

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 259**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2012 PCT/US2012/060441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13085624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2012 E 12856150 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2788489**

54 Título: **Vectores que albergan genes tóxicos, métodos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568595 P

31.03.2012 US 201261618689 P

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**VIROVEK, INC. (100.0%)
26291 Production Avenue, Suite 10
Hayward, CA 94545, US**

72 Inventor/es:

CHEN, HAIFENG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 259 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores que albergan genes tóxicos, métodos y usos de los mismos

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 61/568.595 presentada el 08 de diciembre de 2011 y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 61/618.689 presentada el 31 de marzo de 20.12.

El Listado de Secuencias, que es una parte de la presente descripción, incluye una forma legible por ordenador y un listado de secuencias escrito que comprende secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. La información del listado de secuencias registrada en forma legible por ordenador es idéntica al listado de secuencias escrito.

10 **Introducción**

La presente descripción pertenece al campo de la virología, y, más particularmente, al campo de los vectores de ácidos nucleicos que pueden crecer en células de insecto y usarse para el tratamiento de enfermedades de mamíferos tales como el cáncer.

15 Los genes tóxicos y las proteínas codificadas por dichos genes se han utilizado o se han propuesto para su uso en terapias de enfermedades que implican la muerte celular, tales como, por ejemplo, terapias contra el cáncer que implican la expresión de genes que causan la muerte celular. La terapia con genes suicidas se ha convertido en una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Rodríguez, R. y Simons, J. W. *Urology* 54: 401-406, 1999). La terapia con genes suicidas se basa en la administración de genes cuyos productos son tóxicos, o que producen un producto tóxico en conjunción con la administración de fármacos (Denning, et al. *Human Gene Therapy* 8: 1825-1835, 1997). La terapia con genes suicidas ha sido ampliamente investigada para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para controlar la enfermedad del injerto contra huésped y también para el tratamiento del cáncer. La generación de vectores virales que contienen genes de toxina tales como el fragmento de toxina A de difteria (DT-A), la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o la barnasa ha sido difícil de cumplir debido a la extrema toxicidad de estas toxinas.

25 Ciertas proteínas codificadas por genes tóxicos pueden matar a una célula huésped a niveles muy bajos de expresión. Por ejemplo, una sola molécula de toxina diftérica (DT-A) puede matar una célula (Yamaizumi, M. et al. (1978) *Cell* 15: 245 - 250). Se cree que el DT envenena la síntesis de proteínas catalizando la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF2). El DT mata principalmente por una ruta mediada por la apoptosis, y se cree que mata a las células de manera independiente al ciclo celular. Esto hace que el DT sea un tratamiento terapéutico atractivo para el cáncer, ya que algunas neoplasias malignas tales como el cáncer de próstata tienden a tener un índice mitótico muy bajo. De forma similar, la ribonucleasa barnasa se ha sugerido como un potente agente tóxico para reconocer células cancerosas (Edelweiss, E., et al., *PLoS ONE* 3: e2434, 2008).

30 Sin embargo, la producción de vectores virales, tales como el adenovirus recombinante, el baculovirus recombinante y el virus adeno-asociado, que podrían utilizarse para la administración de genes tóxicos a una célula diana, tal como una célula cancerosa, puede ser obstaculizada por la toxicidad de un gen tóxico para la célula huésped. Un vector viral que alberga un gen tóxico, por tanto, no sólo debe crecer en condiciones que no sean letales para la célula huésped que se utiliza para el crecimiento del vector, sino que el vector también debe ser capaz de producir toxicidad sobre una célula diana, tal como una célula cancerosa.

40 Los intentos previos de limitar la toxicidad de un gen tóxico tal como DT-A mediante el uso de un promotor específico de tejido y/o inducible han conducido a resultados variables. Por ejemplo, Maxwell et al. (*Cancer Res.* 46: 4660-4664, 1986) utilizaron una forma truncada del promotor de metalotioneína para demostrar que la expresión basal de este promotor, incluso en ausencia de metales pesados, resultaba en la inhibición sustancial de la síntesis de proteínas. Esta inhibición podría aumentarse mediante la adición de un elemento potenciador de la inmunoglobulina, pero sólo mínimamente por el cadmio. Los autores no fueron capaces de demostrar una verdadera citotoxicidad específica, sino más bien sólo una susceptibilidad celular preferencial a la muerte celular mediada por DT-A, presumiblemente como resultado de la expresión basal de este gen altamente tóxico. Este grupo también introdujo un mutante atenuado de DT-A (Maxwell, F. et al. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7: 1576-1579) (Robinson, D. F. y Maxwell, I. H. (1995) *Hum. Gene Ther.* 6:137-143. Los esfuerzos subsiguientes de este grupo y otros se concentraron en la introducción de un mutante atenuado de DT-A (Maxwell, F. et al. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7: 1576 - 1579) o en la estrecha regulación de la expresión génica con elementos de control procarionóticos (Robinson, D. F. y Maxwell, I. H. (1995) *Hum. Gene Ther.* 6: 137 - 143; Paulus, W. y col. (1997) *J. Neurosurg.* 87: 89 - 95). En ambos casos, aunque se pudo demostrar la eliminación preferente de células, no se logró la abolición completa de la muerte celular no específica. Keyvani et al. (*Life Sci.* 64: 1719 - 1724, 1999) utilizaron un sistema basado en el represor tet para expresar un mutante DT - A atenuado, pero estos trabajadores concluyeron que (1), la expresión pero no la toxicidad del mutante DT-A puede ser suficientemente controlada por un promotor sensible a tetraciclina.

55 La Patente de EE.UU. Nº 7.582.290 de Rodríguez, R., et al. describe adenovirus (Ad) de replicación deficiente que expresan la subunidad A de la toxina de la difteria (DT-A) conducida por promotores específicos de la próstata para

uso en terapia con genes suicidas para el cáncer de próstata. Esta patente describe una mutación de la glicina a la arginina en la posición 705 de la proteína EF-2 que da resistencia a la inhibición de la síntesis de proteínas por DT. Los inventores en esta patente afirman que un problema importante en la aplicación de adenovirus defectuosos en la replicación en la terapia génica es la presencia del adenovirus competente para la replicación (RCA), que se genera por recombinación entre secuencias en el vector Ad y secuencias Ad homólogas en las células auxiliares. Estos inventores también describen una línea celular auxiliar DT-resistente, DPL, para empaquetar adenovirus que expresan DT para la terapia con genes suicidas, en la que las células no forman RCA. Estos inventores describen además que amplificaron una región de 500 pb a partir del gen BF-2 que abarca el codón 705, de células TSU (una línea celular de cáncer de próstata). Utilizando mutagénesis dirigida, estos inventores cambiaron el codón 705 de "GGA" a "AGA" para codificar arginina en lugar de glicina. Utilizando recombinación homóloga reemplazaron a la glicina con arginina en la posición 705 de la proteína EF-2 en células PER.C6 (derivadas de retinoblastos embrionarios humanos diploides ("HER") y descritas en las Patentes de EE.UU. 5.994.128, 6.265.212, 6.033.908 y 6.306.652), y generaron una línea celular auxiliar resistente a DT para empaquetar vectores adenovirales. Estas células contienen las secuencias codificantes de Ad-serotipo 5 (Ad5) E1-A y E1-B (nucleótidos AdS 459-3510) bajo el control del promotor de fosfoglicerato-quinasa humana (PGK). De acuerdo con estos inventores, estas células, usadas junto con el adenovirus E1-deletado no solapado, eliminan la presencia de RCA en preparaciones víricas.

Wang et al. (Wang, C - Y, et al., Cancer Research 66: 5798 – 5806, 2006) describieron un baculovirus recombinante que acomodaba la secuencia reguladora transcripcional de proteínas de ácido fibrilar glial (GFAP) para dirigir la expresión del gen de DT-A en células del glioma. Debido a que el promotor GFAP es inactivo en células de insecto, fueron capaces de generar baculovirus recombinante que porta el gen tóxico de DT-A. Sin embargo, un promotor específico de tipo celular, tal como el promotor GFA, muestra una actividad transcripcional relativamente débil en comparación con las secuencias de control positivas derivadas de virus, p. ej. el potenciador/promotor del gen inmediato-temprano del citomegalovirus humano (CMV) y, por lo tanto, limita sus aplicaciones.

Kohlschütter, et al. Toxins 2: 2754 - 2768, 2010 describieron vectores AAV portadores del gen de DT-A, en los que se usó el sistema represor Tet^R para disminuir la expresión de DT-A. A pesar de que los autores produjeron algunos vectores AAV portadores del gen DT-A en células HE 293T, sus rendimientos de AAV fueron generalmente de 2 a 3 logs menores que los vectores AAV que no portaban el gen DT-A, tales como vectores portadores del gen PUMA AAVTetO2-PUMA). Los autores atribuyeron el título más bajo a la expresión residual de la proteína DTA.

La patente de EE.UU. 6.723.551 de Kotin et al. describe métodos de producción de virus adenoasociados (AAV) en células de insecto. Estos inventores afirman que los intrones comprendidos por los genes AAV no se empalman correctamente en las células de insectos. Estos inventores produjeron AAV en células de insecto usando genes AAV diseñados para ser desprovistos de intrones. Sin embargo, esta patente ni enseña ni sugiere vectores crecientes que albergen genes tóxicos en células de insecto.

En la actualidad existe una necesidad de composiciones y métodos adicionales para producir vectores de terapia con genes suicida para uso terapéutico tales como el uso en la eliminación de células cancerosas.

Sumario

A la vista de la necesidad de cultivar vectores virales que albergen genes tóxicos en células de insecto, el presente inventor ha desarrollado vectores virales baculovíricos y adeno-asociados modificados que comprenden genes tóxicos, células de insecto que comprenden tales vectores, métodos de fabricación de tales vectores y células y métodos de tratamiento que utilizan dichos vectores.

