de aav-rep78 para la producción de aav en las células de insectos**

30 Prioridad:

**21.06.2006 EP 06115804**

**21.06.2006 US 815262 P**

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

**04.07.2016**

73 Titular/es:

**UNIQURE IP B.V. (100.0%)**

**MEIBERGDREEF 61**

**1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL**

72 Inventor/es:

**HERMENS, WILHELMUS THEODORUS**

**JOHANNES;**

**HAAST, SASKIA JACOBA PETRONELLA;**

**BIESMANS, DENNIS JOHAN y**

**BAKKER, ANDREW CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 575 990 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**

5 Vectores con codón de iniciación modificado para la traducción de aav-rep78 para la producción de aav en las células de insectos

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a la producción de virus adeno-asociados en las células de insecto y a virus adeno-asociado con mejoras en la expresión y estabilidad del proteínas víricas rep que aumentan la productividad de vectores víricos adeno-asociados en las células de insecto.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Virus adeno-asociados (AAV) se pueden considerar como uno de los vectores víricos más prometedores para la terapia genética humana.

AAV tiene la capacidad de infectar eficazmente células humanas que se dividen así como las que no se dividen, el genoma vírico AAV se integra en un sitio cromosómico único en el genoma de la célula huésped, y lo más importante, aunque AAV está presente en muchos seres humanos nunca ha sido asociado a ninguna enfermedad.

20 Ante estas ventajas, virus adeno-asociado recombinante (rAAV) está siendo evaluado en los ensayos clínicos de terapia genética para hemofilia B, melanoma maligno, fibrosis quística, y otras enfermedades.

[0003] Células huésped que soportan replicación AAV in vitro son todas derivadas de tipos de célula de mamífero.

25 Por lo tanto, rAAV para usar en la terapia genética ha sido hasta aquí principalmente producido en líneas celulares mamíferas tales como por ejemplo 293 células, células COS, células HeLa, KB células, y otras líneas celulares mamíferas (ver por ejemplo US 6,156,303, US 5,387,484, US 5,741,683, US 5,691,176, US 5,688,676, US 20020081721, WO 00/47757, WO 00/24916, y WO 96/17947). Vectores rAAV son típicamente producidos en tales sistemas de cultivo celular mamífero proporcionando plásmidos de ADN que contienen el gen terapéutico flanqueado por el origen de replicación AAV (repetidores terminales invertidos o ITR), genes para proteínas de replicación AAV Rep78; Rep68; Rep52, y Rep40, y genes para virión o proteínas estructurales VP1, VP2, y VP3.

30 Además, un plásmido con genes tempranos de adenovirus (E2A, E4ORF6, VARNA) sirve mejorar la expresión de los genes AAV y mejorar el rendimiento de vector (ver por ejemplo Grimm et al., 1998, Hum. Gene Ther. 9: 2745-2760).

Sin embargo, en la mayor parte de estos sistemas de cultivo celular mamífero, el número de partículas AAV generado por célula está sobre el orden de  $10^4$  partículas (revisado en Clark, 2002, Kidney Int. 61(Suppl. 1): 9-15).

35 Para un estudio clínico, más del  $10^{15}$  partículas de rAAV pueden ser requeridas.

Para producir este número de partículas rAAV, transfección y cultivo con aproximadamente  $10^{11}$  células humanas cultivadas 293, el equivalente de 5.000 175-cm<sup>2</sup> matraces de células, serían requeridas, lo que supone la transfección de hasta  $10^{11}$  293 células.

40 Por lo tanto, producción a gran escala de rAAV que usa sistemas de cultivo celular mamífero para obtener material para ensayos clínicos ya ha probado ser problemática, la producción a escala comercial puede incluso no ser realizable.

Además existe siempre el riesgo, que un vector para uso clínico que se produce en un cultivo celular mamífero será contaminado con material indeseable, quizás patógeno presente en la célula huésped mamífera.

45 [0004] Para superar estos problemas de sistemas de producciones de mamífero, recientemente, un sistema de producción AAV ha sido desarrollada usando células de insecto (Urabe et al., 2002, Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943; US 20030148506 and US 20040197895).

50 Para la producción de AAV en células de insecto algunas modificaciones fueron necesarias para conseguir la estequiometría correcta de las tres proteínas cápsidas AAV (VP1, VP2 y VP3), que se basa en una combinación de uso alterno de dos sitios de aceptor de empalme y la utilización subóptima de un codón iniciador ACG para VP2 que no es reproducido con precisión por células de insecto.

55 Para imitar la estequiometría correcta de las proteínas cápsidas en las células de insecto Urabe et al. (2002; supra) usan una construcción que es transcrita en un mensajero policistrónico único que es capaz de expresar la tres proteínas VP sin requerir empalme y donde el codón de iniciador más arriba se sustituye por el codón de iniciador subóptimo ACG.

En aplicación divisionaria (PCT/NL2005/050018) los presentes inventores han además mejorado la infectividad de la producción a base de vectores rAAV producidos por baculovirus por otra optimización de la estequiometría de proteínas cápsidas AAV en las células de insecto.

60 [0005] Para la expresión del proteínas AAV Rep en el sistema de expresión de célula de insecto AAV como inicialmente desarrollado por Urabe et al. (2002; supra), se usa una construcción de baculovirus recombinante que alberga dos independiente unidades Rep de expresión (un para Rep78 y un para Rep52), cada bajo el control de un promotor de célula de insecto separado, los promotores  $\Delta$ IE1 y PolH, respectivamente.

65 En este sistema, el promotor  $\Delta$ IE1, un promotor mucho más débil que el promotor PolH, fue elegido para la transmisión de expresión Rep78 al ser conocida que en células mamíferas, una expresión menos abundante de

Rep78 en comparación con Rep52 favorece producción de vector alto (Li et al., 1997, J Virol. 71: 5236-43; Grimm et al., 1998, supra).

[0006] Más recientemente sin embargo, Kohlbrenner et al. (2005, Mol. Ter. 12: 1217-25) proporcionado que la construcción de baculovirus para la expresión de las dos proteínas Rep, como usado por Urabe et al., padece de una inestabilidad inherente.

Separando la orientación palíndroma de los dos genes Rep en el vector original Urabe y diseñando dos vectores de baculovirus separados para la expresión Rep52 y Rep78, Kohlbrenner et al. (2005; supra) aumentaron la estabilidad de pasaje del vector.

Sin embargo, a pesar de la expresión consistente en Rep78 y Rep52 de las dos construcciones de baculovirus-Rep independientes en las células de insecto por al menos 5 pasajes, el rendimiento de vector rAAV es 5 a 10 veces más bajo en comparación con la construcción de baculovirus-Rep original diseñada por Urabe et al. (2002, supra).

[0007] Hay así todavía una necesidad para superar las limitaciones serias anteriores de producción (comercial) a gran escala de vectores AAV en las células de insecto.

Así es un objeto de la presente invención proveer medios y métodos que permiten una producción de rendimiento elevado y estable (a gran escala) de vectores AAV en las células de insecto.

Descripción de la invención

Definiciones

[0008] Como se utiliza en este caso, el término "enlazado operativamente" se refiere a una conexión de elementos polinucleótidos (o polipéptidos) en una relación funcional.

Un ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos.

Por ejemplo, una secuencia reguladora de transcripción está operativamente enlazada a una secuencia codificante si esta afecta a la transcripción de la secuencia codificante.

Operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que son enlazadas son típicamente contiguas y, donde sea necesario para unir dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en el marco de lectura.

[0009] "Secuencia de control de expresión" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que regula la expresión de una secuencia de nucleótidos a la que está operativamente enlazada.

Una secuencia de control de expresión está "enlazada operativamente" a una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y/o la traducción de la secuencia de nucleótidos.

Así, una secuencia de control de expresión puede incluir promotores, potenciadores, sitios de introducción de ribosoma interno (IRES), terminadores de transcripción, un codón de inicio delante de un gen de codificación de proteína, señal de empalme para intrones, y codones de parada.

El término "secuencia de control de expresión" pretende incluir, como mínimo, una secuencia cuya presencia se diseña por expresión de influencia, y también pueden incluir componentes ventajosos adicionales.

Por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión son secuencias de control de expresión.

El término puede también incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que codones de iniciación indeseables potenciales dentro y fuera de marco, son quitados de la secuencia.

Esto puede también incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que sitios de empalme potenciales indeseables son quitados.

Incluye secuencias o secuencias de poliadenilación (pA) que dirigen la adición de una cola poliA, es decir, una cadena de residuos de adenina en el extremo de 3' de secuencias ARNm referidas como secuencias poliA.

También se puede diseñar para mejorar estabilidad de ARNm.

Secuencias de control de expresión que afectan a la transcripción y estabilidad de la traducción, por ejemplo, promotores, al igual que secuencias que efectúan la traducción, por ejemplo, secuencias Kozak, se conocen en las células de insecto.

Secuencias de control de expresión pueden ser de tal naturaleza que modulan la secuencia de nucleótidos a los que son operativamente enlazadas de manera que son conseguidos niveles de expresión más bajos o niveles de expresión más altos.

[0010] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" o "secuencia reguladora de la transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de una o varias secuencias codificantes, y está localizado arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción de la secuencia codificante, y es estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN-polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de transcripción y cualquiera de las otras secuencias de ADN, incluyendo, pero no limitado a sitios de unión de factor de transcripción, represor y sitios de unión a proteínas activadoras, y cualquiera de las otras secuencias de nucleótidos conocidas por uno de habilidad en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en más tejidos con muchas condiciones fisiológicas y desarrollables.

Un promotor "inducible" es un promotor que es fisiológicamente o desarrolladamente regulado, por ejemplo por la aplicación de un inductor químico.

Un promotor "específico de tejido" solo está activo en tipos específicos de tejidos o células.

5 [0011] Los términos "sustancialmente idéntico", "identidad sustancial" o "esencialmente similar" o "similitud esencial" significan que dos péptido o dos secuencias de nucleótidos, cuando óptimamente alineados, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan parámetros por defecto, comparten al menos un porcentaje determinado de identidad de secuencia tal y como se define en otra parte aquí.

10 GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de su longitud entera, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de espacios.

Generalmente, se usan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización por creación de espacio = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización por extensión de espacio = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas).

Para los nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es nwsgapdna y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89,915-919).

15 Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, timina (T) en la secuencia de ADN es considerada igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN.

20 Alineamientos de secuencia y puntuaciones para identidad de secuencia de porcentaje se pueden determinar utilizando programas informáticos, tales como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA o el software libre EMBOSS para Windows (versión actual 2.7.1-07).

Alternativamente, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar por la búsqueda en las bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

25 [0012] Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas Rep parvovirales de la invención también se puede definir por su capacidad para hibridar con la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO.10, respectivamente, bajo condiciones de hibridación moderadas o preferiblemente severas.

30 Condiciones de hibridación severas son aquí definidas como condiciones que permiten a una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 25, preferiblemente aproximadamente 50 nucleótidos, 75 o 100 y de la forma más preferible de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridar a una temperatura de aproximadamente 65°C en una solución que comprende aproximadamente 1 M sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución con una fuerza iónica comparable, y que se lava a 65°C en una solución que comprende aproximadamente 0,1 M sal, o menos, preferiblemente 0,2 x SSC o cualquier otra solución con una fuerza iónica comparable.

35 Preferiblemente, la hibridación se realiza durante toda la noche, es decir al menos durante 10 horas y preferiblemente el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones normalmente permitirán la hibridación específica de secuencias con aproximadamente 90% o más en identidad de secuencia.

40 [0013] Condiciones moderadas son aquí definidas como condiciones que permiten a una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridar a una temperatura de aproximadamente 45°C en una solución que comprende aproximadamente 1 M sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución con una fuerza iónica comparable, y que es lavada a temperatura ambiente en una solución que comprende aproximadamente 1 M sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquiera otra solución con una fuerza iónica comparable.

45 Preferiblemente, la hibridación se realiza durante toda la noche, es decir al menos durante 10 horas, y preferiblemente el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones normalmente permitirán la hibridación específica de secuencias con hasta 50% en identidad de secuencia.

50 El experto en la técnica será capaz de modificar estas condiciones de hibridación para específicamente secuencias de identificado variando en la identidad entre 50% y 90%.

#### Descripción detallada de la invención

55 [0014] La presente invención se refiere el uso de parvovirus de animal, en particular dependovirus tal es como AAV humano infeccioso o símico, y sus componentes (por ejemplo, un genoma de parvovirus animal) para uso como vectores para introducción y/o expresión de ácidos nucleicos en células mamíferas.

En particular, la invención se refiere a mejoras en la productividad de tales vectores parvovirales cuando se producen en las células de insecto.

60 [0015] Virus de la familia Parvoviridae son virus pequeño de ADN animal.

La familia Parvoviridae se puede dividir entre dos subfamilias: los Parvovirinae, que infectan a vertebrados, y los Densovirinae, que infectan a insectos.

Miembros de la subfamilia Parvovirinae son aquí referidos como los parvovirus e incluyen el género Dependovirus.

65 Como se puede deducir del nombre de su género, los miembros del Dependovirus son únicos en que normalmente requieren coinfección con un virus auxiliar tal como adenovirus o virus de herpes para infección productiva en el cultivo celular.

El género Dependovirus incluye AAV, que infecta normalmente a seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4), y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adeno-asociados bovinos, caninos, equinos y ovinos).

Más información sobre parvovirus y otros miembros del Parvoviridae es descrita en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996).

Por comodidad la presente invención es posteriormente ejemplificada y descrita aquí por referencia a AAV.

Es sin embargo entendido que la invención no está limitada a AAV sino que puede igualmente aplicarse a otros parvovirus.

[0016] La organización genómica de todos los serotipos AAV conocidos es muy similar.

El genoma de AAV es una molécula lineal de ADN monocatenario que tiene menos de aproximadamente 5,000 nucleótidos (nt) de longitud.

Las secuencias repetidoras terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos de codificación únicas para las proteínas (Rep) de replicación no estructurales y las proteínas estructurales (VP).

Las proteínas VP (VP1; -2 y -3) forman la cápsida.