Un ácido nucleico de las presentes enseñanzas puede ser un ácido nucleico para el cultivo de un gen tóxico en una célula de insecto. En algunas configuraciones, un ácido nucleico puede comprender, consistir esencialmente, o constar de una secuencia que codifica un polipéptido tóxico y un intrón que Interrumpe la secuencia, por lo que un ARN que comprende el intrón puede ser empalmado por células de mamífero, pero no por células de insecto, para formar en células de mamífero, pero no en células de insecto, un ARNm traducible que, tras la traducción, proporcione niveles tóxicos celulares de un polipéptido tóxico. En algunas configuraciones, un ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido tóxico tal como, sin limitación, toxina diftérica (DT-A), barnasa, ricina, abrina, exotoxina de Pseudomonas o un polipéptido pro-apoptótico. Las secuencias que codifican tales polipéptidos tóxicos (y péptidos) son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ellerby, HM et al., Nature Medicine 5: 1032 - 1038, 1999) y están disponibles a partir de recursos públicamente accesibles tales como, el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica. En algunas configuraciones, el ácido nucleico puede codificar un polipéptido tóxico tal como una toxina diftérica, por ejemplo DT-A. En algunas configuraciones, el ácido nucleico puede codificar un polipéptido tóxico tal como barnasa.

En varias configuraciones, un intrón de las presentes enseñanzas puede ser cualquier intrón que no se empalme apropiadamente en células de insecto, pero que se empalme adecuadamente por células de mamíferos, tales como, por ejemplo y sin limitación, un intrón de un gen de hormona de crecimiento humano o un intrón de un gen del antígeno T grande de SV40.

En diversas configuraciones, un ácido nucleico de las presentes enseñanzas puede comprender además una

secuencia de control de la expresión unida operativamente a la secuencia que codifica un polipéptido tóxico. Una secuencia de control de la expresión puede ser, por ejemplo, un promotor, un IRES, un potenciador y/o una combinación de los mismos.

5 En la ilustración no limitativa, la FIG. 1 presenta mapas genéticos y transcripcionales de un gen tóxico tal como un gen DT-A que comprende un intrón y está operativamente unido a un promotor tal como un promotor CMV. Tras la introducción de un gen DT-A que comprende un intrón de las presentes enseñanzas en una célula de mamífero, se transcribe el gen y se forma un ARNm de DT-A maduro en la célula de mamífero a través de un empalme de intrones. El ARN maduro se traduce en proteína DT-A funcional para matar la célula. Los números por encima del mapa genético basado en la secuencia codificante de DT-A (acceso Genbank no. X00703) indican las posiciones de
10 nucleótidos donde se inserta el intrón. CMVpr = Promotor de citomegalovirus; DT-A - secuencia de ácido nucleico de la toxina A de difteria; pA - señal de poliadenilación.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un vector viral que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente. En varias configuraciones, un vector viral puede ser, por ejemplo, un baculovirus, un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV) o una combinación de los mismos, tal como, por ejemplo,
15 un baculovirus que comprende secuencias de AAV, tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20090203071, pero modificada para incluir también secuencias que codifican un gen tóxico en el que la secuencia codificadora se interrumpe con un intrón.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen una célula de insecto in vitro que comprende un ácido nucleico descrito anteriormente, o un genoma viral que comprende el ácido nucleico como se describe
20 anteriormente.

En diversas configuraciones, una célula de insecto puede ser, sin limitación, una célula de una línea de células de insecto establecida conocida por los expertos en la técnica, tal como, sin limitación, una célula de *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4, una célula de *Spodoptera frugiperda* Sf9 o una célula de *Spodoptera frugiperda* Sf21.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un cultivo celular que comprende una pluralidad de células descritas anteriormente; y un medio de cultivo. En varias configuraciones, tales líneas celulares pueden acumular un virus tal como, por ejemplo, AAV, en el que el medio de cultivo celular no concentrado puede comprender el virus con un título mayor que 10^9 genomas de AAV/ml, mayor que 10^{10} genomas de AAV/ml, mayor que 10^{11} genomas de AAV/ml, o mayor que 10^{12} genomas de AAV/ml. Por ejemplo, en varias configuraciones, 1 litro de medio celular cultivado no concentrado puede comprender al menos 10^{13} , al menos 10^{14} , o al menos 10^{15}
25 partículas víricas de AAV dentro de 3 días después de la infección de un cultivo de células de insecto con un baculovirus de las presentes enseñanzas.

En diversas configuraciones, una línea celular o cultivo celular de las presentes enseñanzas puede acumular un baculovirus, en el que el medio de cultivo celular no concentrado puede comprender el virus con un título mayor que 10^9 pfu/l, mayor que 10^{10} pfu/l, mayor que 10^{11} pfu/l, o mayor que 10^{12} pfu/l dentro de los 4 días después de la transfección.
35

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos de cultivo de un vector que comprende un gen tóxico in vitro. En diversas configuraciones, estos métodos incluyen: proporcionar un cultivo celular que comprende células de insecto; Infectar o traducir las células con un ácido nucleico o un virus de las presentes enseñanzas; e incubar las células en condiciones adecuadas para la producción del virus.

40 En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar un cáncer. En diversas configuraciones, estos métodos incluyen administrar un ácido nucleico o un virus de las presentes enseñanzas a un sujeto que necesita terapia. En algunas configuraciones, el virus puede ser un baculovirus o un virus adenoasociado. Un cáncer sujeto a tratamiento usando un ácido nucleico o un virus de las presentes enseñanzas puede ser cualquier cáncer, tal como, sin limitación, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, un tumor cerebral, un cáncer cervical o un carcinoma nasofaríngeo. En varias realizaciones de las presentes enseñanzas, un virus de las presentes enseñanzas, tal como un AAV de las presentes enseñanzas o un baculovirus de las presentes enseñanzas puede ser un virus que puede infectar a una célula de mamífero pero que no puede replicarse dentro de la célula de mamífero.
45

En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen el uso de un ácido nucleico o virus descrito anteriormente para el tratamiento de una enfermedad tal como, por ejemplo, el cáncer.
50

En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un ácido nucleico o virus descrito en el presente documento para uso en el tratamiento de un cáncer. En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un ácido nucleico o virus descrito en este documento para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer.

55 En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un baculovirus recombinante o ácido nucleico que comprende un gen tóxico (tal como, sin limitación, un gen DT-A o un gen barnasa) que comprende además un intrón, de modo que una célula de mamífero, pero no una célula de insecto, puede expresar un ARNm maduro que

pueda ser traducido por la célula huésped para producir un polipéptido que es letal para la célula huésped. En algunas configuraciones, un intrón que interrumpe la secuencia de codificación de un gen tóxico puede ser empalmado a partir de una transcripción del gen tóxico por una célula de mamífero, pero no por una célula de insecto, por ejemplo, como se expone en la FIG. 1. Tras la introducción de un gen tóxico que comprende un intrón en una célula de mamífero (tal como una célula humana in vitro o in vivo), la célula puede producir el ARNm maduro del gen tóxico. El ARNm maduro puede ser traducido por la célula de mamífero en una proteína DT-A funcional (u otra proteína tóxica) para matar a la célula.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen métodos para producir baculovirus recombinante que llevan un gen tóxico que comprende un intrón en células de insecto. En estas realizaciones, el baculovirus recombinante se puede generar según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin limitación, tales métodos pueden incluir, por ejemplo, la transfección de ADN de Bacmid en células de insecto in vitro, tales como células Sf9, con un vector tal como un Bacmid modificado para comprender un gen tóxico en el que se inserta un intrón.

Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen vectores AAV que portan un gen tóxico tal como un gen DT-A que comprende un intrón o un gen de barnasa que comprende un intrón. Los vectores AAV que comprenden un gen tóxico con un intrón pueden producirse en células de insecto. Tras la introducción en una célula huésped de mamífero, un gen tóxico comprendido por un vector AAV de las presentes enseñanzas puede ser transcrito y empalmado en la célula de mamífero para formar un ARNm de gen tóxico maduro (tal como un ARNm de DT-A o ARNm de barnasa). Un ARNm de gen tóxico maduro puede ser traducido por la célula huésped de mamífero para producir una proteína tóxica (tal como DT-A o barnasa), deshabilitando o destruyendo así la célula huésped de mamífero.

Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen métodos para producir vectores AAV que llevan un gen tóxico tal como, por ejemplo, un gen DT-A o un gen de barnasa en células de insecto. En estos métodos, un primer vector que comprende secuencias de baculovirus y AAV, tales como, por ejemplo, Bac-Rep-Cap (o Bac-inCap-inRep), y un segundo vector que comprende baculovirus y secuencias ITR así como un gen tóxico (tal como, por ejemplo, DT-A o barnasa) interrumpido por un intrón, puede ponerse en contacto con una célula de insecto huésped para co-infectar la célula huésped. Una célula infectada puede producir AAV que comprende el gen tóxico interrumpido por un intrón. Tales células infectadas cultivadas in vitro pueden dar títulos de AAV recombinante que comprenden un gen tóxico, de al menos 10^9 genomas virales/ml, al menos 10^{10} genomas virales/ml, al menos 10^{11} genomas virales/ml o al menos 10^{12} genomas virales/ml en un medio de cultivo no concentrado dentro de los 3 días después de la infección de un cultivo de células de insecto tales como células Sf9.

Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen métodos adicionales para producir vectores de AAV que portan un gen tóxico en células de insecto. En estos métodos, se puede proporcionar una célula de insecto que comprende un transgén establemente integrado tal como un transgén que comprende ITR de AAV que flanquea un gen tóxico (tal como DT-A o barnasa) que comprende un intrón. Véase, por ejemplo, la FIG. 5. Una célula de estas realizaciones puede infectarse con Bac-Rep-Cap. Después de la infección con Bac-Rep-Cap, la célula puede producir vectores de AAV que comprenden un gen tóxico (tal como DT-A) que comprende un intrón. En varias configuraciones, una población de células infectadas cultivadas in vitro puede dar títulos de AAV recombinante, de al menos 10^9 genomas virales/ml, al menos 10^{10} genomas virales/ml, al menos 10^{11} genomas virales/ml, o al menos 10^{12} genomas virales/ml en medio de cultivo no concentrado. En algunas configuraciones, se puede obtener tan alto en aproximadamente 3 días después de la infección.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen la producción de vectores de AAV que portan genes tóxicos usando células de insecto (tales como, por ejemplo, células Sf9) que albergan genomas de AAV integrados de forma estable que llevan inDTA o inBarnase. En diversas configuraciones, dichas células pueden infectarse con baculovirus recombinante que lleva genes Rep y Cap durante 3 días. Los gránulos de células se pueden cosechar y procesar para purificar los vectores de AAV.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido tóxico y un intrón que interrumpe la secuencia, por lo que el intrón se empalma en células de mamífero pero no en células de insecto para formar un ARNm que se traduce para formar niveles tóxicos de células del polipéptido tóxico en células de mamíferos pero no en cepas de insectos. En algunas configuraciones, el polipéptido de toxina codificado por un gen de toxina puede ser, sin limitación, la toxina de difteria (DT-A), barnasa, ricina, abrina o exotoxina de *Pseudomonas*. En algunas configuraciones preferidas, la toxina puede ser toxina diftérica (DT-A) o barnasa, codificadas por un gen de toxina diftérica (DT-A) o un gen de barnasa, respectivamente, pero interrumpidas por un intrón tal como, sin limitación, un intrón de la hormona del crecimiento humano o un intrón de T-antígeno grande de SV40. En diversas configuraciones, un ácido nucleico de las presentes enseñanzas puede comprender además al menos un elemento de expresión unido operativamente a la secuencia. Tales elementos de expresión pueden incluir uno o más de un promotor, un IRES, un potenciador y una combinación de los mismos. En algunas configuraciones, los elementos de expresión comprendidos por un ácido nucleico de las presentes enseñanzas pueden incluir uno o más de un promotor de CMV, un promotor de AFP, un potenciador de AFP, un promotor de SURV, un promotor de CXCR4, un promotor de TERT, un promotor de COX2, y un promotor de CCKAR. En algunas configuraciones, los elementos de expresión comprendidos por un ácido nucleico de las

- presentes enseñanzas pueden incluir uno o más de un promotor de hAFP, un potenciador de hAFP, un promotor de hSURV, un promotor de hCXCR4, un promotor de hTERT, un promotor de hCOX2 y un promotor de hCCKAR. En algunas configuraciones, un elemento de control de la expresión puede ser un promotor que puede dirigir la expresión en células tumorales, tales como un promotor hSURV o un promotor CXCR4. En algunas configuraciones preferidas, un elemento de expresión puede ser un promotor hSURV o CXCR4.
- En algunas realizaciones, un intrón que interrumpe la secuencia de un gen tóxico puede ser cualquier intrón que se empalme por células de mamífero pero no por células de insecto. En varias configuraciones, el intrón puede ser un intrón artificial, un intrón de hormona de crecimiento humano, o un intrón de T-antígeno grande de SV40.
- En diversas realizaciones, un vector de ácido nucleico o vírico de las presentes enseñanzas puede comprender al menos un ITR.
- En algunas realizaciones, un ácido nucleico o vector vírico de las presentes enseñanzas puede comprender, en orden de 5' a 3', un primer ITR, un promotor, una primera porción de un gen tóxico, un intrón, una segunda porción del gen tóxico, una señal de poliadenilación y una segunda ITR. En varias configuraciones, el primer ITR puede ser un ITR de AAV y el segundo ITR puede ser un ITR de AAV.
- Algunas realizaciones de la presente enseñanza incluyen vectores víricos que comprenden los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. En algunas configuraciones, un vector viral puede ser, sin limitación, un baculovirus, un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV) o una combinación de los mismos, y en particular un vector puede ser un baculovirus, un virus adenoasociado (AAV), o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitativos de AAV que comprenden un ácido nucleico de las presentes enseñanzas incluyen AAV2 y AAV, preferiblemente AAV2.
- Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen células de insectos in vitro que comprenden los ácidos nucleicos descritos en este documento. Varias realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen células de insectos individuales in vitro, líneas de células de insectos, cultivos de células de insectos y poblaciones de células de insectos in vitro. En diversas configuraciones, una célula de insecto de las presentes enseñanzas puede incluir, sin limitación, una célula de *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4, una célula de *Spodoptera frugiperda* Sf9 o una célula de *Spodoptera frugiperda* Sf21; una población de células de insecto o un cultivo celular puede incluir, sin limitación, *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4, células de *Spodoptera frugiperda* Sf9, células de *Spodoptera frugiperda* Sf21, y cualquier combinación de las mismas. En diversas configuraciones, una célula de insecto puede comprender un ácido nucleico que está comprendido por un genoma viral. En algunas realizaciones, una célula de insecto de las presentes enseñanzas puede comprender un virus que comprende un ácido nucleico de las presentes enseñanzas. En varias configuraciones, un virus de estas realizaciones puede ser un AAV, un baculovirus o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una célula de insecto de las presentes enseñanzas puede transformarse de forma estable con un ácido nucleico de las presentes enseñanzas.
- Las realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen cultivos celulares, tales como cultivos de células de insecto. En diversas configuraciones, un cultivo celular puede incluir células que comprenden un ácido nucleico de las presentes enseñanzas, y un medio de cultivo celular. En varias configuraciones, un cultivo celular puede comprender mayor que 10^9 genomas virales/ml sin concentración del medio de cultivo celular, mayor que 10^{10} genomas virales/ml sin concentración del medio de cultivo celular, mayor que 10^{11} genomas virales/ml sin concentración del medio de cultivo celular, mayor que 10^{12} genomas virales/ml sin concentración del medio de cultivo celular. En varias realizaciones, una línea celular, un cultivo celular o población de células de las presentes enseñanzas puede comprender un baculovirus que comprende un ácido nucleico de las presentes enseñanzas. En diversas configuraciones, una línea celular, un cultivo celular o una población de células puede comprender baculovirus a más de 10^6 PFU/ml en un medio de cultivo no concentrado, mayor que 10^7 PFU/ml en un medio de cultivo no concentrado, mayor que 10^8 PFU/ml en un medio de cultivo no concentrado, o mayor que 10^9 PFU/ml en un medio de cultivo no concentrado.
- Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen métodos de cultivo de un vector que comprende un gen tóxico in vitro. En diversas configuraciones, estos métodos comprenden proporcionar un cultivo celular que comprende células de insecto, infectar o transferir las células con un ácido nucleico de las presentes enseñanzas que comprende una secuencia que codifica un polipéptido tóxico y un intrón que interrumpe la secuencia e incubar las células bajo condiciones adecuadas para la producción de virus. En diversas configuraciones, un ácido nucleico puede estar comprendido, por un virus, tal como un baculovirus, un AAV, o una combinación de los mismos. En consecuencia, en diversas configuraciones, estos métodos incluyen: proporcionar un cultivo celular que comprende células de insecto; e infectar las células con un vector de virus tal como un AAV que comprende un ácido nucleico de las presentes enseñanzas, y con un segundo vector tal como Bac-inCap-inRep. La infección puede producirse durante al menos aproximadamente 1 día, durante al menos 2 días, durante al menos 3 días, durante aproximadamente 3 días, durante al menos 4 días, durante al menos 5 días, hasta aproximadamente 5 días, durante al menos 6 días, hasta aproximadamente 6 días, durante 7 días, o hasta aproximadamente 7 días. En varias configuraciones, estos métodos pueden comprender adicionalmente la lisis de las células para formar un lisado que comprende el AAV. Debido a que un lisado puede incluir también desechos celulares, los métodos pueden comprender además la digestión de los residuos celulares con benzonasa. En varias configuraciones, un AAV que

comprende un ácido nucleico de estos métodos puede ser cualquier AAV, tal como un AAV2 o AAV9. En algunas configuraciones, las células de insecto pueden ser células de *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4, células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 o células de *Spodoptera frugiperda* Sf21. En algunas configuraciones preferidas, las células de insecto en estos métodos pueden ser células de *Spodoptera frugiperda* Sf9.

5 Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen métodos para tratar una enfermedad o afección médica tal como infección por VIH, enfermedad de injerto contra huésped o cáncer. En diversas configuraciones, estos métodos pueden comprender administrar a un sujeto que necesita terapia una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico de las presentes enseñanzas. En varias configuraciones, el ácido nucleico puede estar comprendido por un virus, tal como AAV, de manera que los métodos comprenden administrar a un sujeto que
10 necesite terapia una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus tal como un AAV que comprende un ácido nucleico de las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones preferidas, el AAV puede ser AAV2 o AAV9, más preferiblemente AAV2. En varias configuraciones, un cáncer que puede tratarse mediante los métodos descritos puede ser, sin limitación, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, un tumor cerebral, un cáncer de cuello uterino o un carcinoma nasofaríngeo.

15 Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen el uso de un ácido nucleico o virus de las presentes enseñanzas para el tratamiento de la infección por VIH, la enfermedad de injerto contra huésped o un cáncer.

Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen un ácido nucleico o virus de las presentes enseñanzas para su uso en el tratamiento de la infección por VIH, la enfermedad de injerto contra huésped o un cáncer.

20 Algunas realizaciones de las presentes enseñanzas incluyen un ácido nucleico o virus de las presentes enseñanzas para su uso en el tratamiento de la infección por VIH, la enfermedad de injerto contra huésped o un cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra mapas genéticos y transcripcionales de un gen tóxico tal como un gen DT-A que comprende un intrón y unido operativamente a un promotor tal como un promotor CMV.