El terminal 145 nt es autocomplementario y es programado de modo que un dúplex intramolecular energéticamente estable que forma una horquilla en forma de T puede formarse.

Estas estructuras de horquilla funcionan como un origen para replicación de ADN vírico, sirviendo como cebadores para el complejo de polimerasa de ADN celular.

Después de la infección wtAAV en células mamíferas, los genes Rep (es decir Rep78 y Rep52) son expresados del P5 promotor y el P19 promotor, respectivamente, y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma vírico.

Un evento de empalme en el ORF Rep produce la expresión de en realidad cuatro proteínas Rep (es decir Rep78; Rep68; Rep52 y Rep40).

Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm no empalmado, que codifica proteínas Rep78 y Rep52, en células mamíferas es suficiente para producción de vector AAV.

También en las células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 bastan para producción de vector AAV.

[0017] Un "vector recombinant parvoviral o AAV" (o "vector rAAV" ) aquí se refiere a un vector que comprende una o varias secuencias polinucleótidas de interés, genes de interés o "transgenes" que son flanqueados por secuencias de repetición de terminal parvoviral o AAV invertido (ITR).

Tales vectores rAAV se pueden replicar y empaquetar en partículas víricas infecciosas en caso de existir en una célula huésped de insecto que expresa productos genéticos rep AAV y cap (es decir proteínas Rep AAV y cap).

Cuando un vector rAAV se incorpora en una construcción de ácidos nucleicos mayor (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o baculovirus usado para la clonación o transfección), luego el vector rAAV es típicamente referido como un "pro-vector" que puede ser "salvado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de embalaje AAV y funciones de auxiliar necesarias.

[0018] En un primer aspecto la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye unas proteínas Rep de parvovirus de animal que codifican secuencias de nucleótidos que comprenden un marco de lectura abierto, donde el codón iniciador para la traducción de la proteína Rep78 parvoviral es un codón iniciador subóptimo.

El codón iniciador subóptimo es preferiblemente un codón iniciador que hace salto de exón parcial.

El salto de exón parcial se entiende aquí como que al menos parte de los ribosomas no inician traducción en el codón iniciador subóptimo de la proteína Rep78 pero a un codón iniciador más abajo, por lo cual preferiblemente el codón iniciador de más abajo es el codón iniciador de la proteína Rep52.

El codón iniciador subóptimo preferiblemente realiza salto de exón parcial en la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula de insecto.

Preferiblemente, el codón iniciador subóptimo realiza salto de exón parcial en una célula de insecto para producir en la célula de insecto una proporción molar de Rep78 a Rep52 en el rango de 1:10 a 10:1, 1:5 a 5:1, o 1:3 a 3:1, preferiblemente a alrededor de 20 - 40 horas tras la infección, más preferiblemente a alrededor de 30 - 40 horas tras la infección, usando una expresión de baculovirus.

La ración molar de Rep78 y Rep52 se puede determinar mediante transferencia de Western como se describe en el ejemplo 1.1.3, preferiblemente utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo común tanto de Rep78 como de Rep52, o utilizando el anticuerpo descrito en el ejemplo 1.1.3.

[0019] El término "codón de iniciación subóptimo" aquí no solo se refiere al codón de iniciación de trinucleótido mismo sino también a su contexto.

Así, un codón iniciador subóptimo puede consistir en un codón ATG "óptimo" en un contexto subóptimo, por ejemplo un contexto no Kozak.

Sin embargo, más preferidos son codones de iniciación subóptima donde el codón de iniciación de trinucleótido mismo es subóptimo, es decir no es ATG.

Subóptimo es aquí entendido como que el codón es menos eficaz en la iniciación de la traducción en un contexto de otro modo idéntico en comparación con el codón ATG normal.

Preferiblemente, la eficiencia del codón subóptimo es inferior a 90, 80, 60,40 o 20% de la eficiencia del codón ATG normal en un contexto de otro modo idéntico.

Métodos para la comparación de la eficiencia relativa de iniciación de traducción son conocidos de por sí a la persona experta.

Codones de iniciación subóptimos preferidos se pueden seleccionar de ACG, TTG, CTG, y GTG.

Más preferido es ACG.

5 [0020] Una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus de animal es aquí entendida como una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep no estructurales que se requieren y son suficiente para producir el vector parvoviral en las células de insecto como las proteínas Rep78 y Rep52.

10 La secuencia de nucleótidos de parvovirus animal es preferiblemente de un dependovirus, más preferiblemente de un virus humano o símico adeno-asociado (AAV) y de la forma más preferible de un AAV que infecta normalmente a seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4).

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus de animal se da en SEC ID n° 10, que representa una parte del genoma de secuencia AAV serotipo-2 que codifica las proteínas Rep.

15 La secuencia codificante Rep78 comprende nucleótidos 11 - 1876 y la secuencia Rep52 codificante comprende nucleótidos 683 - 1876.

Se entiende que los pesos moleculares exactos de las proteínas Rep78 y Rep52, al igual que las posiciones exactas de los codones de iniciación de traducción pueden diferir entre parvovirus diferentes.

Sin embargo, la persona experta sabrá identificar la posición correspondiente en la secuencia de nucleótidos de otros parvovirus que AAV-2.

20 Una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus de animal puede así también ser definidas como una secuencia de nucleótidos:

a) que codifica un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50, 60, 70, 80, 88, 89, 90, 95, 97, 98, o 99% en identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 11;

25 b) que tiene al menos 50, 60, 70, 80, 81, 82, 85, 90, 95, 97, 98, o 99% en identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de posiciones 11 - 1876 de la SEC ID No: 10;

c) la cadena complementaria de esta hibrida a una secuencia de molécula de ácido nucleico de (a) o (b);

d) secuencias de nucleótidos cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (c) debido a la degeneración del código genético.

30 Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica proteínas Rep de parvovirus animales que se requieren y son suficientes para la producción de vector parvoviral en las células de insecto.

[0021] Una otra secuencia de nucleótidos preferida de la invención comprende una secuencia de control de expresión que comprende un secuencia de nueve nucleótidos de SEC.ID N°: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homólogos para SEC. ID N°: 7, arriba del codón iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rep78 parvoviral.

35 Una secuencia con identidad sustancial a la secuencia de nucleótidos de SEC. ID N°: 7 y que ayudará a aumentar la expresión de la proteína Rep78 parvoviral es por ejemplo una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80% o 90% en identidad a la secuencia de nueve nucleótidos de SEC ID n.º: 7.

40 [0022] Eliminación de posibles sitios falsos de iniciación de traducción en las secuencias codificantes de proteína Rep, diferentes de los sitios de iniciación de traducción Rep78 y Rep52, de otro parvovirus será bien entendido por un artesano de habilidad en la técnica, como será la eliminación de sitios de empalme putativo que se pueden reconocer en las células de insecto.

45 Las varias modificaciones de las secuencias parvovirales tipo salvaje para expresión apropiada en las células de insecto se consigue por aplicación de técnicas de ingeniería genética bien conocidas tales como descrito por ejemplo en Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Varias otras modificaciones de zonas de codificación de proteínas Rep son conocidas por el experto en la materia que podrían aumentar la producción de proteína Rep. Estas modificaciones están dentro del campo de la presente invención.

[0023] En otro aspecto la invención se refiere a una construcción de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep parvovirales tal como se ha definido anteriormente.

55 Preferiblemente, en la construcción, la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep parvovirales está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

Estas secuencias de control de expresión al menos incluirán un promotor que está activo en las células de insecto.

Técnicas conocidas por un experto en la técnica para la expresión de genes extranjeros en las células huésped de insecto pueden utilizarse para practicar la invención.

60 Metodología para ingeniería molecular y expresión de polipéptidos en las células de insecto es descrita, por ejemplo, en Summers and Smith. 1986. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. In Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39; US 4,745,051; US2003148506; and WO 03/074714.

65

Un promotor especialmente adecuado para la transcripción de la secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas Rep parvovirales es por ejemplo el promotor poliedro.

Sin embargo, se conocen en la técnica otros promotores que son activos en las células de insecto, por ejemplo los promotores p10; p35, IE-1 o ΔIE-1 y otros promotores descritos en las referencias anteriores.

5 [0024] Preferiblemente la construcción de ácidos nucleicos para la expresión de las proteínas Rep parvoviral en las células de insecto es un vector compatible con célula de insecto.

Un "vector compatible con célula insecto" o "vector" se entiende a una molécula de ácido nucleico capaz de transformación o transfección productiva de un insecto o célula de insecto.

10 Vectores biológicos ejemplares incluyen plásmidos, moléculas lineales de ácido nucleico, y virus recombinantes.

Cualquier vector se puede emplear siempre y cuando sea compatible con célula insecto.

El vector puede integrarse en el genoma de células de insecto pero la presencia del vector en el insecto celular no necesita ser permanente y los vectores episómicos transitorios son también incluidos.

15 Los vectores se pueden introducir por cualquier medio conocido, por ejemplo por tratamiento químico de las células, electroporación, o infección.

En una forma de realización preferida, el vector es un baculovirus, un vector vírico, o un plásmido.

En una forma de realización más preferida, el vector es un baculovirus, es decir la construcción es un vector baculoviral.

20 Vectores baculovirales y métodos para su uso son descritos anteriormente en referencias citadas sobre ingeniería molecular de células de insecto.

[0025] En otro aspecto la invención se refiere a una célula de insecto que comprende no más de un tipo de secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto único que codifica una proteína Rep parvoviral.

25 Preferiblemente el marco de lectura abierto único codifica una o varias de las proteínas Rep parvovirales, más preferiblemente el marco de lectura abierto codifica todas las proteínas Rep parvovirales, de la forma más preferible el marco de lectura abierto codifica la proteína Rep 78 en toda su longitud donde preferiblemente al menos tanto las proteínas Rep 52 como Rep 78 se pueden expresar en la célula de insecto.

30 Se entiende aquí que la célula de insecto puede comprender más de una copia del tipo único de secuencia de nucleótidos, por ejemplo en un vector episómico multicopia, pero que estos son copias múltiples de esencialmente una y la misma molécula de ácido nucleico, o al menos moléculas de ácido nucleico que codifican una y la misma secuencia de aminoácidos Rep, por ejemplo moléculas de ácido nucleico que solo difieren de una a la otra debido a la degeneración del código genético.

35 La presencia de solo un tipo único de molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas Rep parvovirales evita la recombinación entre secuencias homólogas como puede estar presente en diferentes tipos de vectores que comprenden secuencias Rep, lo que puede dar lugar a construcciones de expresión Rep defectuosas que afectan a (la estabilidad de) los niveles de producción parvoviral en las células de insecto.

40 Preferiblemente, en la célula de insecto, la secuencia de nucleótidos que comprende el marco de lectura abierto único que codifica una o varias proteínas Rep parvovirales es parte de una construcción de ácidos nucleicos donde la secuencia de nucleótidos es operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

45 Otra célula de insecto preferida comprende como una "primera" secuencia de nucleótidos una secuencia de nucleótidos que tal como se ha definido anteriormente codifica proteínas Rep parvovirales, preferiblemente una secuencia codificante con un codón iniciador subóptimo tal como se ha definido anteriormente, o una construcción de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente o la célula de insecto que comprende como una "primera" construcción de ácidos nucleicos una construcción de ácidos nucleicos que tal como se ha definido anteriormente comprende tales secuencias de nucleótidos.

50 [0026] Cualquier célula de insecto que permite la replicación de un vector (rAAV) parvoviral recombinante y que se pueden mantener en el cultivo se pueden usar conforme a la presente invención.

Por ejemplo, la línea celular usada puede ser de Spodoptera frugiperda, líneas celulares de drosophila, o líneas celulares de mosquitero, por ejemplo, líneas celulares derivadas de Aedes albopictus.

55 Células de insecto o líneas celulares preferidas son células de las especies de insecto que son susceptibles de infección de baculovirus, incluyendo por ejemplo Se301; Se1ZD2109, SeUCR1, Sf9; Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1; Tn368, HzAm1; Ha2302, Hz2E5, High Five (Invitrogen, CA, EE.UU) y expresSF+® (US 6,103,526; Protein Sciences Corp., CT, USA).

[0027] Una célula de insecto preferida según la invención, además de la descrita anteriormente "primera" secuencia de nucleótidos o una construcción de ácidos nucleicos, comprende además:

60 a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos (ITR) de repetición de terminal invertido parvoviral; y,

b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

[0028] En el contexto de la invención "al menos una secuencia de nucleótidos ITR parvovirales" se entiende como una secuencia palíndroma, que comprende en su mayoría secuencias simétricamente complementarias dispuestas también referidas como regiones "A", "B", and "C".

El ITR funciona como un origen de replicación, un sitio con un papel "cis" en la replicación, es decir, siendo un sitio de reconocimiento proteínas de replicación para que actúan como trans tales como por ejemplo Rep 78 (o Rep68) que reconocen el palíndromo y las secuencias específicas internas al palíndromo.

Una excepción a la simetría de la secuencia ITR es la región "D" del ITR.

Es único (sin tener un complemento dentro de un ITR).

Mellar ADN monocatenario ocurre en la juntura entre las regiones A y D.

Es la región donde la nueva síntesis de ADN se inicia.

La región D está normalmente a un lado del palíndromo y proporciona direccionalidad al paso de replicación de ácido nucleico.

Un parvovirus que se replica en una célula de mamífero típicamente tiene dos secuencias ITR.

Es, sin embargo, posible diseñar un ITR de modo que haya sitios de unión en ambos hilos de las regiones A y regiones D estén situadas simétricamente, una a cada lado del palíndromo.

En un molde de ADN circular bicatenario (por ejemplo, un plásmido), la replicación asistida por Rep78 o Rep68 de ácido nucleico luego procede en ambas direcciones y un ITR único basta para replicar parvoviralmente un vector circular.

Así, una secuencia de nucleótidos ITR se puede usar en el contexto de la presente invención.

Preferiblemente, sin embargo, dos u otro número par de ITR regulares se usan.

De la forma más preferible, dos secuencias ITR se usan.

Un ITR parvoviral preferido es un ITR AAV.