25 La FIG. 2 ilustra un método para producir en una célula de insecto un baculovirus recombinante que porta un gen DT-A interrumpido por el intrón de la hormona del crecimiento humano o un gen de barnasa interrumpido por el intrón del antígeno T grande del SV40 y fusionado en el marco con GFP.

La FIG. 3 ilustra mapas genéticos y de transcripción de vectores AAV representativos que portan un gen tóxico tal como un gen DT-A, modificado para comprender un intrón dentro del marco de lectura abierto.

30 La FIG. 4 ilustra un método para producir vectores de AAV que portan un gen tóxico tal como un gen DT-A en células de insectos.

La FIG. 5 ilustra un método alternativo para producir vectores de AAV que portan un gen tóxico tal como un gen DT-A que comprende un intrón en células de insecto con un transgen de AAV integrado de forma estable. Bac, Rep, Cap y 1TR son como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. 20090203071.

35 Las Figuras 6-11 ilustran mapas de plásmidos lanzadera pFastBac que pueden usarse en diversas configuraciones de las presentes enseñanzas. Cada vector comprende: sitios diana Tn7R y Tn7L; un marcador de selección de resistencia a la ampicilina (AMP); un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia de codificación; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación de SV40pA de 144 pb,

CATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACT

40 CATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCT (SEQ ID NO: 1). Sin embargo, estos componentes individualmente pueden no ser necesarios para practicar las diversas realizaciones de las presentes enseñanzas. Abreviaturas: DT-A, fragmento de difteria A; CMV, promotor de citomegalovirus; hGH, intrón de la hormona del crecimiento humana; Bar, Barnasa: GFP, proteína de fluorescencia verde; SV40, intrón del T-antígeno grande 40 del virus simio; hTERT, promotor de transcriptasa inversa de telomerasa humana.

45 La FIG. 6 ilustra un mapa del plásmido lanzadera pFastBac que comprende, entre el ITR de AAV, un promotor de CMV unido operativamente a una secuencia codificante de DT-A en la que el vector comprende: sitios diana Tn7R y Tn7L; un marcador de selección de resistencia a ampicilina; un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia codificante; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación SV40pA de 140 pb. Abreviaturas: DT-A, fragmento de difteria A; CMV, promotor de citomegalovirus;
50 hGH, intrón de la hormona del crecimiento humana.

- 5 La FIG. 7 ilustra un plásmido lanzadera pFastBac que comprende, entre ITR de AAV, un promotor de CMV unido operablemente a una secuencia codificante de DT-A interrumpida por el intrón de la hormona del crecimiento humana, en el que el vector comprende: sitios diana de Tn7R y Tn7L; un marcador de selección de resistencia a la ampicilina; un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia de codificación; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación de SV40pA de 144 pb. Abreviaturas: DT-A, fragmento de difteria A; CMV, promotor de citomegalovirus; hGH, intrón de la hormona del crecimiento humana; SV40, intron de T-antígeno grande del virus 40 de simio.
- 10 La FIG. 8 ilustra un mapa de un plásmido lanzadera pFastBac que comprende, entre ITR de AAV, un promotor CMV unido operativamente a una secuencia codificante de Barnasa fusionada en marco con una secuencia codificante de GFP, en la que el vector comprende: sitios diana Tn7R y Tn7L; marcador de selección de resistencia a la ampicilina; un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia de codificación; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación de 144 pb de SV40pA.
- Abreviaturas: CMV, promotor de citomegalovirus; hGH, intrón de hormona del crecimiento humano; Bar, Bamasa; GFP, proteína de fluorescencia verde; SV40, intron de T-antígeno grande del virus 40 de simio.
- 15 La FIG. 9 ilustra un mapa de un plásmido lanzadera de pFastBac que comprende, entre ITR de AAV, un promotor de CMV unido operativamente a una secuencia de codificación de Barnasa interrumpida por un intrón de T-antígeno grande de SV40 y fusionada en marco con una secuencia de codificación de GFP, en la que el vector comprende: los sitios diana Tn7R y Tn7L, un marcador de selección de resistencia a ampicilina, un marcador de selección de resistencia a la gentamicina, un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia codificante, ITR de AAV y una secuencia de poliadenilación de SV40pA de 144 bp. Abreviaturas: CMV, promotor de citomegalovirus; hGH, intrón de la hormona del crecimiento humana; Bar, Barnasa; GFP, proteína de fluorescencia verde; SV40, intron de T-antígeno grande del virus 40 de simio.
- 20 La FIG. 10 ilustra un mapa de un plásmido lanzadera de pFastBac que comprende, entre ITR de AAV, un promotor de hTERT unido operativamente a una secuencia codificante de DT-A interrumpida por el intrón de la hormona del crecimiento humano, en la que el vector comprende; sitios diana Tn7R y Tn7L; un marcador de selección de resistencia a ampicilina; un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia de codificación; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación de 144 pb de SV40pA. Abreviaturas: DT-A, fragmento de difteria A; hGH, intrón de la hormona del crecimiento humano; SV40, intron de T-antígeno grande del virus 40 de simio; hTERT, promotor de la transcriptasa inversa de telomerasa humana.
- 25 La FIG. 11 ilustra un mapa de un plásmido lanzadera pFastBac que comprende, entre ITR de AAV, un promotor de hTERT unido operativamente a una secuencia codificante de GFP, en la que el vector comprende: sitios diana Tn7R y Tn7L; un marcador de selección de resistencia a ampicilina; un marcador de selección de resistencia a la gentamicina; un intrón de hGH que no está dentro de una secuencia de codificación; ITR de AAV; y una secuencia de poliadenilación de 144 pb de SV40pA. Abreviaturas hGH, intrón de la hormona del crecimiento humano; Bar, Barnasa; GFP, proteína de fluorescencia verde; SV40, intron de T-antígeno grande del virus 40 de simio; hTERT, promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana.
- 30 La FIG. 12 ilustra la generación de baculovirus recombinantes en células Sf9 después de la transfección con ADN de Bacmid (Figura 12A, Figura 12C), y la amplificación de los baculovirus recombinantes en células Sf9 por infección (Figura 2B, Figura 12D)
- 35 La FIG. 13 ilustra mapas genéticos y transcripcionales de baculovirus recombinantes representativos que llevan un gen DT-A interrumpido por un intrón de la hormona del crecimiento humano y un gen de Barnasa interrumpido por un intrón de antígeno-T grande de SV40 y fusionado en marco con GFP.
- La FIG. 14 ilustra los efectos de la muerte en células de mamífero (riñón embrionario humano EK293) por transducción con baculovirus recombinantes que albergan genes tóxicos durante 48 horas.
- 40 La FIG. 15 ilustra un método de producción de vectores AAV que llevan un gen DT-A que comprende el intrón de la hormona del crecimiento humano o el gen de la barnasa que comprende el intrón del antígeno T grande de SV40 y fusionado en marco con el gen GFP en células de insecto que llevan un transgén AAV integrado de forma estable.
- La FIG. 16 ilustra mapas genéticos y transcripcionales de vectores AAV representativos que portan un gen DT-A que comprende un intrón de la hormona del crecimiento humano o un gen de Barnasa que comprende un intrón de T-antígeno grande de SV40 y fusionado en marco con el gen GFP.
- 50 La FIG. 17 ilustra el efecto de la muerte de AAV2-CMV-inDTA (hGH) en células de mamífero.
- La FIG. 18 ilustra el efecto de la muerte en células de mamífero por transducción con vectores de AAV que albergan genes tóxicos.
- La FIG. 19 ilustra un resultado representativo de la muerte de células por AAV2-hSURV-inDTA (hGH).

La FIG. 20 ilustra el ensayo de viabilidad celular de células tumorales por vectores AAV2 que llevan DT-A bajo el control de diversos promotores específicos de tumores. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se transdujeron con vectores AAV2 en diluciones en serie de 4 veces durante 4 días y se ensayó la viabilidad celular con el kit de ensayo de la viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo. (a) células HepG2, (b) células Hep3B, y (c) células BE(2)-M17.

Descripción detallada

Las presentes enseñanzas describen un gen tóxico que comprende un intrón, en el que después de la transcripción en un insecto, el intrón no se empalma, de manera que no se forma el producto genético tóxico en la célula de insecto. Un vector que comprende dicho gen tóxico interrumpido por intrón puede crecer en células de insecto. Sin embargo, tras la introducción en una célula de mamífero tal como una célula de cáncer, la transcripción del gen tóxico conduce a la formación de un ARNm maduro, que se traduce en una proteína tóxica que mata a la célula huésped mamífera.

La figura 1 ilustra mapas genéticos ejemplares y transcripcionales de un gen DT-A que comprende un intrón y que está operativamente unido a un promotor CMV. Tras la introducción de un gen DT-A, que comprende un intrón de las presentes enseñanzas en una célula de mamífero, el gen se transcribe y se forma un ARNm de DT-A maduro en la célula de mamífero a través del empalme de intrón. El ARN maduro se traduce en la proteína DT-A funcional para matar la célula. Los números por encima del mapa genético basado en la secuencia codificante de DT-A (número de entrada Genbank X00703) indican las posiciones de nucleótidos en las que se inserta el intrón. CMVpr = promotor de citomegalovirus; DT-A = secuencia de ácido nucleico de la toxina A de difteria; PA = señal de poliadenilación.

Los métodos y composiciones descritas en la presente memoria utilizan técnicas de laboratorio bien conocidas por los expertos en la técnica, y se pueden encontrar en manuales de laboratorio tales como Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; *Methods In Molecular Biology*, ed. Richard, Humana Press, NJ, 1995; Specter, D.L. et al., *Cells: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998; y Harlow, E. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. Referencias adicionales que describen métodos de expresión de polipéptidos heterólogos en células de insectos, así como métodos de introducción de vectores y ácidos nucleótidos en células de insectos y métodos para mantener cultivos de células de insectos incluyen, por ejemplo, O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors*, A Laboratory Manual Oxford Univ. Press, 1994; Samulski et al. *J. Vir.* 63: 3822 - 3288, 1989; Kajigaya et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 4646 - 4650, 1991; Ruffing et al, *J. Vir.* 66: 6922 - 6930, 1992; Kimbauer et al., *Vir.* 219: 37 - 44, 1996; Zhao et al, *Vir.* 272: 382 - 393, 2000; y Samulski et al, *Pat. de EE.UU.* Nº 6.204.059.

Los experimentos descritos en este documento también pueden hacer uso de los siguientes materiales y métodos.

Cultivo de células. Las células HE 293 se mantuvieron a 37°C en medio Eagle modificado de Dubelcco (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina y suplementado con suero fetal de ternera al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células HepG2, Hep3B y W138 se mantuvieron a 37°C en medio de crecimiento completo de EMEM (American Type Culture Collection) que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina y suplementado con suero de ternero fetal al 10%. Se mantuvieron células BE (2) M17 (American Type Culture Collection) en medio de crecimiento completo 50% EMEM + 50% F12 que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina y se suplementó con 10% de suero de ternera fetal. Se mantuvieron células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 28°C en medio libre de suero ESF92J (Expression Systems, Woodland, CA) que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (invitrogen, Carlsbad, CA).

Generación y titulación de baculovirus recombinantes. Los plásmidos construidos como se describió anteriormente se usaron para transformar células DH10Bac-competentes para generar bacmidos recombinantes. Los bacmidos que contenían los genes diana se usaron para generar baculovirus recombinantes de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA), con modificaciones menores. Brevemente, se utilizaron 2 ng del ADN plasmídico para transformar 20 µl de células competentes DH10Bac. Después de 4 horas de incubación a 37°C en 500 µl de medio SOC, se sembraron 25 y 2,5 µl del cultivo por separado en placas de selección y se incubaron durante 48 horas para permitir la formación de colonias blancas/azules. Generalmente, se recogieron tres colonias blancas para cada construcción y se prepararon ADNs de bacmidos miniprep. Los ADN bacmidos se usaron para transfectar células Sf9 para generar baculovirus recombinantes. Los baculovirus recombinantes se amplificaron una vez y se determinaron los títulos con ensayo PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) y se convirtieron en unidades formadoras de placas (pfu) basándose en estudios empíricos en los que se convirtieron 20 copias en 1 pfu.

Producción, purificación y valoración del vector AAV. Los métodos para la producción, purificación y valoración de vectores de AAV se han descrito previamente (Chen, H., *Mol Ther* 16: 924 - 930, 2008). Brevemente, se cultivaron células Sf9 a 28°C hasta $\sim 1 \times 10^7$ células/ml en medio libre de suero ESF921 que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y se diluyó a $\sim 5 \times 10^6$ células/ml antes de la infección. Se empleó doble infección para producir vectores AAV. Se utilizaron cinco multiplicidades de infección (moi) de transgenes Bac-AAV y 1,0 moi de Bac-inCap-inRep para infectar células Sf9 a 28°C durante 3 días para producir vectores de AAV. Después de 3 días

de infección, los sedimentos de células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. Los sedimentos celulares se lisaron en un tampón de lisis de Sf9 modificado (Tris-HCl 50 mM pH 8, 0,1% de sarkosilo, Triton X-100 al 1%, MgCl₂ 2 mM) y los ácidos nucleicos celulares (ADN y ARN) se digirieron usando benzonasa (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO). Los lisados celulares se purificaron mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos y los sobrenadantes se sometieron a 2 rondas de ultracentrifugación para purificar los vectores de AAV. Los vectores de AAV se intercambiaron en tampón en PBS que contenía 0,001% de pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) con 2 columnas desalinizadoras PD-10 (GE HealthCare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ). Después de la purificación, los vectores de AAV se titularon con el método PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

Ensayo de proliferación celular. Se hicieron crecer células HEK293 en una placa de 24 pocillos (1,5e+5 células/pocillo) durante la noche y se transdujeron con vectores AAV2 (1,5e + 9vg pocillo) durante 48 horas. Las células fueron entonces tripsinizadas y su número contado. Las células se cultivaron además durante otras 48 horas hasta alcanzar la confluencia y se tripsinizaron, se contó el número de células y luego se expandió en vasos más grandes. Después de otro cultivo de 72 horas, las células fueron tripsinizadas y contadas. Las células viables se contaron con tinción con azul de tripano.

Ensayo de viabilidad celular. Se utilizó el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo para probar la viabilidad celular según el protocolo del fabricante (Promega, Madison, Wi). Brevemente, se sembraron células (W138, HepG2, Hep3B, y BE (2) M17) en placas de 96 pocillos a 3.2e+4 células/pocillo durante la noche y se transdujeron con vectores AAV2 en diluciones en serie de 4 veces durante 4 días. El reactivo se reconstituyó y se añadió a las células. Después de mezclar en un agitador orbital durante 2 minutos para lisar las células, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se registraron las señales luminiscentes.

Tal como se utiliza en la descripción, en los dibujos y en cualquier reivindicación anexa, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique lo contrario.

El presente inventor ha desarrollado composiciones y métodos para producir un vector que comprende un gen tóxico en una célula de insecto así como cultivos de células de insecto que pueden incluir un vector que comprende un gen tóxico y pueden producir virus tales como un AAV a un título de al menos 10⁹ genomas virales/ml, al menos 10¹⁰ genomas virales/ml, al menos 10¹¹ genomas virales/ml o al menos 10¹² genomas virales/ml, es un medio de cultivo no concentrado. En varias configuraciones, un cultivo de células puede producir un baculovirus a un título de al menos 10⁶ unidades formadoras de placas (PFU)/ml, al menos 10⁷ PFU/ml, al menos 10⁸ PFU/ml, al menos 10⁹ PFU/ml o al menos 10¹⁰ PFU/ml, en medio de cultivo no concentrado.

Las células de insectos que pueden utilizarse en diversas configuraciones de las presentes enseñanzas pueden ser cualquier célula de insecto que pueda formarse en un cultivo in vitro. Tales células son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, las descritas en Kost, T.A., et al. Nature Biotechnology 23: 567 - 575, 2005, y las referencias citadas en el mismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de varias realizaciones de las presentes enseñanzas y no pretenden limitar el alcance de ninguna reivindicación. Los expertos en la técnica reconocerán que son posibles muchas variaciones que están dentro del alcance de las presentes enseñanzas.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la estructura y la construcción del plásmido pFB-CMV-DTA, un plásmido lanzadera pFastBac (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) que comprende un promotor CMV unido operativamente corriente arriba a una secuencia de codificación DT-A (figura 6).

Para construir este plásmido, un plásmido que contiene el gen DT-A (nº. de entrada GenBank X00703) se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI para generar un fragmento que contenía una secuencia codificante de DT-A con extremos pegajosos EcoRI y BamHI. Este fragmento se ligó con los sitios EcoRI y BamHI del plásmido pFB-AAV-CMV-SV40pA para crear pFB-CMV-DTA. Para insertar el intrón de la hormona de crecimiento humano en el gen DT-A, se empleó un método de PCR. En primer lugar, la secuencia de unión ascendente junto con la secuencia 5'-DT-A de los números de nucleótidos 1 a 103 se amplificaron usando el cebador directo 5'-GATTATGATCACTAGTCGAG-3' (SEQ ID NO: 2) y el cebador inverso 5'-**GGGCGCTTACCTTTTTGAATGGAATCTACA-3'** (SEQ ID NO: 3) (la fuente en negrita indica la secuencia de intrón de la hormona del crecimiento humano). El intrón de la hormona del crecimiento humano se amplificó con el cebador directo 5'-ATTCAAAAAGGTAAGCGCCCTAAAATCCC-3' (SEQ ID NO: 4) (la fuente en negrita indica la secuencia del intrón de la hormona del crecimiento humano) y el cebador inverso 5'-

TTTTGTATACCTGGGGAGAAACCAGAGGGC-3' (SEQ ID NO: 5) (la letra cursiva indica el sitio de restricción para BstZ171; la negrita indica la secuencia del intrón de la hormona del crecimiento humano). Estos dos fragmentos de PCR se unieron entonces a través de una segunda amplificación por PCR con el primer cebador 5'-

5 GATTATGATCACTAGTCGAG-3' (SEQ ID NO: 6) y el cebador inverso 5'-TTTTGTATACCTGGGGAGAAACCAGAGGGC-3' SEQ ID NO: 7). El fragmento de PCR unido se digirió entonces con las endonucleasas de restricción EcoRI y BstZ171 y se ligó a los sitios EcoRI y BstZ171 de pFB-CMV-DTA para crear pFB-CMV-inDTA (hGH) (Figura 1, Fig. 7), y a los sitios EcoRI y BstZ171 de pFB-CMVtetO-DTA-p10-TetR para crear pFB-CMVtetO-inDTA-10-TetR. El casete de expresión se verificó mediante análisis de secuenciación con ADN.