Por razones de seguridad puede ser deseable la construcción de un vector (rAAV) parvoviral recombinante que sea incapaz de diseminarse adicionalmente después de la introducción inicial en una célula.

Tal mecanismo de seguridad para limitar la propagación de vector indeseable en un receptor se puede proporcionar usando rAAV con un ITR quimérico como se describe en US2003148506.

[0029] El número de construcciones de ácidos nucleicos empleado en la célula de insecto para la producción del vector (rAAV) parvoviral recombinante no es limitante en la invención.

Por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más construcciones separadas se pueden emplear para producir rAAV en las células de insecto conforme a los métodos de la presente invención.

Si cinco construcciones son empleadas, una construcción codifica VP AAV 1, otra construcción codifica AAV VP2, otra construcción codifica AAV VP3, otra construcción más codifica la proteína Rep tal como se ha definido anteriormente y una construcción final comprende al menos un ITR AAV.

Si se usan menos de cinco construcciones, las construcciones pueden comprender varias combinaciones de al menos un ITR AAV y VP1, VP2, VP3, y las secuencias codificantes de proteína Rep.

Preferiblemente, dos construcciones o tres construcciones se usan, con dos construcciones que son más preferidas como se ha descrito anteriormente.

Si se usan dos construcciones, preferiblemente la célula de insecto comprende: (a) una primera construcción de ácido nucleico para la expresión de las proteínas Rep tal como se ha definido anteriormente, esta construcción comprende además las secuencias de nucleótidos terceras tal y como se define en (b) arriba (que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral operativamente enlazada por lo menos a una secuencia de control de expresión para la expresión en una célula de insecto; ver también más abajo); y (c) una segunda construcción de ácidos nucleicos que comprende la segunda secuencia de nucleótidos tal y como se define en (a) arriba (que comprende al menos una secuencia de nucleótido ITR parvoviral/AAV).

Si se usan tres construcciones, preferiblemente la misma configuración usada para dos construcciones se usa, excepto que construcciones separadas se usan para la expresión de las proteínas cápsidas y para la expresión de las proteínas Rep.

Las secuencias en cada construcción pueden estar en cualquier orden la una respecto a la otra.

Por ejemplo, si una construcción comprende ITR y un ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas cápsidas de VP, el ORF VP se puede situar en la construcción de manera que, en la replicación del ADN entre secuencias ITR, el ORF VP es replicado o no replicado.

Para otro ejemplo, las secuencias que codifican Rep y/o el ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas cápsidas de VP pueden estar en cualquier orden en una construcción.

Se entiende que también la segunda, tercera y demás construcción(s) de ácido nucleico preferiblemente son unos vectores compatibles con células de insecto, preferiblemente unos vectores baculovirales como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, en la célula de insecto de la invención, una o varias de la primera secuencia de nucleótidos, segunda secuencia de nucleótidos, tercera secuencia de nucleótidos y cuarta secuencia de nucleótidos y opcionalmente otras secuencias de nucleótidos pueden estar integradas de forma estable en el genoma de la célula de insecto.

Un técnico en la materia sabe cómo introducir de forma estable una secuencia de nucleótidos en el genoma de insecto y cómo identificar una célula con tal secuencia de nucleótidos en el genoma.

La incorporación en el genoma se puede ayudar, por ejemplo, usando un vector que comprende unas secuencias de nucleótidos altamente homólogas a regiones del genoma de insecto.

El uso de secuencias específicas, tales como transposones, es otra forma para introducir una secuencia de nucleótidos en un genoma.

[0030] En la invención, la tercera la secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína cápsida (Cap) parvoviral es aquí entendida como que comprende secuencias que codifican cada una de las tres proteínas cápsidas parvovirales, VP1; -2 y -3.

La tercera secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias codificantes de proteína cápsida puede estar presente en varias formas.

Por ejemplo, secuencias codificantes separadas para cada uno de las proteínas cápsidas VP1; -2 y -3 pueden usarse, por lo cual cada secuencia codificante es operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

Más preferiblemente, sin embargo, la tercera secuencia de nucleótidos comprende un marco de lectura abierto único que codifica las tres proteínas cápsidas VP1, VP2, y VP3 (AAV) parvovirales animales, donde el codón iniciador para traducción de la proteína cápsida VP1 es un codón iniciador subóptimo que no es ATG como por ejemplo descrito por Urabe et al. (2002, supra).

Un codón iniciador subóptimo para la proteína cápsida VP1 puede ser tal como se ha definido anteriormente para la proteína Rep78.

Codones de iniciación subóptima más preferidos para la proteína cápsida VP1 se pueden seleccionar de ACG, TTG, CTG y GTG, de los cuales CTG y GTG son más preferidos.

Una tercera secuencia de nucleótidos preferida para la expresión de las proteínas cápsidas comprende además una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a SEC. ID N°: 7, arriba del codón iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida VP1.

Una secuencia con identidad sustancial a la secuencia de nucleótidos de SEC. ID N°: 7 y que ayudará a aumentar la expresión de VP1 es por ejemplo una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80% o 90% en identidad al secuencia de nueve nucleótidos de SEC ID n.º: 7.

Otra tercera secuencia de nucleótidos preferida para la expresión de las proteínas cápsidas más preferiblemente comprende al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida VP1 seleccionada de entre un C en la posición de nucleótidos 12, un A a posición de nucleótidos 21, y un C en posición de nucleótidos 24 (con referencia a posición 1 como el primer nucleótido del codón iniciador de traducción; ven SEC ID NO.1).

Eliminación de posibles codones de iniciación falsos para la traducción de VP1 de otros serotipos será bien entendido por un artesano de habilidad en la técnica, como será la eliminación de sitios de empalme putativo que se pueden reconocer en las células de insecto.

Varias otras modificaciones de regiones de codificación de VP se conocen por el experto en la materia que podrían bien aumentar el rendimiento de VP y virión o tener otros efectos deseados, tales como tropismo alterado o reducción de antigenicidad del virión.

Estas modificaciones están dentro del campo de la presente invención.

Preferiblemente la secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas cápsidas parvovirales es operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto, que al menos incluirán un promotor que está activo en las células de insecto.

Tales secuencias de control y demás técnicas y materiales (por ejemplo vectores) para las proteínas cápsidas parvovirales de expresión en las células huésped de insecto son ya anteriormente descritos para las proteínas Rep.

[0031] En una forma de realización preferida de la invención, la segunda secuencia de nucleótidos presente en las células de insecto de la invención, es decir la secuencia que comprende al menos un ITR parvoviral (AAV), comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por lo cual preferiblemente al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un vector (rAAV) parvoviral recombinante producido en la célula de insecto.

Preferiblemente, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés es una secuencia para la expresión en una célula mamífera.

Preferiblemente, la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos de ITR parvoviral (AAV) y donde al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está localizado entre las dos secuencias de nucleótidos ITR parvoviral (AAV).

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés (para la expresión en la célula mamífera) será incorporada en el vector (rAAV) parvoviral recombinante producido en la célula de insecto si está situada entre dos ITR regulares, o se localiza en cada lado de un ITR diseñado con dos D regiones.

[0032] La segunda secuencia de nucleótidos definida aquí arriba puede así comprender una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un "producto génico de interés" para la expresión en una célula mamífera, situada de manera que será incorporada en un vector (rAAV) parvoviral recombinante replicado en la célula de insecto.

Cualquier secuencia de nucleótidos se puede incorporar para más tarde expresarse en una célula mamífera modificada con el vector (rAAV) parvoviral recombinante producido conforme a la presente invención.

La secuencia de nucleótidos puede por ejemplo codificar una proteína que puede expresar un agente ARNi, es decir una molécula de ARN que es capaz de interferencia de ARN tal como por ejemplo un ARNhc (hairpinARN corto) o un siARN (interferencia corta ARN). "siARN" significa un ARN pequeño de interferencia que es un ARN bicatenario

de longitud corta que no es tóxico en células mamíferas (Elbashir et al., 2001, Nature 411: 494-98; Caplen et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9742-47).

En una forma de realización preferida, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender dos secuencias de nucleótidos y cada una codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula mamífera.

5 Cada una de los dos secuencias de nucleótidos que codifican un producto de interés está localizada de manera que será incorporada en un vector parvoviral (rAAV) recombinante replicado en la célula de insecto.

[0033] El producto de interés para la expresión en una célula mamífera puede ser un producto génico terapéutico.

10 Un producto génico terapéutico puede ser un polipéptido, o una molécula de ARN (siARN), u otro producto génico que, cuando expresado en una célula objetivo, proporciona un efecto terapéutico deseado tal como por ejemplo la ablación de una actividad no deseada, por ejemplo la ablación de una célula infectada, o la complementación de un defecto genético, por ejemplo causando una deficiencia en una actividad enzimática.

15 Ejemplos de productos genéticos de polipéptidos terapéuticos incluyen CFTR, Factor IX, lipoproteína-lipasa (LPL, preferiblemente LPL S447X; ver WO 01/00220), apolipoproteína A1, glucuronosiltransferasa de difosfato de uridina (UGT), proteína de interacción de regulador de Retinitis Pigmentosa GTPase (RP-GRIP), y citocinas o interleukinas como por ejemplo IL-10.

[0034] Alternativamente, o además como un segundo producto génico, la segunda secuencia de nucleótidos definida aquí arriba puede comprender un polipéptido que codifica una secuencia de nucleótidos que sirven como proteínas marcadoras para valorar transformación celular y expresión.

20 Proteínas marcadoras adecuadas para este propósito son por ejemplo la proteína GFP fluorescente, y la timidina quinasa HSV de genes marcadores seleccionables (para selección en el medio HAT), higromicina bacteriana B fosfotransferasa (para selección en la higromicina B), Tn5 fosfotransferasa de aminoglicósido (para selección en G418), y dihidrofolato reductasa (DHFR) (para selección en el metotrexato), CD20, el gen de factor de crecimiento de nervio de baja afinidad.

25 Fuentes para obtener estos genes marcadores y métodos para su uso se proporcionan en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Además, la segunda secuencia de nucleótidos definida aquí arriba puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que puede servir como un mecanismo de fallo de seguridad que permite polimerizar un sujeto de células transducidas con el vector (rAAV) parvoviral recombinante de la invención, si se cree necesario. Tal secuencia de nucleótidos, frecuentemente referida como un gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que es capaz de matar las células transgénicas donde la proteína es expresada. Ejemplos adecuados de tales genes suicidas incluyen por ejemplo el gen de E.coli de deaminasa de citosina o un de los genes de timidina quinasa de virus herpes simplex, citomegalovirus y virus Varicella-Zoster, en cuyo caso ganciclovir puede ser utilizado como profármaco para matar las células transgénicas en el sujeto (ver por ejemplo Clair et al., 1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31: 844-849).

[0035] En otra forma de realización uno de los productos genéticos de interés puede ser una proteína AAV.

40 En particular, una proteína Rep, tal como Rep78 o Rep68, o un fragmento funcional de la misma.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un Rep78 y/o un Rep68, si está presente en el genoma de un vector (rAAV) parvoviral recombinante de la invención y expresada en una célula mamífera transducida con el vector, permite la integración del vector (rAAV) parvoviral recombinante en el genoma de la célula de mamífero transducido. La expresión de Rep78 y/o Rep68 en una célula transducida rAAV o infectada mamífera puede proporcionar una ventaja para ciertos usos del vector (rAAV) parvoviral recombinante, porque permite expresión a largo plazo o permanente de cualquier otro producto génico de interés introducido en la célula por el vector.

[0036] En los vectores (rAAV) parvovirales recombinantes de la invención, el al menos una secuencia(s) de nucleótido que codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula mamífera, preferiblemente está operativamente enlazado por lo menos una secuencia de control de expresión compatible con célula mamífera, por ejemplo, un promotor.

50 Muchos de estos promotores se conocen en la técnica (ver Sambrook y Russel, 2001, supra).

Promotores constitutivos que son aproximadamente expresados en muchos tipos de célula, tales como el promotor CMV, pueden ser utilizados.

55 Sin embargo, serán más preferidos promotores que son inducibles, específicos de tejido, específicos de tipo de célula, o específicos de ciclo celular.

Por ejemplo, para la expresión específica de hígado, se puede seleccionar un promotor de un promotor  $\alpha$ 1-anti-tripsina, un promotor de globulina de unión de hormona de tiroides, un promotor de albúmina, un promotor LPS (unión de globulina tiroxina), un promotor HCR-ApoCII híbrido, un promotor HCR-hAAT híbrido y un promotor de apolipoproteína E.

60 Otros ejemplos incluyen el promotor E2F para selectivos de tumor, y, en particular, expresión selectiva de tumor de célula neurológica (Parr et al., 1997, Nat. Med. 3:1145-9) o el promotor IL-2 para su uso en células de sangre mononucleares (Hagenbaugh et al., 1997, J Exp Med; 185: 2101-10).

[0037] AAV es capaz de infectar un número de células mamíferas.

65 Ver, por ejemplo, Tratschin et al. (1985, Mol. Cell Biol. 5:3251-3260) and Grimm et al. (1999, Hum. Gene Ther. 10:2445-2450).

Sin embargo, la transducción AAV de fibroblastos sinoviales de humano es significativamente más eficaz que en células murinas similares, JJennings et al., *Arthritis Res*, 3:1 (2001), y la tropicidad celular de AAV difiere entre serotipos. Ver, por ejemplo, Davidson et al. (2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3428-3432), que discuten diferencias entre AAV2, AAV4, y AAV5 respecto al tropismo de célula CNS mamífero y eficiencia de transducción.

[0038] Secuencias AAV que se pueden utilizar en la presente invención para la producción de vectores de AAV recombinante en las células de insecto se pueden derivar del genoma de cualquier serotipo AAV.

Generalmente, los serotipos AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa en el aminoácido y los niveles de ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente físicamente y funcionalmente equivalentes, y replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos.

Para la secuencia genómica de los varios serotipos AAV y una visión de conjunto de las similitudes genómicas ven por ejemplo GenBank Número de registro U89790; GenBank Número de registro J01901; GenBank Número de registro AF043303; GenBank Número de registro AF085716; Chlorini et al. (1997, *J. Vir.* 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, *J. Vir.* 45:555-64); Chlorini et al. (1999, *J. Vir.* 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, *J. Vir.* 72:309-319); y Wu et al. (2000, *J. Vir.* 74: 8635-47).