La secuencia de ADN del gen DT-A (nº de entrada GenBank X00703) utilizado en este ejemplo es:

gtgagcagaaaactgtttgcgtaacttctaatagggggcgtactggggataggggccccacctcagcccatgcaggcgctgatgatgttgt
 tgattcttctaaatcttttggatggaaaactttctcgtaccacgggactaaacctgggtatgtagattccattcaaaaaggatatacaaaagcca
 aaatctggtacacaaggaaattatgacgatgattggaaagggtttatagtagaccgacaataaacgacgctgcggggatactctgtagataat
 gaaaaccgctctctggaaaagctggaggcggtgcaaaagtacgatccaggactgacgaagggtctcgactaaaagtgataatgcc
 gaaactattaagaaagagtttaggttaagtctcactgaaccgttgatggagcaagtcggaacggaagagtttatcaaaaaggttcggtgatggt
 gcttcgctgtagtgctcagccttccctcgtgaggggagttctagcgttgaatatattaactgggaacaggcgaaagcgttaagcgta
 gaacttgagattaattttgaaaccggtgaaaacgtggccaagatgcgatgatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgtcag
 gcgatcagtaggtgactcattgtcatgataaatcttgattgggatgataaggataaaactaagacaaagatagagtcttfgaaagagca
 tggccctatcaaaaataaatgagcgaagtcaccaataaaacagtatctgaggaaaaagctaaacaatacctagaagaatttcatcaaacg
 gcattagagcatctgaattgtcagaactaaaaccgttactgggaccaatcctgtattcgtggggctaactatggcgctgggagtaaac
 gttgcgcaagttatcgatagcgaacagctgataattggaaaagacaactgctgctctttcgatacttctggtatcggtagcgtaatgggca
 ttgcagacggtgccgttcaccacaatacagaagagatagtgccacaataatagctttatcgtctttaaattggtgctcaagctattccattggtg
 ggagagctagttgataattggttctgctgcatataattttgtagagagtattatcaatttattcaagtagttcataatcgtataatcgtcccgcgat
 tctccggggcataaaaacgcaaccatttctcatgacgggtatgctgtcagttggaacactgttgaagattcgataatccgaactggtttcaag
 gggagagtgggcagacataaaaactgctgaaaataccccgctccaatcgcgggtgtcctactaccgactattcctggaaaagctgga
 cgtaataagtccaagactcatatttccgtaaatggcggaaaataaggatgcgttgcagagctatagacgggtgatgtaactttttgtcgccta
 aatctctgtttatgttgtaattggtgtgcatgcgaatctcagctggcafttcagagaagcagctcgagaaaattcattctaatgaaatttctg
 cggattccataggcgttctgggtaccagaaaacagtagatcacaccaaggttaattctaagctatcgctatftttgaaatcaaaagctga
 (SEQ ID NO: 8).

La secuencia de codificación de DT-A que comprende el intrón de hGH es como sigue:

ATGGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAAACCTTTTCTT
 CGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGgtaagcggccctaaaatc

cctttggcacaatgtgtcctgaggggagaggcagcgacctgtagatgggacgggggcaactaacctcagggtttggggttctgaatgtga
 gtatcgccatgtaagcccagatatttggccaatctcagaaagctcctggctccctggaggatggagagagaaaaacaacagctcctggag
 caggagagtgctggcctcttgcctcctcggtcctctgttgcctctggtttctccccagGTATACAAAAGCCAAAATCT
 GGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAGGGTTTTATAGTACCGACAATAA
 ATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTCTCTGGAAAAGCTG
 GAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACTAAAAGTG
 GATAATGCCGAAACTATTAAGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCACTGAACCGTTGAT
 GGAGCAAGTCGGAACGGAAGAGTTTATCAAAGGTTTCGGTGATGGTGCTTCGCGTG
 TAGTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACT
 GGGAACAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGA
 AACGTGGCCAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCG
 TGTCAGGCGATGA (SEQ ID NO: 39).

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la estructura y la construcción del plásmido pFB-CMVtetO-DTA-p10-TetR. Para construir pFB-
 CMVtetO-DTA-p10-TetR, se liberó un casete de expresión de TetR dirigido por p10 de un plásmido por digestión con
 5 las endonucleasas de restricción HindIII y AvrII. El fragmento liberado se insertó en los extremos pegajosos HindIII y
 AvrII del plásmido pFB-CMV-DTA que habían sido digeridos con las endonucleasas de restricción HindIII y AvrII.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la intrones de mamífero para interrumpir los ORF del gen de la toxina.

Para generar los vectores de algunas realizaciones de las presentes enseñanzas, se insertó el intrón de la hormona
 10 del crecimiento humano (hGH) en el ORF de DT-A entre los nucleótidos 103 y 104 (la primera letra del codón de
 inicio ATG se asigna como nucleótido N° 1). El intrón del antígeno T grande SV40 (SV40LT) se insertó en el ORF de
 barnasa entre los nucleótidos 9 y 10. Se utilizaron como controles DT-A y ORF de barnasa sin interrupción de intrón.
 Todas las secuencias codificadoras de toxinas con o sin interrupción de intrón se clonaron en el plásmido lanzadera
 pFastBac y la representación esquemática de los casetes de expresión se muestra en la FIG. 3.

La Figura 3 ilustra mapas genéticos y transcripcionales de baculovirus recombinantes representativos que llevan los
 15 casetes de expresión de toxina flanqueados por ITR de AAV. Los vectores AAV se produjeron co-infectando células
 de insecto con un segundo baculovirus recombinante que llevaba genes AAV rep y cap. Tras la introducción de los
 vectores baculovirales o AAV en una célula de mamífero, se forma ARNm de toxina madura mediante el empalme
 20 de intrones y se traduce en proteína funcional para matar la célula. (a) gen DT-A insertado con el intrón de hGH y
 bajo control de diversos promotores específicos de tumores. Los números por encima del mapa genético basado en
 la secuencia de codificación DT-A (no. de entrada del Genbank X00703) indican las posiciones de nucleótidos en las
 que se inserta el intrón, (b) el gen Barnasa insertado con el intrón del antígeno SV40LT y fusionado en marco con el
 gen GPP. Los números por encima del mapa genético se basan en la secuencia de codificación de la barnasa (no.
 25 de entrada del Genbank M14442), e indican las posiciones de nucleótidos donde se inserta el intrón, (c) DT-A y
 genes de barnasa sin inserción de intrón.

La secuencia detallada de la secuencia de codificación de barnasa que comprende el intrón del antígeno SV40LT es la siguiente.

ATGGCACAGgtatttgcttctcctaaatcctgggtgatgcaatgtactgcaaacaatggcctgagtggtgcaaagaaaatgtctgct
 aactgcatatgcttgctgtgcttactgaggatgaagcatgaaaatagaaaattatacaggaaagatccacttggtgggtgattgctactgctt
 cgattgctttagaatggtggtggactgatcttftgaaggaaccttacttctggtgtgacataattggacaaactacctacagagatttaa
 gctctaaggtaaatataaaaatttttaagtataatgtgtaaaactactgattctaattgtttgtatttttagGTTATCAACACGTTTG
 ACGGGGTTGCGGATTATCTTCAGACATATCATAAGCTACCTGATAATTACATTACAA
 AATCAGAAGCACAAGCCCTCGGCTGGGTGGCATCAAAAGGGAACCTTGCAGACGTC
 GCTCCGGGGAAAAGCATCGGCGGAGACATCTTCTCAAACAGGGAAGGCAAACCTCC
 AGGGCAAAGCGGACGAACATGGCGTGAAGCGGATATTA ACTATAATCAGGCTTC
 AGAAATTCAGACCGGATTCTTTACTCAAGCGACTGGCTGATTTACAAAACAACGGA
 CCATTATCAGACCTTTACAAAAATCAGAATGGTGAGCAAGGGC (SEQ ID NO: 40).

Fusionada con GFP, la secuencia añadida es ---GFP--- GAGCTGTACAAGTAA (SEQ ID NO: 41).

Ejemplo 4

5 Este ejemplo ilustra la estructura y construcción del plásmido pFB-CMV-Bar-GFP que comprende un promotor de CMV unido operativamente aguas arriba a una secuencia codificadora de barnasa fusionada en marco con la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 8).

Para construir pFB-CMV-Bar-GFP (FTG. 8), la secuencia de codificación de barnasa (nº de entrada de GenBank M14442) se amplificó a partir del plásmido pF1A-T7 (Promega, Madison WI) con el cebador directo

10 *5'-CCCGAATTCGCCACCATGGCACAGGTTATCAAC-3'* (SEQ ID NO: 9) (la cursiva indica el sitio de restricción para EcoRI) y el cebador inverso 5'-

TGCTCACCATTCTGATTTTTGTAAAGGTCT-3' (SEQ ID NO: 10). La secuencia de codificación de GFP (Nº. de entrada de GenBank U55762) se amplificó a partir del plásmido pFB-GFP con el cebador directo *5'-CAAAAATCAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'* (SEQ ID NO: 11) y el cebador inverso *5'-GGGGGTACCTCATTACTTGTACAGCTCGTCC-3'* (SEQ ID NO: 12) (la cursiva indica el sitio de restricción para KpnI). Se realizó una segunda ronda de PCR para fusionar la secuencia de codificación de Barnasa con la secuencia de codificación de GFP usando el cebador directo 5'-

15 *CCCGAATTCGCCACCATGGCACAGGTTATCAAC-3'* (SEQ ID NO: 13) y el cebador inverso

20 *5'-GGGGGTACCTCATTACTTGTACAGCTCGTCC-3'* (SEQ ID NO: 14). El fragmento de PCR fusionado se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y KpnI y se ligó a los sitios EcoRI y KpnI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar la secuencia DT-A y crear pFB-CMV-Bar-GFP.