Serotipos AAV 1, 2, 3, 4 y 5 son fuentes preferidas de secuencias de nucleótidos de AAV para usar en el contexto de la presente invención.

Preferiblemente las secuencias ITR AAV para su uso en el contexto de la presente invención son derivadas de AAV1, AAV2, y/o AAV4.

Asimismo, las secuencias Rep (Rep78 y Rep52) codificantes son preferiblemente derivadas de AAV1, AAV2, y/o AAV4.

Las secuencias codificante para las proteínas cápsidas VP1, VP2, y VP3 para su uso en el contexto de la presente invención pueden sin embargo ser tomadas de cualquiera de 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de partículas AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o tipo AAV desarrolladas recién obtenidas por ejemplo por técnicas de redistribución de cápsida y bibliotecas de cápsida AAV.

[0039] Secuencias Rep AAV e ITR están particularmente conservadas entre más serotipos.

Las proteínas Rep78 de varios serotipos AAV son por ejemplo más del 89% idénticas y la identidad de secuencia de nucleótidos total en el nivel de genoma entre AAV2; AAV3A, AAV3B, y AAV6 es de alrededor de 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, *J. Virol.*, 73(2):939-947).

Además, las secuencias Rep e ITR de muchos serotipos AAV se conocen por eficazmente complementar de forma cruzada (es decir, sustituir funcionalmente) secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células mamíferas.

US2003148506 informa que secuencias Rep AAV e ITR también complementan eficazmente de forma cruzada otras secuencias Rep AAV e ITR en las células de insecto.

[0040] Las proteínas de VP AAV se conocen por decidir la tropicidad celular del virión AAV.

Las secuencias de codificación de proteína de VP están significativamente menos conservadas que proteínas y genes Rep entre serotipos de AAV diferentes.

La capacidad de secuencias Rep e ITR para complementar de forma cruzada secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas rAAV pseudotipadas que comprenden las proteínas cápsidas de un serotipo (por ejemplo; AAV3) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo AAV (por ejemplo, AAV2).

Tales partículas rAAV pseudotipadas son una parte de la presente invención.

[0041] Secuencias modificadas "AAV" también se pueden usar en el contexto de la presente invención, por ejemplo para la producción de vectores rAAV en las células de insecto.

Tales secuencias modificadas por ejemplo incluyen secuencias con al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o más identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (por ejemplo, una secuencia con aproximadamente 75-99% en identidad de secuencia de nucleótidos) a un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9, iTR Rep, o VP se puede usar en lugar de secuencias AAV de tipo salvaje, iTR Rep, o VP.

[0042] Aunque similar a los otros serotipos AAV en muchos aspectos, AAV5 difiere de otros serotipos AAV humanos y símicos más que otros serotipos conocidos humano y símicos.

En la vista de esto, la producción de AAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en las células de insecto.

Cuando métodos de la invención se emplean por producir AAV5, se prefiere que una o varias construcciones comprendan, colectivamente en el caso superior a una construcción, una secuencia de nucleótidos que incluye un AAV5 ITR, una secuencia de nucleótidos comprende una secuencia codificante AAV5 Rep (es decir una secuencia de nucleótidos comprende un AAV5 Rep78).

Tales secuencias ITR y Rep se pueden modificar como se desee para obtener producción eficaz de vectores AAV5 o pseudotipados AAV en las células de insecto.

Por ejemplo, el codón de inicio de las secuencias Rep puede ser modificado, los sitios de empalme VP se pueden modificar o eliminar, y/o el codón de inicio VP1 y nucleótidos cercanos se pueden modificar para mejorar la producción de vectores AAV5 en la célula de insecto.

5 [0043] En otro aspecto la invención se refiere así a un método para la producción de un virión (rAAV) parvoviral recombinante (que comprende un vector (rAAV) parvoviral recombinante tal como se ha definido anteriormente) en una célula de insecto.

Preferiblemente, el método comprende los pasos de: (a) cultivo de una célula de insecto como definido aquí arriba bajo condiciones de manera que vector (rAAV) parvoviral recombinante es producido; y, (b) recuperación del vector (rAAV) parvoviral recombinante.

10 Es entendido aquí que el vector (rAAV) parvoviral recombinante producido con el método es preferiblemente un virión parvoviral infeccioso o AAV que comprenden los ácidos nucleicos de vector (rAAV) parvoviral recombinante.

Las condiciones de crecimiento para células de insecto en el cultivo, y la producción de productos heterólogos en las células de insecto en el cultivo son bien conocidas en la técnica y descritas por ejemplo en las referencias citadas anteriores en la ingeniería molecular de células de insectos.

15 [0044] Preferiblemente el método comprende además la etapa de purificación de afinidad de (los viriones comprendiendo) el vector (rAAV) parvoviral recombinante que utiliza un anticuerpo anti-AAV, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado.

20 El anticuerpo anti-AAV es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo especialmente adecuado es un anticuerpo de camélido monocatenario o un fragmento del mismo como por ejemplo obtenible de camellos o llamas (ver por ejemplo Muyldermans, 2001, Biotechnol. 74: 277-302).

El anticuerpo para purificación de afinidad de rAAV preferiblemente es un anticuerpo que específicamente se enlaza un epítipo en una proteína cápsida AAV, por la cual preferiblemente el epítipo es un epítipo que está presente en

25 proteína cápsida superior a un serotipo AAV. Por ejemplo el anticuerpo se puede elevar o seleccionar basándose en enlace específico a cápsida AAV2 pero al mismo tiempo también puede también enlazar específicamente con cápsidas AAV1, AAV3 y AAV5.

[0045] En otro aspecto la invención se refiere a un virión rAAV producido en los métodos descritos anteriormente de la invención, usando las construcciones de ácidos nucleicos y células tal como se ha definido anteriormente.

30 Preferiblemente el virión rAAV comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por lo cual al menos una secuencia de nucleótidos no es una secuencia de nucleótidos de AAV nativa, y por lo cual en la estequiometría de las proteínas cápsidas AAV VP1, VP2, y VP3 la cantidad de VP1: (a) es al menos 100, 105, 110, 120, 150, 200 o 400% de la cantidad de VP2 o (b) es al menos 8, 10, 10,5, 11, 12, 15, 20 o 40% de la cantidad de VP3 o (c) es al menos tal y como se define en tanto (a) y (b).

35 Preferiblemente, la cantidad de VP1, VP2 y VP3 se determina usando un anticuerpo que reconoce un epítipo que es común a cada uno de VP1, VP2 y VP3.

Varios inmunoensayos están disponibles en la técnica que permitirán cuantificar las cantidades relativas de VP1, VP2 y/o VP3 (ver por ejemplo Using Antibodies, E. Harlow and D. Lane, 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

40 Un anticuerpo adecuado que reconoce un epítipo que es común a cada una de la tres proteínas cápsidas es por ejemplo el anticuerpo anti-Cap de ratón B1 (como está comercialmente disponible de Progen, Alemania).

Un virión rAAV preferido según la invención es un virión que comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por lo cual al menos una secuencia de nucleótidos no es una

45 secuencia de nucleótidos de AAV nativa, y por lo cual el virión AAV comprende una proteína cápsida VP1 que comprende una leucina o una valina en posición de aminoácido 1. Un virión de AAV más preferido según la invención tiene la proporción de proteínas cápsidas tal como se ha definido anteriormente y comprende una proteína cápsida VP1 que comprende una leucina o una valina en posición de

50 aminoácido 1.

[0046] En otros aspectos la invención pertenece a las siguientes formas de realización numeradas:

1. Una secuencia de nucleótidos que incluye un marco de lectura abierto que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas Rep parvovirales, donde el codón iniciador para la traducción de la proteína Rep78 parvoviral es un codón iniciador que realiza salto de exón parcial ante expresión en las

55 células de insecto. 2. Una secuencia de nucleótidos según forma de realización 1, donde el codón iniciador es seleccionado de ACG, TTG, CTG, y GTG.

3. Una secuencia de nucleótidos según formas de realización 1 o 2, donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a SEC. ID N°: 7, arriba del codón

60 iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rep78 AAV. 4. Una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las formas de realización de la 1 a la 3, donde las proteínas Rep parvovirales son proteínas Rep (AAV) de virus adeno-asociado.

5. Una construcción de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las formas de realización de la 1 a la 4, donde la secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a

65 secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

6. Una construcción de ácidos nucleicos según la forma de realización 5, donde la secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a un promotor de poliedro.
7. Una construcción de ácidos nucleicos según las formas de realización 5 o 6, donde la construcción es un vector compatible con célula de insecto, preferiblemente un vector baculoviral.
- 5 8. Una célula de insecto que comprende no más de un tipo de secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto único que codifica una o varias proteínas Rep parvovirales.
9. Una célula de insecto según la forma de realización 8, donde el marco de lectura abierto único codifica la proteína Rep en toda su longitud 78 .
- 10 10. Una célula de insecto según la forma de realización 8 o 9, donde la secuencia de nucleótidos que comprende el marco de lectura abierto único que codifica una o varias proteínas Rep parvovirales es parte de una construcción de ácidos nucleicos donde la secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.
- 15 11. Una célula de insecto según cualquier forma de realización de la 8 a la 10, donde la célula de insecto comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto único que codifica una o varias proteínas Rep parvovirales tal y como se define en cualquier forma de realización 1 - 4, o una primera construcción de ácidos nucleicos donde la secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto tal y como se define en cualquiera de las formas de realización 5 - 7.
- 20 12. Una célula de insecto según la forma de realización 11, donde la célula de insecto comprende además:
- a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos (ITR) de repetición invertida de terminal parvoviral; y,
  - b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias que codifican proteína cápsida parvoviral operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.
- 25 13. Una célula de insecto según la forma de realización 12, donde la célula de insecto comprende:
- a) una primera construcción de ácidos nucleicos según cualquier forma de realización de la 5 a la 7, donde la primera construcción de ácidos nucleicos comprende además una tercera secuencia de nucleótidos tal y como se define en (b) de la forma de realización 9; y,
  - b) una segunda construcción de ácidos nucleicos que comprende la segunda secuencia de nucleótidos tal y como se define en (a) de la forma de realización 9.
- 30 14. Una célula de insecto según la forma de realización 13, donde la segunda construcción de ácidos nucleicos es un vector compatible con célula de insecto, preferiblemente un vector baculoviral.
- 35 15. Una célula de insecto según cualquier forma de realización de la 12 a la 14, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés y por la cual al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un vector parvoviral producido en la célula de insecto.
- 40 16. Una célula de insecto según la forma de realización 15, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales y donde al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está localizada entre las dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales.
- 45 17. Una célula de insecto según cualquier forma de realización de la 12 a la 16, donde la tercera secuencia de nucleótidos que incluye un marco de lectura abierto comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas cápsidas VP1, VP2, y VP3 parvovirales donde el codón iniciador para la traducción de la proteína cápsida VP1 parvoviral es seleccionado de ACG, TTG, CTG, y GTG.
- 50 18. Una célula de insecto según la forma de realización 17, donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de control de expresión que comprende un secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a SEC. ID N°: 7, arriba del codón iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida de VP1 parvoviral.
- 55 19. Una célula de insecto según las formas de realización 17 o 18, donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende además al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida de VP1 parvoviral seleccionada de entre un C en la posición de nucleótido 12, un A en la posición de nucleótido 21, y un C en la posición de nucleótido 24.
20. Una célula de insecto según cualquiera de las formas de realización de la 12 a la 19, donde al menos una de la primera secuencia de nucleótidos, segunda secuencia de nucleótidos, y tercera secuencia de nucleótidos está de forma estable integrada en el genoma de la célula de insecto.
21. Una célula de insecto según cualquiera de las formas de realización de la 8 a la 20, donde el parvovirus es AAV.
- 60 22. Un método para la producción de un virión parvoviral recombinante en una célula de insecto, donde el virión comprende una segunda secuencia de nucleótidos tal y como se define en cualquiera de las formas de realización 12, 15 y 16, donde el método incluye las etapas de:
- a) cultivo de una célula de insecto tal y como se define en cualquiera de las formas de realización de la 12 a la 21 bajo condiciones de manera que virión parvoviral recombinante es producido; y,
  - b) recuperación del virión parvoviral recombinante.
- 65 23. Un método según la forma de realización 22, que comprende además la etapa de purificación de afinidad del virión que utiliza un anticuerpo anti-parvoviral, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado.

24. Un método según la forma de realización 23, donde el anticuerpo anti-parvoviral es un anticuerpo camélido monocatenario o un fragmento del mismo.

25. Un método según cualquier forma de realización de la 22 a la 24, donde el virión parvoviral recombinante es un virión de AAV recombinante.

5 [0047] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos que suceden a la palabra están incluidos, pero los elementos no específicamente mencionados no están excluidos.

10 Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "a" o "un" no excluye la posibilidad que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "a" o "un" por lo tanto normalmente significa "al menos uno".

#### Descripción de las figuras

15 [0048] Figura 1:  
 A) La organización de expresión Rep en el genoma de AAV de tipo salvaje. Los genes Rep78 y Rep 52 son expresados respectivamente de promotores P5 y P19. Expresión de Rep68 y Rep40 (que son las variantes empalmadas de resp. Rep78 Y Rep52) no es mostrada.  
 20 Ambas unidades de expresión contienen un sitio de iniciación ATG.  
 B) La construcción de la invención tiene el ORF Rep bajo el control de un promotor único (por ejemplo el promotor (PolH) poliedro). Este promotor conduce la expresión tanto de Rep78 como de Rep52 debido a que el codón iniciador Rep78 ATG se convierte en el codón iniciador alterno ACG y es parcialmente saltado por el ribosoma.  
 25 C) La construcción original por Urabe et al. (2002; supra) conduce Rep78 y Rep52 independientemente de dos promotores diferentes (resp.  $\Delta$ IE1 y polH).

30 Figura 2: Análisis de electrotransferencia de proteínas Rep expresadas de baculovirus recombinante que fue pasajeado 5 veces en las células de insecto. El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (original REP/Bac-to-Bac) produce una reducción lenta de expresión de Rep78/52 durante 5 pasajes. La unidad de expresión para Rep78 y 52 diseñada por Urabe et al., 2002 insertado en el esqueleto de baculovirus PSC (REP original / PSC) también resulta en una reducción de expresión de Rep78/52 tras el pasaje en las células de insecto.  
 35 Sin embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP con el codón iniciador ACG en el PSC esqueleto (REP-ACG / PSC) produce expresión estable de Rep78/52 por al menos 5 pasajes. El análisis de electrotransferencia fue realizado como se describe en el ejemplo 1.1.3.

40 Figura 3: Resultados de la tabla 1 fijados en un gráfico.  
 Figura 4: Comparación de las estabildades de varias construcciones rAAV en las células de insecto. La producción rAAV en células SF+ fue realizada como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Para todas las producciones el ITR que contiene baculovirus y el gen de cápsida que contiene baculovirus fueron idénticos, el número de pasaje fue el mismo que el gen Rep que contiene baculovirus. 4 genes Rep diferentes que contienen baculovirus fueron usados: 1) el REP-ACG / PSC, 2) SLR: la construcción original por Urabe et al. (2002; supra), 3) Rep52 + Rep78(B2B): dos Bac-to-Bac baculovirus separados, uno con el gen Rep 78 y el otro con el gen Rep 52. 4) Rep52 + Rep78(PSC): dos baculovirus de ciencias de proteína separada, uno conteniendo el gen Rep 78 y el otro con el genRep 52.

50 Figura 5: Estabilidad de las construcciones REP-ACG / PSC de baculovirus hasta el pasaje 8. Producciones rAAV en células SF+ fueron realizadas como se describe en el ejemplo 1.

Figura 6: Comparación del efecto del efecto de pasaje en la expresión de proteína rep de la construcción original de Urabe et al. (2002; supra) con una construcción REP-ACG / PSC conforme a la invención. Los pasajes de baculovirus y la transferencia Western fueron hechos como se describe en el ejemplo 1. Durante un pasaje normal de los baculovirus rep, se tomaron muestras a 40 horas después de la adición de los baculovirus a las células SF y la transferencia Western fue realizada.

#### Ejemplos

60 Ejemplo 1: construcciones Rep

##### 1.1. Materiales y métodos

##### 1.1.1 Construcción de plásmido de Baculovirus

65 [0049] Para expresar Rep78 y Rep52 de un único mensajero bicistrónico ARN, el codón iniciador ATG de Rep78 situado en el vector de expresión pFastBacDualSLR (Urabe et al., 2002, supra) fue convertido en ACG.

El cebador hacia arriba usado fue:

BamHI

5'-cgcggtacctgttaagACGGCGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTC-3' (SEC ID NO.8)

5 SECUENCIA DE CEBADOR hacia adelante

[0050] El cebador 3' que fue usado en la reacción por PCR flanquea el gen REP78 y contiene un sitio de XbaI (TCTAGA):

XbaI

10 5'-AGGCTCTAGATTCGAAAGCGGCCCG-3'  
(SEC ID NO.9)

SECUENCIA DE CEBADOR inverso

15 [0051] La secuencia entre el conjunto de cebador mencionado arriba fue amplificada por PCR (volumen de reacción 50 µl; 1x Pfx Amp. búfer, 0,3mM del dNTP, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 150mM cebador forw., 150mM cebador giran., 2x solución intensificadora, modelo 50ng (pFastBacDualSLR), 1 U platino Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) utilizando el protocolo siguiente: 1 ciclo de 95°C, 5 min; 35 ciclos de 95°C, 15 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 2 min; 1 ciclo de 72°C, 10 min; 4°C, para siempre).

20 El producto PCR fue clonado en PCR-blunt II-TOPO usando el equipo de clonación de PCR Zero Blunt TOPO PCR. El Rep78 fue subclonado en pFastBacDual (Invitrogen) que utiliza los sitios de restricción SpeI y XbaI.

El casete de expresión Rep mutado fue finalmente clonado (usando enzimas de restricción BstZ17I y AvrII) en la construcción de expresión de baculovirus (cortado con EcoRV y XbaI) pPSC10 (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT, USA).

25 El análisis de secuencias de la construcción fue verificado por Baseclear, Leiden, Países Bajos.

1.1.2 Producción de baculovirus recombinante

30 [0052] Baculovirus recombinantes derivados del virus nuclear Autographa californica (AcNPV) fueron producidos utilizando el GeneXpress BaculoKIT (Protein Sciences Corporation).

Transfección fue realizada de la siguiente manera: en un tubo de fondo redondo de 14ml se mezclaron 200 µl medio GRACE con 6 µl de cellfectina (Invitrogen), y en un tubo de Eppendorf 200 µl medio GRACE fueron mezclados con 50 µl ADN vírico (ciencias de proteína) y 2 µg de plásmido de transferencia (Rep).

El contenido del tubo de Eppendorf fue adicionado al tubo y mezclado cuidadosamente.

35 Después un periodo de incubación de 30 minutos a RT 1,300 µl GRACE se añadió a la mezcla de transfección.

Células de insecto en un matraz T25 fueron lavados con medio GRACE y la mezcla de transfección fue añadida gota a gota a la capa celular.

Tras una incubación de 6 horas a 28°C suero SF900II suplementado con 10% FBS fue añadido cuidadosamente y el matraz T25 fue metido en un hornillo a 28°C durante 5 días después de los cuales el baculovirus recombinante fue cosechado.

40

1.1.3 Análisis de electrotransferencia

[0053] Células de insecto (SF+) fueron infectadas con baculovirus-REP.

45 A16, 40, y 64 horas tras la infección, una muestra fue tomada de las células y las células fueron lisadas añadiendo 0,1V 10 x TRIS búfer de lisis (1,5M NaCl, 0,5M TRIS, 0,01M MgCl, 1% Tritón X-100, pH8.5, filtro esterilizado) e incubado a 28°C durante 30 minutos en una coctelera (Innova 44, New Brunswick).

ADN desnudo y ARN fueron degradados por incubación con benzonasa a 37°C durante 30 minutos.

Lisado celular fue centrifugado (1,900 x g; 15 min; 4°C).

50 NuPage LDS búfer de muestra (4x; Invitrogen) fue adicionado a una muestra del sobrenadante y fue cargado sobre un gel 4-12% Bis-Tris (120V).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (BioRad) durante 30 minutos, 10V (transferencia Semidry).

Inmunoquímica Western fue realizada por el bloqueo de la membrana con búfer de bloqueo Superblock-PBS (PIERCE) y se realizó incubación subsecuente con ratón anti-Rep (303.9, Progen, Alemania; dilución 1:50) y HRP anti-ratón conejo (DAKO, dilución 1:500).

55 Las proteínas Rep fueron visualizadas por coloración quimioluminiscente con lumi-luz más sustrato de transferencia Western (Roche).

1.2 Resultados

60

[0054] El rendimiento de la recién diseñada construcción Rep de la invención (REP-ACG / PSC) fue comparado con las construcciones Rep originales en tanto 1) esqueleto de baculovirus PSC como en 2) esqueleto de baculovirus Bac-to-Bac (Urabe et al. 2002).

Las tres construcciones fueron pasajeadas en serie hasta pasaje 5.

Experimentos de producción de AAV1-LPL fueron realizados utilizando las construcciones Rep de pasajes 2, 3, 4 y 5 en combinación con un AAV-LPL y un baculovirus recombinante de AAV-Cap de respectivamente pasajes 2, 3, 4 y 5 (los AAV-LPL y Baculovirus recombinante de AAV-Cap usados aquí son descritos abajo en el ejemplo 2).

Rendimiento de producción de AAV1-LPL fue determinado por qPCR y se muestra en la tabla 1.

5 El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (original REP/Bac-to-Bac) produce una reducción rápida de producción de AAV por 5 pasajes.

La unidad de expresión para diseñado Rep por Urabe et al., 2002 insertada en el esqueleto de baculovirus PSC (REP original / PSC) también resulta en una reducción de producción de AAV tras el pasaje en las células de insecto.

10 Sin embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP con el codón iniciador esqueleto ACG en el PSC (REP-ACG / PSC) produce producción de AAV estable por al menos 5 pasajes.

Por lo tanto, la producción reproducible de rendimientos de AAV-LPL a lo largo de diferentes pasajes (por ejemplo 2 a 5) fue solo obtenida usando baculovirus con la construcción REP-ACG.

15 Tabla 1: Producción de viriones rAAV usando las construcciones de baculovirus de diferentes pasajes: células Sf9 fueron infectadas con tres baculovirus recombinantes que codifican una unidad de LPL-vector de pasaje 2, 3, 4 o 5, unidad de pasaje 2, 3, 4 o 5 de una expresión Rep y una unidad de pasaje expresión de Cap 2, 3, 4 o 5.

Tras tres días, las células fueron cosechadas y rendimientos AAV (genomas de vector por ml; vg/ml) fueron determinados por qPCR.

20

Pasaje	REP original / PSC vg/ml	REP-ACG / PSC vg/ml	REP original / Bac-to-Bac vg/ml
2	5,38E+09	3,04E+09	3,62E+10
3	9,57E+09	4,77E+09	7,28E+09
4	1,66E+09	7,81E+09	7,59E+08
5	7,35E+08	9,90E+09	2,03E+08

Tabla 2: Q-PCR realizado en el varias construcciones Bac-Rep tras pasaje en las células de insecto (pasaje 2-5).

	Graduación (gc's/ml)			proporción ORF/Rep78	proporción ORF/Rep52
	ORF	Rep78	Rep52		
REP/Bac-to-Bac Original P2	1,4E+09	2,2E+08	2,4E+08	6,42	5,82
REP/Bac-to-Bac Original P3	6,4E+08	5,6E+07	5,0E+07	11,43	12,93
REP/Bac-to-Bac Original P4	2,1E+09	7,1E+07	6,5E+07	29,47	32,02
REP/Bac-to-Bac Original P5	1,7E+09	3,2E+07	2,5E+07	53,68	69,67
REP-ACG / PSC (C4) P2	3,0E+09	2,7E+09	2,9E+09	1,11	1,04
REP-ACG / PSC (C4) P3	2,3E+09	2,0E+09	2,2E+09	1,11	1,05
REP-ACG / PSC (C4) P4	2,5E+09	2,2E+09	2,3E+09	1,13	1,08
REP-ACG / PSC (C4) P5	2,7E+09	2,1E+09	2,5E+09	1,26	1,07
REP-ACG / PSC (A3) P2	2,5E+09	2,2E+09	2,5E+09	1,18	1,00
REP-ACG / PSC (A3) P3	4,2E+09	3,9E+09	4,0E+09	1,08	1,04
REP-ACG / PSC (A3) P4	2,7E+09	2,4E+09	2,5E+09	1,10	1,05
REP-ACG / PSC (A3) P5	1,5E+09	1,5E+09	1,5E+09	1,03	0,98
REP/Bac-to-Bac P2 Original	1,0E+09	1,1E+09	1,1E+09	0,95	0,87
REP/Bac-to-Bac P3 Original	7,1E+08	6,7E+08	8,1E+08	1,07	0,88
REP/Bac-to-Bac P4 Original	1,3E+08	1,1E+08	1,3E+08	1,18	1,03
REP/Bac-to-Bac P5 Original	1,3E+08	5,3E+07	6,9E+07	2,34	1,82

25 [0055] La tabla 2 muestra los resultados de un ensayo (q-PCR) de PCR cuantitativo que fue diseñado para la unidad de expresión Rep en los baculovirus recombinantes y para un ORF de baculovirus flanqueante (copias de gen por ml; gc's/ml).

La proporción entre los valores Q-PCR determina la presencia de deleciones en el Rep-baculovirus.

Una proporción de 1 teóricamente significa que todos los baculovirus en el lote contienen una secuencia 52 o Rep78 recombinante

30

El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (original REP/Bac-to-Bac) muestra cantidades significativas del baculovirus recombinante en pasaje 5 tiene deleciones en las secuencias Rep.

La unidad de expresión para Rep78 y 52 diseñada por Urabe et al., 2002 insertada en el esqueleto de baculovirus PSC (REP original / PSC) muestra una pérdida muy temprana y espectacular de baculovirus recombinante. Sin embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP con el codón iniciador ACG en el esqueleto PSC (REP-ACG / PSC) (clon C4 y A3) muestra baculovirus recombinantes estables lo largo de al menos 5 pasajes.

5

Ejemplo 2: construcciones Cap

2.1.1 Construcción plásmida de Baculovirus

[0056] Para expresar VP1,2,3 de un ARN mensajero policistrónico único, la construcción de baculovirus-AAV-Cap fue diseñada como se describe en Urabe et al., 2002, supra.

Brevemente, el codón iniciador ATG de VP1 mutó a ACG.

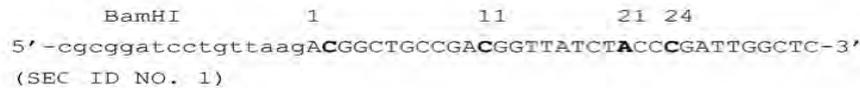
Un codón iniciador ATG potencial en la posición 11 ha sido cambiado a ACG.

El sitio aceptor de empalme hacia abajo del codón iniciador VP1 fue destruido (mutación en las posiciones 21 y 24).

15 El casete de expresión Cap mutado fue clonado en una construcción de expresión de baculovirus; pFastBacDual (pFBDAAV1VPm11) con sitios de restricción BamH1/StuI.

Este plásmido (pFBDAAV1VPm11) fue la materia prima para la introducción de codones de iniciación alterna para VP1.