La secuencia de ADN de un gen de barnasa utilizado en este ejemplo (nº. de entrada de GenBank M14442) es:

ES 2 623 259 T3

ctggaaaacgtcacattgctccgcatacgggtcagcaacggctaaaatccgcttgaatatgttcacacaagccgctcaaaacatgattgac
gccgtatacggagaacgccgaaaaaccttactaaggaatttcaataagaagaaaaatcccgggttggttcagccggggttattttcgtag
ataaaaagtactatfttaattcttctattccttcttctgtgctgafacaatgaaaaggaatcagcttcacatgatgaaaatgggaggtattgct
ttgaaaaacgattatcgtggattccggttgttactgggtgctgtctccgcggggggatgctgtttcaacagctgccaaaacggaaacatc
tttcacaaggcacacagaagcacaggttatcaacacggttgacgggggtgaggattatcttcagacatatcataagctacctgataattac
attacaaaatcagaagcacaagccctcggctgggtggcatcaaaaggaaccttcagacgctcgtccggggaaaagcatcggcggag
acatcttctcaaacaggaaggcaaacctcccgggcaaaagcggacgaacatggcgtgaaagcggatattaactatacatcaggcttcagaa
attcagaccggattcttactcaagcgactggctgatttacaacaacggaccattatcagaccttacaanaatcagataacgaaaaaac
ggctccctcgggagggcgtttttcagctttacataaagtgttaataaattttctcaaacctgatcggtaatttacttt (SEQ ID
NO: 15).

La secuencia de ADN de un gen GFP usado en este ejemplo es:

tagttattaatagtaatacattacggggcattagttcatagccatafatggagttccggttacataacttacggtaaatggcccgcctggctg
accgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtgg
agtatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc
cctggcattatgccagfacatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatcgggtttg
gcagtacatcaatggcggtgtagcgggttgactcacggggatttcaagtctccacccttattgacgtcaatgggagtttgtttggcacca
aatcaacgggactttcaaaatgtcgtaaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagc
agagctggttagtgaaccgtcagatccgctagcgtaccggactcagatctcagctcaagcttgaattctgcagtcgacgggtaccg
ggcccgggatccaccggtgccaccatggfagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgccatcctggctgagctggacgg
cgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagtcatctgcacc
accggcaagctgccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgagtgcttcagccgctaccccaccacatgaa
gcagcacgacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccg
cgccgaggtgaagttcagggcgacacctgggtaaccgcatcagctgaagggcatcgaactcaaggaggacggcaacatcctggg
gcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatcc
gccacaacatcaggagcggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacccccatcggcgacggccccgtgctgctcccc
acaaccactacctgagcaccagtcgcccagcaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcc
gcccggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaaagcggccgcgactctagatcataatcagccataccacattgtagaggttta

cttgctftaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattggtggtgfaactgtttattgcagcttataatggta
 caaataaagcaatagcatcacaaatffcacaaataaagcattttttcactgcattctagttggttfgtccaaactcatcaatgtatcttaaggc
 gtaaattgtaagcgttaataatftttgftaaaatcgcgttaaaatftttgftaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctta
 taaatcaaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttgcagtttggacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaag
 ggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaacctcacctaatacaagtttttggggcaggtgcccgtaaagcactaaat
 cggaacctaaaggagccccgatttagactgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaag
 gagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgtgcgcgtaaccaccacaccgccgcgctaatgcgccgctacagggcg
 cgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaaatacaatcaaatatgtatccgctcatgagacaataac
 cctgataatgctcaataatattgaaaaggaagagtcctgagggcggaaagaaccagctgtggaatgtgtgacagttagggtgtggaagt
 cccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaagtccccaggctccccagca
 ggcaagaatgcaaaagcatgcatctcaattagtcagcaacctatgcccgccctaaactccgccatccccgccctaaactccgccagtt
 ccgccattctccgcccatggctgactaattttttatfatgcagagggccgagggccctcggcctctgagctattccagaagtagtgagg
 aggtttttggaggcctaggctttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcatgattgaacaagatggattgcacgca
 ggtctccggcgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgcccgctgttccggctgt
 cagcgcagggcgcccggctttttgtcaagaccgactgtccgggtccctgaatgaactcaagacgaggcagcgcggctatcgtggc
 tggccacgacggcgcttcttgcgcagctgtctcagctgtgactgaagcgggaagggaactggctgctattgggcgaagtgcggggg
 caggatctctgtcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgttgatccggctacc
 tccccattcgaccaccaagcgaaacatcgatcgagcagcactcggatggaagccggcttctgcatcaggatgatctggacgaa
 gagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggtcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcg
 atgcctgcttgcgcaatatcatggtggaatggccgctttctggattcatgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggac
 atagcgttggctaccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggatcgcgctcccgatcg
 cagcgcacgccttctatcgccttctgacgagttctctgagcgggactctgggggtcgaatgaccgaccaagcgcacgcccacactgcca
 tcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggftgggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcgg
 ggatctcatgctggagttcttgcgccaccctagggggaggctaactgaaacacgggaaggagacaataaccggaaggaaccgcgctatga
 cggcaataaaaaagacagaataaaacgcacggtgttgggctgttfttcataaacgccccgttccagggtggcactctgtcgatac
 cccaccgagaccccaatggggccaatacgcggcgttcttcttttccccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggtcgc
 agccaacgtcggggcggcaggccctgccatagcctcaggftactcatatatactftagattgatttaaaactcatttttaaftaaaaggatcta
 ggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaagga
 tcttctgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgttgggtccggatcaagagcta
 ccaactcttttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaactgtcctctagtgtagccgtagttaggccaccactcaaga
 actctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactc
 aagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaaacgggggggtctgtcacacagcccagcttggagcgaacgacctaccc
 gaactgagatacctacagcgtgagctatgaaaagcggcacttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagg
 gtcggaacaggagagcgcagaggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagctctgctgggttccgccctctgacttgagc

gtcgatttttgatgctcgtcaggggggaggcctatggaaaaacgccagcaacggcgcccttttacggctcctggccttttgctggccttt
 tgctcacatgtttctcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccatgc (SEQ ID NO: 16).

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la estructura y construcción del plásmido pFB-CMV-inBar (SV40)-GFP, que comprende un promotor de CMV unido operativamente de forma ascendente a una secuencia codificante de barnasa que tiene un intrón de antígeno T grande SV40 (SV40) insertado y que está fusionado en marco con una secuencia codificante de GFP (Figura 9).

Para insertar el intrón del antígeno T grande de SV4 en la barnasa y construir pFB-CMV-inbar (SV40)-GFP (FIG. 9), se empleó un método de PCR. La porción 5' de la secuencia codificadora de la barnasa junto con un intrón de antígeno T4 de gran tamaño de SV40 de cadena completa se amplificó por PCR a partir de un plásmido SV40 (pUCSV40-B2E, ATCC, Manassas, VA) con cebador directo 5'-

CCCCGAATTCGCCACCATGGCACAGGTATTTGCTTCTTCTTAAA-3' (SEQ ID NO: 17) (el tipo de letra en cursiva indica el sitio de restricción de EcoRI, la tipografía en negrita indica la secuencia de intrón del antígeno T grande de SV40) y el cebador inverso 5'

TGTTGATAACCTAAAATACACAAACAATTA-3' (SEQ ID NO: 18) (la fuente en negrita indica la secuencia del intrón del antígeno T grande del SV40). La porción 3' de la secuencia codificante de la barnasa junto con la secuencia codificante de GFP se amplificó por PCR con el cebador directo 5'-

TGTATTTAGGTTATCAACACGTTTGACGG-3' (SEQ ID NO: 19) (la fuente en negrita indica la secuencia del intrón del antígeno T grande del SV40), y el cebador inverso 5'-

GGGGGGTACCTCATTACTTGTACAGCTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 20) con pFB-CMV-Bar-GFP como plantilla. Una segunda PCR se llevó a cabo para unir estos dos fragmentos de PCR junto con el cebador directo 5'-

CCCCGAATTCGCCACCATGGCACAGGTATTTGCTTCTTCTTAAA-3' (SEQ ID NO: 21) y el cebador inverso *5'-GGGGGGTACCTCATTACTTGTACAGCTCGTCC-3'* (SEQ ID NO: 22). El fragmento de PCR unido se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y KpnI y se ligó a los sitios EcoRI y KpnI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar la secuencia de DTA y crear pFB-CMV-inBar(SV40)-GFP.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la estructura y la construcción del plásmido pFB-hTERT-inDTA (hGH) que comprende un promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) operativamente unido en sentido ascendente a una secuencia codificante de DT-A con un intrón de la hormona del crecimiento humano insertado (FIG. 10).

Para construir pFB-hTERT-inDTA (hGH) (FIG. 10), se amplificó hTERT utilizando PCR a partir de ADN genómico purificado de células HEK293 de riñón embrionario humano con cebador directo

5'-GCGCACGCGTATCATCAGCTTTTCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 23) (el tipo de letra en cursiva indica sitio de restricción para MluI) y el cebador inverso 5'-
CGCGACCGGTCTGCTGCCTGAAACTCGCGCC-3' (SEQ ID NO: 24) (tipo de letra en cursiva indica el sitio de restricción para AgeI).

El fragmento de PCR se digirió con MluI y AgeI y se ligó a los sitios MluI y AgeI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para crear pFB-hTERT-inDTA (hGH).

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la estructura y construcción del plásmido pFB-hTERT-GFP (hGH) que comprende un promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) unido operativamente corriente arriba a una secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 11).

Para construir pFB-hTERT-GFP, se digirió pFB-CMV-GFP con endonucleasas de restricción KpnI y AgeI para eliminar el promotor de CMV, y pFB-hTERT-inDTA (hGH) también se digirió con las mismas enzimas de restricción para liberar un fragmento que comprendía el promotor hTERT. Este fragmento se ligó en el pFB-CMV-GFP digerido (sin el promotor CMB) para generar pFB-hTERT-GFPs.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la producción de baculovirus recombinantes.