El cebador directo usado por Urabe et al. (2002; supra) para introducir las mutaciones mencionadas fue:



20

[0057] Los siguientes cebadores hacia adelante fueron usados para hacer las construcciones de expresión usando pFBDAAV1VPm11 (Urabe et al., 2002, supra) como materia prima:

25 5'-cgcggatcctgttaagTTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3  
(SEC ID NO.2)

5'-cgcggatcctgttaagATTGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3  
(SEC ID NO.3)

30

5'-cgcggatcctgttaagGTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3  
(SEC ID nº 4)

35

5'-cgcggatcctgttaagCTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3  
(SEC ID nº 5)

[0058] El cebador inverso que fue usado en las reacciones PCR con los cebadores anteriores hacia adelante fue dirigido a la posición ~ 230 pares de cebadores hacia abajo del codón iniciador VP1 y contiene un único sitio Stu I (AGGCCT).

40

5'-GTCGTAGGCCTTGTGCTGCTCGAGGGCCGC-3  
(SEC ID nº 6)

[0059] Fragmentos fueron amplificados con los conjuntos mencionados arriba de pares de cebador hacia adelante y atrás por PCR.

45

Tras la digestión de productos PCR con BamHI y StuI los productos PCR fueron subclonados en los sitios BamHI / StuI de pFBDAAV1vpm11 dando como resultado las varias construcciones de baculovirus-AAV-Cap que deben evaluarse.

Construcciones de ADN fueron verificados por análisis de secuencias en Baseclear, Leiden, Países Bajos.

50

2.1.2 Producción de baculovirus recombinante

[0060] Baculovirus recombinantes derivados del virus de polihidrosis nuclear de Autographa californica (AcNPV) fueron producidos utilizando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). rBac-Cap fue amplificado por la infección de  $2 \times 10^6$  Sf9 células por ml a una moi de 0,1.

55

Tres días después de la infección de las células fueron centrifugadas y el sobrenadante con el virus fue recuperado.

2.1.3 Producción de AAV recombinante

[0061] Lotes rAAV fueron producidos utilizando tres baculovirus recombinantes según Urabe et al., 2002. Sin embargo, para este estudio un baculovirus albergó una construcción de expresión para el transgen LPL<sup>S447X</sup>.

60

El agente terapéuticamente activo expresado del transgen es una variante de origen natural de lipoproteína-lipasa de humano, un polipéptido monocatenario de 448 aminoácidos.

La variante LPL<sup>S447X</sup> tiene una delección de dos aminoácidos en el C-término de la proteína.

El segundo baculovirus albergó una construcción de expresión para los genes de replicación AAV, Rep 78 y Rep 52.

5 El tercer baculovirus albergó la secuencia cápsida AAV1 con bien un ACG o un codón iniciador TTG, CTG, GTG para VP1.

[0062] Lotes de rAAV de mamífero producidos con el sistema de transfección de plásmido fueron producidos según Grimm et al., 1998 (Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. Hum Gene Ther. 1998 Dec 10;9(18):2745-60).

### 2.1.3 Análisis de electrotransferencia Western

[0063] Células de insecto fueron infectadas con baculovirus-Cap.

15 Tres días tras la infección, las células fueron centrifugadas (3.000 g; 15 min).

El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro Millex 0,22µm.

El búfer de muestra NuPage LDS (Invitrogen) se añadió a una muestra del sobrenadante y fue cargado sobre un gel 4-12% Bis-Tris.

El gel fue ejecutado a 100V.

20 Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante 1 hora, 100V, 350mA.

Inmunoquímica Western fue realizada por el bloqueo de la membrana con 1% de leche desnatada seca Marvel y posteriormente se realizó incubación con anti-Cap de ratón (B1 de Progen, Alemania; dilución 1:50) y HRP anti-ratón de conejo (DAKO, dilución 1:100).

25 VP1, 2 y 3 fueron visualizadas por coloración quimioluminiscente con lumi-luz más sustrato de transferencia Western (Roche).

### 2.1.4 Mediciones bioquímicas

[0064] Actividad de humano LPL<sup>S447X</sup> fue ensayada tal y como se describe anteriormente usando un sustrato de emulsión de trioleoilglicerol radiactivo (Nilsson-Ehle y Scholtz, 1976).

30 Masa inmunoreactiva de Humano LPL<sup>S447X</sup> fue probada utilizando un sándwich ELISA con IgY de pollo y anticuerpos anti-hLPL de ratón 5D2 (Liu et al., 2000).

Niveles de triglicérido de plasma fueron medidos usando equipos comerciales después de los protocolos del fabricante (Boehringer Mannheim, #450032).

35

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Construcción de baculovirus recombinante

40 [0065] Para introducir codones de iniciación alternos diferentes para la expresión VP1 en el plásmido de baculovirus diseñado por Urabe et al. (2002; supra) una serie de cebadores hacia arriba fueron diseñadas con un sitio de restricción de BamHI y bien un codón TTG, ATT, GTG o CTG en lugar del codón iniciador ACG de VP1.

PCR que usa estos cebadores en combinación con un cebador hacia abajo con un sitio Stul resultó en fragmentos amplificados que fueron subclonados en el sitio BamHI/Stul de pFBDVPM11 (Bac-Cap).

45 Los plásmidos de baculovirus resultantes fueron usados para la preparación de baculovirus recombinantes que utilizan el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac.

Los baculovirus recombinantes preparados fueron infectados en las células de insecto para producir cápsidas AAV.

Tres días después de la infección, la expresión viral de proteína de los lotes de baculovirus diferentes fue determinada en técnicas de electrotransferencia Western.

50 De las técnicas de electrotransferencia Western está claro que la construcción de baculovirus con el codón iniciador TTG para VP1 expresó esta proteína a un nivel más alto en comparación con el codón iniciador ACG previamente usado.

La proporción entre VP1 y VP2 que utiliza el codón TTG resultó ser 1:1 que es similar a la que se proporciona para el AAV salvaje tipo (no mostrado).

55

### 2.2.2 Infección de lotes rAAV en células en el cultivo

[0066] Para investigar la infectividad de las cápsidas AAV derivada de baculovirus recombinantes con el TTG, codón iniciador rAAV fue generado.

60 También un lote rAAV fue generado por transfección plasmídica en células de mamífero HEK293.

Una graduación de genoma de vector de ambos lotes rAAV fue determinada por qPCR.

Esta graduación fue usada para infectar células HEK 293 en una placa de microtitulación a una moi en aumento.

Dos días tras la infección, fue realizado un ensayo cuantitativo (ensayo masa LPL<sup>S447X</sup>) para el producto de transgen (LPL<sup>S447X</sup>) en el medio de las células infectadas.

65 El ensayo mostró que la cantidad de LPL<sup>S447X</sup> producido por rAAV producido por baculovirus fue similar al LPL producido por el rAAV producido por plásmido (no mostrado).

2.2.3 Inyección de lotes rAAV en ratones

[0067] Los lotes rAAV producidos con el sistema de producción de baculovirus y con el sistema de producción de plásmido de mamífero convencional fueron inyectados intramuscularmente en ratones para seguir la actividad de proteína LPL<sup>S447X</sup> y triglicérido en ayuno in vivo.  
 3 días, 7 días y 2 semanas después de la inyección de sangre se tomaron y evaluaron muestras.  
 Entre 3 y 7 días tras la administración de virus, plasma de sangre evaluada de tanto ratones inyectados con rAAV de mamífero como un ratón inyectado con baculo-rAAV fue convertido de lácteo a completamente claro.  
 Plasma sanguíneo derivado de un ratón baculo-rAAV-inyectado permaneció relativamente lácteo, sin embargo nivel de grasa fue claramente reducido.  
 Niveles de triglicérido fueron bajados respectivamente de todos los ratones tratados (no mostrados).  
 En el día 14 TG niveles en tanto TG niveles de AAV de mamífero como ratones tratados baculovirus-(TTG)-AAV fueron reducidos a 96%.  
 Muestras de plasma tomadas dos semanas tras la administración del virus mostró que la actividad LPLS447X de los ratones tratados con AAV de baculovirus y AAV de mamífero fue similar (no mostrado).

Ejemplo 3: estabilidad de construcciones rAAV con codón iniciador modificado Rep 78 en las células de insecto

3.1 Comparación de las estabildades de varias construcciones rAAV en las células de insecto

[0068] Producciones de rAAV en células SF+ fueron realizadas como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Para todas producciones el ITR que contiene baculovirus y el gen de cápsida que contiene baculovirus fueron idénticos, el número de pasaje fue el mismo que el gen Rep que contiene baculovirus. 4 genes Rep diferentes que contienen baculovirus fueron usados: 1) el REP-ACG / PSC, 2) SLR: la construcción original por Urabe et al. (2002; supra), 3) Rep52 + Rep78(B2B): dos Bac-to-Bac baculovirus separado, uno con el gen Rep 78 y el otro con el gen Rep 52. 4) Rep52 + Rep78(PSC): dos baculovirus de ciencias de proteína separados, uno que contienen el gen Rep 78 y el otro el gen Rep 52.

[0069] Los resultados se muestran en la figura 4. En el quinto pasaje de baculovirus ya se mejora la producción de rAAV por más de un factor 10 que utiliza un REP-ACG / PSC conforme a la invención en comparación con la construcción Rep original y en comparación con las construcciones Rep divididas.

3.2 Estabilidad de las construcciones de baculovirus hasta el pasaje 8

[0070] Producciones de rAAV en células SF+ fueron realizadas como se describe en el ejemplo 1. Para todas producciones, el ITR que contiene baculovirus y el gen de cápsida que contiene baculovirus fueron idénticos, el número de pasajes fue el mismo que el REP-ACG / PSC baculovirus.  
 Resultados se muestran en la figura 5.  
 El REP-ACG / PSC baculovirus es estable hasta al menos de pasaje 8. Títulos de producción rAAV REP-ACG / PSC son estables hasta al menos 8º pasaje del baculovirus.

3.3 Efecto de pasaje en la expresión de proteína rep

[0071] El efecto del número de pasaje en la expresión de proteína Rep para la construcción original de Urabe et al. (2002; supra) fue comparado con una construcción REP-ACG / PSC conforme a la invención. Los pasajes de baculovirus y la transferencia Western fueron hechos como se describe en el ejemplo 1. Durante un pasaje normal de los baculovirus rep, se tomaron muestras 40 horas después de la adición de los baculovirus a las células SF y electrotransferencia Western fue realizada. La figura 6 muestra claramente la expresión Rep disminuida en pasajes más altos en comparación con anteriores pasajes para la construcción original Urabe (SLR), mientras la expresión Rep en la construcción REP-ACG / PSC permanece igual en los pasajes más altos en comparación con los inferiores.

Listado de secuencias

[0072]  
 <110> Amsterdam Molecular Therapeutics B.V.

<120> Vectores AAV con Rep mejorado que codifica secuencias para la producción en las células de insecto

<130> P6009362PCT

<140> P6009362PCT

<141> 2007-06-21

<150> EP06115804.4  
 <151> 2006-06-21  
  
 <150> US 60/815,262  
 5 <151> 2006-06-21  
  
 <160> 11  
  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 10  
 <210> 1  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> secuencia sintética artificial  
 15  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 1  
 20 cgccgacggt gtaagacgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49  
  
 <210> 2  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 25 <213> secuencia sintética artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 2  
 30 cgccgacggt gtaagttgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49  
  
 <210> 3  
 <211> 49  
 35 <212> ADN  
 <213> secuencia sintética artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40  
 <400> 3  
 cgccgacggt gtaagattg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49  
  
 <210> 4  
 45 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> secuencia sintética artificial  
  
 <220>  
 50 <223> cebador  
  
 <400> 4  
 cgccgacggt gtaaggtgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49  
  
 <210> 5  
 55 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> secuencia sintética artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador  
  
 <400> 5  
 65 cgccgacggt gtaagctgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49  
  
 <210> 6

<211> 30  
 <212> ADN  
 <213> secuencia sintética artificial

5 <220>  
 <223> cebador

<400> 6  
 gtcgtaggcc ttgctgtgct cgagggccgc 30

10 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> virus adeno-asociado 2

15 <400> 7  
 cctgtaag 9

<210> 8  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador

25 <400> 8  
 cgcggtacct gtaagacgg cggggtttta cgagattgtg attaaggtc 49

30 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> cebador

<400> 9  
 aggctctaga ttcgaaagcg gcccg 25

40 <210> 10  
 <211> 1876  
 <212> ADN  
 <213> virus adeno-asociado 2

45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (11)..(1876)  
 <223> Rep 78

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (683)..(1876)  
 <223> secuencia que codifica Rep52

55 <400> 10

ES 2 575 990 T3

cgcagccgcc	atg	ccg	ggg	ttt	tac	gag	att	gtg	att	aag	gtc	ccc	agc			49
	Met	Pro	Gly	Phe	Tyr	Glu	Ile	Val	Ile	Lys	Val	Pro	Ser			
	1				5					10						
gac	ctt	gac	gag	cat	ctg	ccc	ggc	att	tct	gac	agc	ttt	gtg	aac	tgg	97
Asp	Leu	Asp	Glu	His	Leu	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Ser	Phe	Val	Asn	Trp	
	15					20					25					
gtg	gcc	gag	aag	gaa	tgg	gag	ttg	ccg	cca	gat	tct	gac	atg	gat	ctg	145
Val	Ala	Glu	Lys	Glu	Trp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Met	Asp	Leu	
30					35					40					45	
aat	ctg	att	gag	cag	gca	ccc	ctg	acc	gtg	gcc	gag	aag	ctg	cag	cgc	193
Asn	Leu	Ile	Glu	Gln	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Gln	Arg	
				50					55					60		
gac	ttt	ctg	acg	gaa	tgg	cgc	cgt	gtg	agt	aag	gcc	ccg	gag	gcc	ctt	241
Asp	Phe	Leu	Thr	Glu	Trp	Arg	Arg	Val	Ser	Lys	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	
			65					70					75			
ttc	ttt	gtg	caa	ttt	gag	aag	gga	gag	agc	tac	ttc	cac	atg	cac	gtg	289
Phe	Phe	Val	Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser	Tyr	Phe	His	Met	His	Val	
		80					85					90				
ctc	gtg	gaa	acc	acc	ggg	gtg	aaa	tcc	atg	gtt	ttg	gga	cgt	ttc	ctg	337
Leu	Val	Glu	Thr	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Met	Val	Leu	Gly	Arg	Phe	Leu	
	95				100						105					
agt	cag	att	cgc	gaa	aaa	ctg	att	cag	aga	att	tac	cgc	ggg	atc	gag	385
Ser	Gln	Ile	Arg	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Arg	Ile	Tyr	Arg	Gly	Ile	Glu	
110					115					120					125	
ccg	act	ttg	cca	aac	tgg	ttc	gcg	gtc	aca	aag	acc	aga	aat	ggc	gcc	433
Pro	Thr	Leu	Pro	Asn	Trp	Phe	Ala	Val	Thr	Lys	Thr	Arg	Asn	Gly	Ala	
				130					135					140		
gga	ggc	ggg	aac	aag	gtg	gtg	gat	gag	tgc	tac	atc	ccc	aat	tac	ttg	481
Gly	Gly	Gly	Asn	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Pro	Asn	Tyr	Leu	
			145					150					155			
ctc	ccc	aaa	acc	cag	cct	gag	ctc	cag	tgg	gcg	tgg	act	aat	atg	gaa	529
Leu	Pro	Lys	Thr	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	Trp	Ala	Trp	Thr	Asn	Met	Glu	
		160				165						170				
cag	tat	tta	agc	gcc	tgt	ttg	aat	ctc	acg	gag	cgt	aaa	cgg	ttg	gtg	577
Gln	Tyr	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Val	
	175					180					185					
gcg	cag	cat	ctg	acg	cac	gtg	tcg	cag	acg	cag	gag	cag	aac	aaa	gag	625
Ala	Gln	His	Leu	Thr	His	Val	Ser	Gln	Thr	Gln	Glu	Gln	Asn	Lys	Glu	
190					195					200					205	
aat	cag	aat	ccc	aat	tct	gat	gcg	ccg	gtg	atc	aga	tca	aaa	act	tca	673
Asn	Gln	Asn	Pro	Asn	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Lys	Thr	Ser	
				210					215					220		
gcc	agg	tac	atg	gag	ctg	gtc	ggg	tgg	ctc	gtg	gac	aag	ggg	att	acc	721
Ala	Arg	Tyr	Met	Glu	Leu	Val	Gly	Trp	Leu	Val	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr	
			225					230					235			
tcg	gag	aag	cag	tgg	atc	cag	gag	gac	cag	gcc	tca	tac	atc	tcc	ttc	769
Ser	Glu	Lys	Gln	Trp	Ile	Gln	Glu	Asp	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Phe	
		240					245					250				

ES 2 575 990 T3

aat Asn	gcg Ala 255	gcc Ala	tcc Ser	aac Asn	tcg Ser	cgg Arg 260	tcc Ser	caa Gln	atc Ile	aag Lys	gct Ala 265	gcc Ala	ttg Leu	gac Asp	aat Asn	817
gcg Ala 270	gga Gly	aag Lys	att Ile	atg Met	agc Ser 275	ctg Leu	act Thr	aaa Lys	acc Thr	gcc Ala 280	ccc Pro	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu	gtg Val 285	865
ggc Gly	cag Gln	cag Gln	ccc Pro	gtg Val 290	gag Glu	gac Asp	att Ile	tcc Ser	agc Ser 295	aat Asn	cgg Arg	att Ile	tat Tyr	aaa Lys 300	att Ile	913
ttg Leu	gaa Glu	cta Leu	aac Asn 305	ggg Gly	tac Tyr	gat Asp	ccc Pro	caa Gln 310	tat Tyr	gcg Ala	gct Ala	tcc Ser	gtc Val 315	ttt Phe	ctg Leu	961
gga Gly	tgg Trp	gcc Ala 320	acg Thr	aaa Lys	aag Lys	ttc Phe	ggc Gly 325	aag Lys	agg Arg	aac Asn	acc Thr	atc Ile 330	tgg Trp	ctg Leu	ttt Phe	1009
ggg Gly	cct Pro 335	gca Ala	act Thr	acc Thr	ggg Gly	aag Lys 340	acc Thr	aac Asn	atc Ile	gcg Ala	gag Glu 345	gcc Ala	ata Ile	gcc Ala	cac His	1057
act Thr 350	gtg Val	ccc Pro	ttc Phe	tac Tyr	ggg Gly 355	tgc Cys	gta Val	aac Asn	tgg Trp	acc Thr 360	aat Asn	gag Glu	aac Asn	ttt Phe	ccc Pro 365	1105
ttc Phe	aac Asn	gac Asp	tgt Cys	gtc Val 370	gac Asp	aag Lys	atg Met	gtg Val	atc Ile 375	tgg Trp	tgg Trp	gag Glu	gag Glu	ggg Gly 380	aag Lys	1153
atg Met	acc Thr	gcc Ala	aag Lys 385	gtc Val	gtg Val	gag Glu	tcg Ser	gcc Ala 390	aaa Lys	gcc Ala	att Ile	ctc Leu	gga Gly 395	gga Gly	agc Ser	1201
aag Lys	gtg Val	cgc Arg 400	gtg Val	gac Asp	cag Gln	aaa Lys	tgc Cys 405	aag Lys	tcc Ser	tcg Ser	gcc Ala	cag Gln 410	ata Ile	gac Asp	ccg Pro	1249
act Thr	ccc Pro 415	gtg Val	atc Ile	gtc Val	acc Thr	tcc Ser 420	aac Asn	acc Thr	aac Asn	atg Met	tgc Cys 425	gcc Ala	gtg Val	att Ile	gac Asp	1297
ggg Gly 430	aac Asn	tca Ser	acg Thr	acc Thr	ttc Phe 435	gaa Glu	cac His	cag Gln	cag Gln	ccg Pro 440	ttg Leu	caa Gln	gac Asp	cgg Arg	atg Met 445	1345
ttc Phe	aaa Lys	ttt Phe	gaa Glu	ctc Leu 450	acc Thr	cgc Arg	cgt Arg	ctg Leu	gat Asp 455	cat His	gac Asp	ttt Phe	ggg Gly	aag Lys 460	gtc Val	1393
acc Thr	aag Lys	cag Gln	gaa Glu 465	gtc Val	aaa Lys	gac Asp	ttt Phe 470	ttc Phe	cgg Arg	tgg Trp	gca Ala	aag Lys	gat Asp 475	cac His	gtg Val	1441
gtt Val	gag Glu	gtg Val 480	gag Glu	cat His	gaa Glu	ttc Phe	tac Tyr 485	gtc Val	aaa Lys	aag Lys	ggt Gly	gga Gly 490	gcc Ala	aag Lys	aaa Lys	1489
aga Arg	ccc Pro 495	gcc Ala	ccc Pro	agt Ser	gac Asp	gca Ala 500	gat Asp	ata Ile	agt Ser	gag Glu	ccc Pro 505	aaa Lys	cgg Arg	gtg Val	cgc Arg	1537
gag Glu 510	tca Ser	gtt Val	gcg Ala	cag Gln	cca Pro 515	tcg Ser	acg Thr	tca Ser	gac Asp	gcg Ala 520	gaa Glu	gct Ala	tcg Ser	atc Ile	aac Asn 525	1585

ES 2 575 990 T3

tac gca gac agg tac caa aac aaa tgt tct cgt cac gtg ggc atg aat 1633  
 Tyr Ala Asp Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn  
 530 535 540

ctg atg ctg ttt ccc tgc aga caa tgc gag aga atg aat cag aat tca 1681  
 Leu Met Leu Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser  
 545 550 555

aat atc tgc ttc act cac gga cag aaa gac tgt tta gag tgc ttt ccc 1729  
 Asn Ile Cys Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro  
 560 565 570

gtg tca gaa tct caa ccc gtt tct gtc gtc aaa aag gcg tat cag aaa 1777  
 Val Ser Glu Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys  
 575 580 585

ctg tgc tac att cat cat atc atg gga aag gtg cca gac gct tgc act 1825  
 Leu Cys Tyr Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr  
 590 595 600 605

gcc tgc gat ctg gtc aat gtg gat ttg gat gac tgc atc ttt gaa caa 1873  
 Ala Cys Asp Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln  
 610 615 620

taa 1876

<210> 11

<211> 621

<212> PRT

5 <213> virus adeno-asociado 2

<400> 11

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp  
 1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu  
 20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile  
 35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu  
 50 55 60

Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val  
 65 70 75 80

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu  
 85 90 95

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile  
 100 105 110

Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu  
 115 120 125

Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly  
 130 135 140

10

ES 2 575 990 T3

Asn 145 Lys Val Val Asp Glu 150 Cys Tyr Ile Pro Asn 155 Tyr Leu Leu Pro Lys 160  
 Thr Gln Pro Glu Leu 165 Gln Trp Ala Trp Thr 170 Asn Met Glu Gln Tyr 175 Leu  
 Ser Ala Cys Leu 180 Asn Leu Thr Glu Arg 185 Lys Arg Leu Val Ala 190 Gln His  
 Leu Thr His 195 Val Ser Gln Thr Gln 200 Glu Gln Asn Lys Glu 205 Asn Gln Asn  
 Pro Asn 210 Ser Asp Ala Pro Val 215 Ile Arg Ser Lys Thr 220 Ser Ala Arg Tyr  
 Met 225 Glu Leu Val Gly Trp 230 Leu Val Asp Lys Gly 235 Ile Thr Ser Glu Lys 240  
 Gln Trp Ile Gln Glu 245 Asp Gln Ala Ser Tyr 250 Ile Ser Phe Asn Ala 255 Ala  
 Ser Asn Ser Arg 260 Ser Gln Ile Lys Ala 265 Ala Leu Asp Asn Ala 270 Gly Lys  
 Ile Met Ser 275 Leu Thr Lys Thr Ala 280 Pro Asp Tyr Leu Val 285 Gly Gln Gln  
 Pro Val 290 Glu Asp Ile Ser Ser 295 Asn Arg Ile Tyr Lys 300 Ile Leu Glu Leu  
 Asn 305 Gly Tyr Asp Pro Gln 310 Tyr Ala Ala Ser Val 315 Phe Leu Gly Trp Ala 320  
 Thr Lys Lys Phe Gly 325 Lys Arg Asn Thr Ile 330 Trp Leu Phe Gly Pro 335 Ala  
 Thr Thr Gly Lys 340 Thr Asn Ile Ala Glu 345 Ala Ile Ala His Thr 350 Val Pro  
 Phe Tyr Gly 355 Cys Val Asn Trp Thr 360 Asn Glu Asn Phe Pro 365 Phe Asn Asp  
 Cys Val 370 Asp Lys Met Val Ile 375 Trp Trp Glu Glu Gly 380 Lys Met Thr Ala  
 Lys 385 Val Val Glu Ser Ala 390 Lys Ala Ile Leu Gly 395 Gly Ser Lys Val Arg 400  
 Val Asp Gln Lys Cys 405 Lys Ser Ser Ala Gln 410 Ile Asp Pro Thr Pro 415 Val

ES 2 575 990 T3

Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser  
 420 425 430

Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe  
 435 440 445

Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln  
 450 455 460

Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val  
 465 470 475 480

Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala  
 485 490 495

Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val  
 500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp  
 515 520 525

Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu  
 530 535 540

Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys  
 545 550 555 560

Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu  
 565 570 575

Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr  
 580 585 590

Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp  
 595 600 605

Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln  
 610 615 620

**REIVINDICACIONES**

1. Secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto único que codifica proteínas Rep78 y Rep52 parvovirales, donde el codón iniciador para la traducción de la proteína Rep78 parvoviral es un codón iniciador subóptimo en comparación con el codón ATG normal, donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 hacia arriba del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rep78 parvoviral.
2. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, donde el codón iniciador subóptimo es tal que al menos parte de los ribosomas no inician la traducción en el codón subóptimo de la proteína Rep78 sino en un codón iniciador más abajo.
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 o 2, donde el codón iniciador es seleccionado de ACG, TTG, CTG, y GTG.
4. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde las proteínas Rep parvovirales son proteínas Rep de virus adeno-asociado (AAV).
5. Construcción de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, donde la secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto, preferiblemente a un promotor de poliedro, y donde la construcción de ácidos nucleicos es preferiblemente un vector compatible con la célula de insecto, más preferiblemente un vector baculoviral.
6. Célula de insecto que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto único que codifica proteínas Rep78 y Rep52 parvovirales, donde el codón iniciador para la traducción de la proteína Rep78 parvoviral es un codón iniciador subóptimo en comparación con el codón ATG normal.
7. Célula de insecto según la reivindicación 6, donde la secuencia de nucleótidos codifica la proteína Rep78 de longitud total.
8. Célula de insecto según la reivindicación 6 o 7, donde el codón iniciador subóptimo es tal que al menos parte de los ribosomas no inician la traducción en el codón subóptimo de la proteína Rep78 sino en un codón iniciador más abajo.
9. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 8, donde el codón iniciador es seleccionado de ACG, TTG, CTG, y GTG.
10. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 9, donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 hacia arriba del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rep78 AAV.
11. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 10, donde las proteínas Rep parvovirales son proteínas Rep de virus adeno-asociado (AAV).
12. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 11, donde la secuencia de nucleótidos tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 es parte de una construcción de ácido nucleico y está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.
13. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 12, donde la célula de insecto comprende además:
  - a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos (ITR) de repetición invertida de terminal parvoviral; y,
  - b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína cápsida parvoviral operativamente enlazadas a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.
14. Célula de insecto según la reivindicación 13, donde la célula de insecto comprende:
  - a) una primera construcción de nucleótidos, donde la secuencia de nucleótidos es parte de una construcción de ácidos nucleicos y está operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto;
  - b) una segunda construcción de ácidos nucleicos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos (ITR) de repetición de terminal invertida parvoviral; y
  - c) una tercera construcción de ácido nucleótido que comprende secuencias codificantes de proteína cápsida parvoviral operativamente enlazada a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto,

donde la primera, segunda y tercera construcciones de ácidos nucleicos preferiblemente son vectores compatibles con la célula de insecto, preferiblemente vectores baculovirales.

5 15. Célula de insecto según la reivindicación 13 o 14, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés y por la cual al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un vector parvoviral producido en la célula de insecto, y preferiblemente donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales y donde al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está localizada entre las dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales.

10 16. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 15, donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende un marco de lectura abierto que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas cápsidas VP1, VP2, y VP3 parvovirales, donde el codón iniciador para la traducción de la proteína cápsida de VP1 parvoviral es seleccionado de ACG, TTG, CTG, y GTG y donde la tercera secuencia de nucleótidos opcionalmente comprende una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEC. ID N°: 7 hacia arriba del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida de VP1 parvoviral.

15 17. Célula de insecto según la reivindicación 16, donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende además al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cápsida de VP1 parvoviral seleccionada de entre un C en la posición de nucleótido 12, un A en la posición de nucleótido 21, y un C en la posición de nucleótido 24.

20 18. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 17, donde al menos una de la primera secuencia de nucleótidos, segunda secuencia de nucleótidos, y tercera secuencia de nucleótidos está de forma estable integrada en el genoma de la célula de insecto.

25 19. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 18, donde el parvovirus es AAV.

30 20. Método para la producción de un virión parvoviral recombinante, preferiblemente un virión AAV, en una célula de insecto, donde el virión comprende una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de repetición (ITR) de terminal invertido parvoviral, donde el método incluye las etapas de:

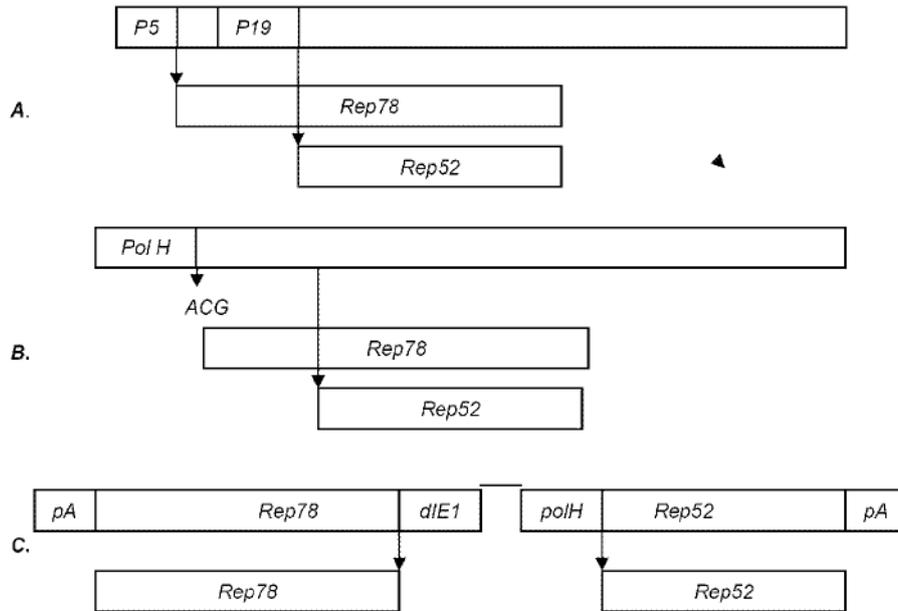
- 35 a) cultivo de una célula de insecto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 19 bajo condiciones tales que el virión parvoviral recombinante es producido; y,  
 b) recuperación del virión parvoviral recombinante;  
 y que opcionalmente comprende además la etapa de:  
 c) purificación de afinidad del virión usando un anticuerpo anti-parvoviral, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado, donde el anticuerpo anti-parvoviral es preferiblemente un anticuerpo de camélido monocatenario o un fragmento del mismo.

40 21. Método según la reivindicación 20, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés y por el cual al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un vector parvoviral producido en la célula de insecto, y preferiblemente donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvoviral y donde al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está localizada entre las dos secuencias de nucleótidos ITR parvoviral.

45 22. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 4, una construcción de ácidos nucleicos según 5, o una célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones de la 6 a la 19, donde uno o varios posibles sitios de iniciación falsos de traducción en las secuencias codificantes de proteína Rep, diferentes a los sitios de iniciación de traducción Rep78 y Rep52, son eliminados.

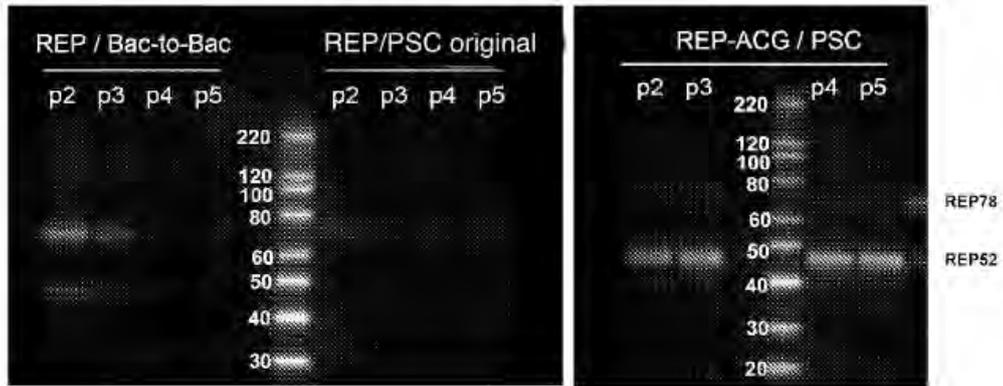
50 23. Método según la reivindicación 20 o 21, donde uno o varios posibles sitios de iniciación falsos de traducción en las secuencias codificantes de proteína Rep, diferentes a los sitios de iniciación de traducción Rep78 y Rep52, son eliminados.

*Fig 1*

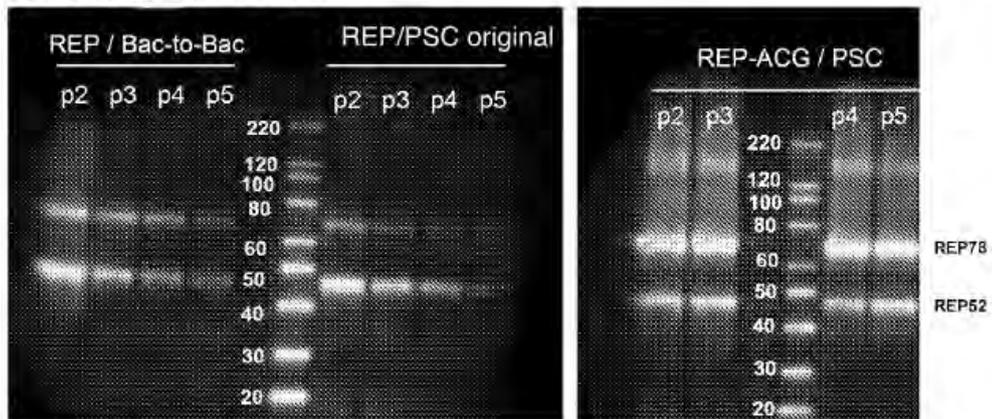


*Fig 2*

16 horas tras la infección



40 horas tras la infección



64 horas tras la infección

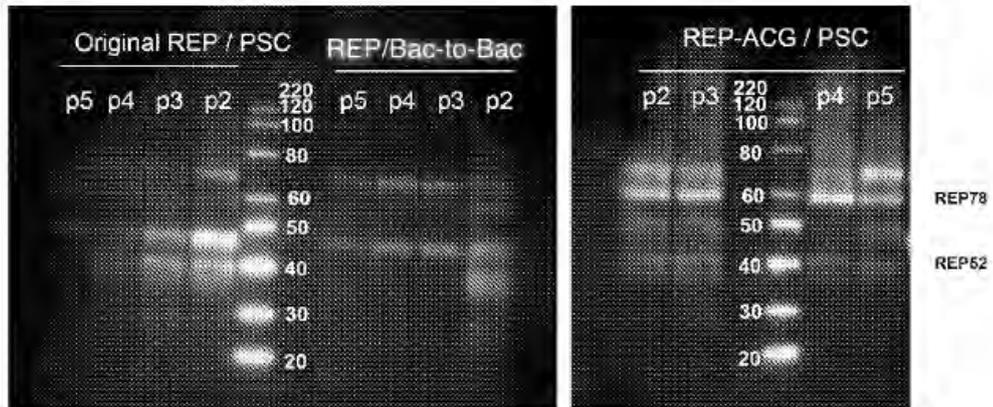


Fig 3

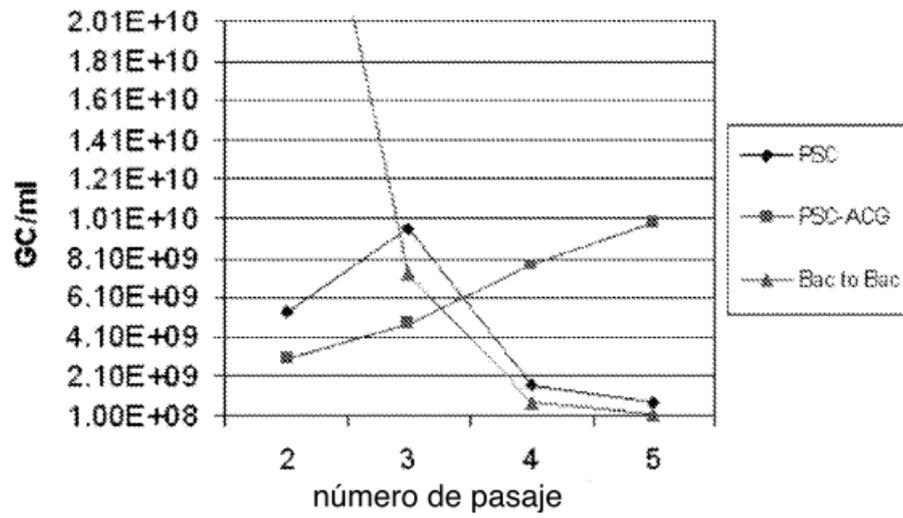
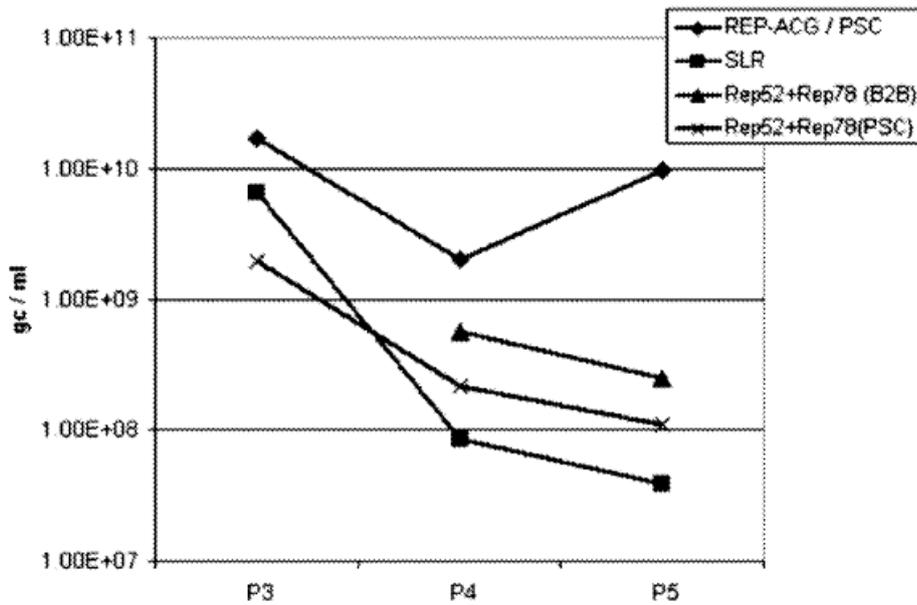
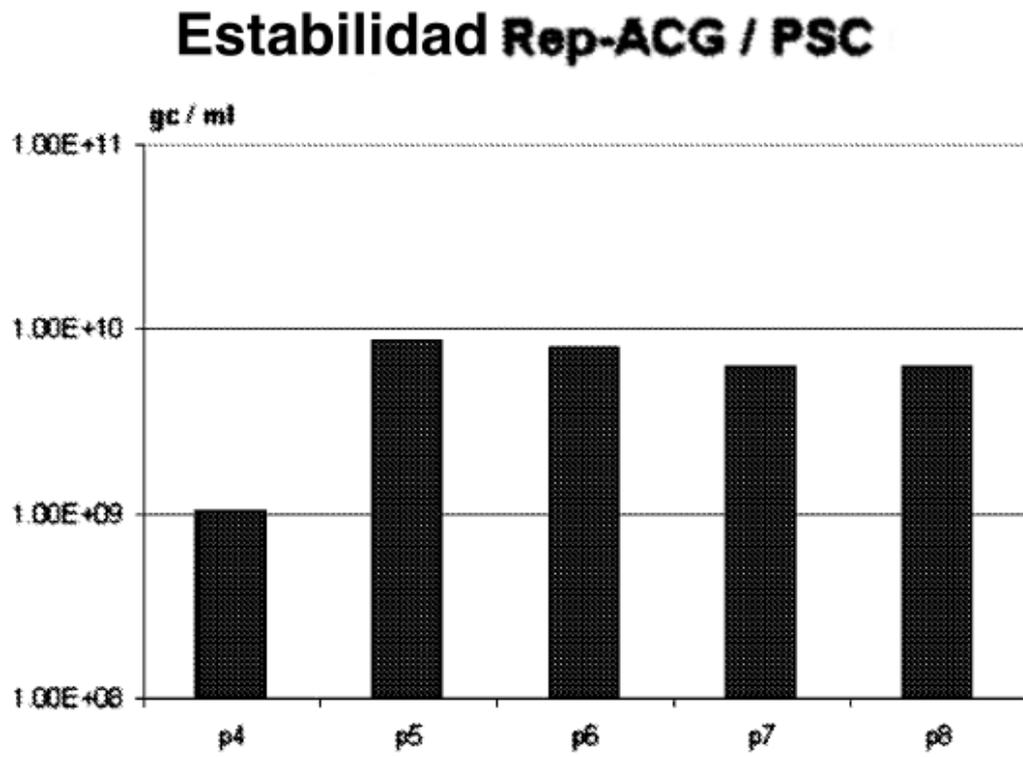


Fig 4



*Fig 5*



*Fig 6*