En estos experimentos, las secuencias codificadoras de toxina con o sin interrupción de intrón se clonaron en el

plásmido lanzadera pFastBac como se describe en el Ejemplo 3. La representación esquemática de los casetes de expresión se muestra en la FIG. 3. Los plásmidos de pFastBac resultantes se usaron para transformar bacterias competentes de DH10Bac, y se prepararon ADN de bacmido de colonias blancas. Los ADN de bacmido se usaron para producir baculovirus recombinantes como se ha descrito anteriormente. Los resultados, como se ilustran en la FIG. 12, muestran que no se podría generar ningún baculovirus recombinante a partir de los ADNs bacmídicos que contenían los ORF de DT-A o barnasa sin inserción de intrones, mientras que se generaron niveles normales de baculovirus recombinantes y se amplificaron a partir de los ADN bacmídicos que contenían ORF de DT-A o barnasa interrumpido por los intrones de mamíferos. La falta de generación de baculovirus recombinante con ADN bacmido que contenía los genes de toxina sin interrupción de intrón demuestra que DT-A o barnasa es letal para las células de insecto aunque los genes de la toxina estén bajo el control del promotor CMV (no un promotor de insectos). Por otra parte, la generación y amplificación satisfactoria de baculovirus recombinantes a partir de ADN bacmídicos que contienen genes de toxina interrumpidos por intrón indican que tanto los intrones de hGH como de SV40LT no se empalmaron en células de insectos y por lo tanto que no se produjeron toxinas debido a la interrupción de los ORF de DT-A y barnasa.

La Fig. 12 muestra la generación de baculovirus recombinantes en células Sf9 por transfección con ADN Bacmido (A & C) y la amplificación de los baculovirus recombinantes en células Sf9 por infección (B & D)

En estos experimentos, los títulos de baculovirus se determinaron a partir de sobrenadantes cosechados 4 días después de la transfección o 3 días después de la amplificación. CMV-inDTA (hGH), baculovirus recombinante que alberga una secuencia codificante de DT-A que comprende el intrón de la hormona de crecimiento humano (hGH) bajo control del promotor CMV; CMV-GFP, baculovirus recombinante que alberga la secuencia codificante de GFP bajo el control del promotor CMV; CMV-Bar-GFP, baculovirus recombinante que aloja una secuencia de codificación de barnasa fusionada en marco con GFP; CMV-inBar (SV40)-GFP, baculovirus recombinante que alberga una secuencia codificadora de Barnasa que comprende el intrón del antígeno T grande de SV40 y se fusiona en marco con la secuencia codificante de GFP; CMV-inDTA (hGH), baculovirus recombinante que alberga una secuencia codificante de DT-A que comprende el intrón de la hormona de crecimiento humano (hGH) bajo control del promotor de CMV; CMV-GFP, baculovirus recombinante que alberga la secuencia codificante de GFP bajo control del promotor de CMV; CMV-Bar-GFP, baculovirus recombinante que aloja una secuencia de codificación de barnasa fusionada en marco con GFP; CMV-inBar (SV40)-GFP, baculovirus recombinante que alberga una secuencia de codificación de Barnasa que comprende el intrón del antígeno T grande de SV40 y se fusiona en marco con la secuencia codificante de GFP. Obsérvese que la producción de baculovirus recombinantes en células de insecto a títulos de aproximadamente $4,4 \times 10^6$ pfu/ml después de la transfección con CMV-inBar (SV40)-GFP, o aproximadamente 9×10^7 pfu/ml tras la transfección con pCMV-inDTA (hGH), y la producción de baculovirus recombinantes en células de insecto a títulos de aproximadamente $6,1 \times 10^8$ pfu/ml después de la infección con CMV-inBar (SV40)-GFP, o aproximadamente $1,2 \times 10^9$ pfu/ml después de la infección con CMV-inDTA (hGH) o CMV-GFP.

Ejemplo 9

Este ejemplo, ilustrado en la FIG. 2, demuestra la generación de baculovirus recombinantes que llevan una secuencia codificante de DT-A que comprende un intrón.

En estos experimentos, se generaron baculovirus recombinantes de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Brevemente, los plásmidos se diluyeron respectivamente en 1 ng/ μ l en tampón TE y se transformaron 2 μ l de cada plásmido diluido en bacterias competentes para DH10Bac. Después de 48 horas de incubación, se recogieron colonias blancas y se prepararon ADN de Bacmido de miniprep. Los ADN de Bacmid de miniprep fueron transfectados respectivamente en células Sf9 durante 4 días. El efecto de la citopatía (CPE) se observó para células Sf9 transfectadas con bacmidos que portaban el gen DT-A que comprendía el intrón, mientras que no se observó CPE para células Sf9 transfectadas con bacmidos que portaban el gen DT-A independientemente de si el casete de expresión represor Tet estaba presente o no. Estos resultados indican que cualquier célula transfectada con el Bacmido que porta el gen tóxico de DT-A se destruyó y no se generó baculovirus recombinante y no se observó CPE. Los sobrenadantes de todas las células Sf9 transfectadas se cosecharon como disoluciones madre de baculovirus y los títulos de los baculovirus se determinaron con un método cuantitativo de PCR en tiempo real utilizando los cebadores correspondientes al gen gp64 de baculovirus. Se amplificaron los baculovirus recombinantes de los que mostraban CPE aparente y se determinaron los títulos. Para determinar el título, los baculovirus recombinantes se diluyeron respectivamente en tampón 2x TE y se calentaron a 95°C durante 30 min para romper las partículas virales y liberar las moléculas de ADN vírico. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, las muestras de baculovirus se diluyeron con tampón de dilución QPCR y se ensayaron con el método QPCR con el cebador directo 5'- CCCTCTGTGTA CTTGGCTCTAACG-3' (SEQ ID NO: 25) y el cebador inverso 5'- CGGTGAAACGCAAAGTCGAGCACCG-3' (SEQ ID NO: 26). Los títulos QPCR (copias del genoma/ml) se convirtieron en unidades formadoras de placa (pfu/ml) dividiendo con un factor de 20 (determinado empíricamente). Los títulos de baculovirus se muestran en la Tabla 1 siguiente, y la FIG. 12. Los resultados demuestran que se pueden generar baculovirus recombinantes que portan el gen DT-A que comprende el intrón de la hormona del crecimiento humano o el gen de Barnasa que comprende el intrón de antígeno T grande de SV40 para altos títulos, mientras que no se generó baculovirus recombinante a partir de bacmidos que portaban el gen DT-A o el gen de Barnasa sin una inserción del intrón. La generación y amplificación satisfactoria de baculovirus recombinantes que

contienen ORFs de toxina interrumpida por intrones indican que los intrones de mamíferos no se empalmaban en células de insectos.

5 Aunque no es un promotor de insecto, el promotor CMV tiene cierta actividad en células de insecto y es capaz de conducir un nivel bajo de expresión de hemaglutinina (He, F, et al., BMC Microbiol 8:238, 2008). Este bajo nivel de actividad promotora podría impulsar alguna expresión basal de DT-A, que mataría a cualquier célula de insecto que expresara la toxina. Ningún baculovirus recombinante podría ser producido a partir de ADN de bacmido que contiene el ORF de DT-A flanqueado con sitios loxP en una dirección antisentido al promotor de CMV, indicando que incluso la secuencia similar a TATA del promotor críptico del sitio loxP fue capaz de conducir cantidades traza de la expresión de DT-A que pueden matar a las células del insecto. Se observó el mismo fenómeno para el gen de barnasa, en el que los baculovirus recombinantes podrían ser generados solamente cuando su ORF fuera interrumpido por el intrón del antígeno SV40LT (FIG. 12C), lo que indica que barnasa es también tóxico para las células de insectos. Por otra parte, la generación exitosa de baculovirus recombinantes que albergan los genes de DT-A interrumpidos con intrón o de barnasa-GFP indica que los intrones de antígeno de hGH y SV40LT no se empalmaron en las células de insecto y la expresión de DT-A y barnasa-GFP se suprimía totalmente por esta interrupción del intrón.

Tabla 1. Los títulos de baculovirus recombinantes determinados por el método QPCR

Muestra	Descripción	Título (pfu/ml)
1	Control negativo, sobrenadante recogido del cultivo de células Sf9	1,3E+5
2	Bac-CMV-DTA, sobrenadante recogido 4 días después de la transfección	1.9E+5
3	Bac-CMVtetO-DTA-p10-TetR, sobrenadante recogido 4 días después de la transfección	8,3E+4
4	Bac-CMV-inDTA, sobrenadante recogido 4 días después de la transfección	9,5E+7
5	Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR, sobrenadante recogido 4 días después de la transfección	1,1E+8
6	Bac-CMV-inDTA, sobrenadante recogido después de una ronda de amplificación	1,2E+9
7	Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR, el sobrenadante se recogió después de una ronda de amplificación	9.7E+8
8	Bac-CMV-GFP (control), una ronda de amplificación	1.2E+9

Ejemplo 10

20 Este ejemplo ilustra el empalme de los intrones de los ORF de la toxina llevados por baculovirus recombinantes y la expresión de las proteínas de la toxina en células de mamíferos.

Con el fin de determinar si los intrones insertados en los ORF de la toxina podrían ser empalmados en células de mamíferos, baculovirus recombinantes que albergan los genes de DT-A intrón-interrumpido o barnasa se utilizaron para transducir en células HEK293. La morfología celular fue examinada y fotografiada 2 días después de la transducción.

25 En estos experimentos, se cultivaron células HEK 293 humanas en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (invitrogen, Carlsbad, CA) hasta confluencia. Las células fueron luego tripsinizadas y plaqueadas, en placas de 24 pocillos a 1,5e+5 célula/pocillo en el medio que contenía suero. Después de crecer durante la noche, el medio se retiró y se reemplazó con 250 µl de medio más 250 µl de baculovirus recombinante o 400 µl de medio más 100 µl de baculovirus recombinante. Un control negativo se realizó de la misma forma excepto que se usaron medios de cultivo de células Sf9.

30 La figura 13 presenta mapas genéticos y transcripcionales de baculovirus recombinantes representativos que portan un gen DT-A que comprende un intrón de la hormona del crecimiento humano, y un gen de barnasa que comprende un intrón del T-antígeno grande de SV40 y fusionado en marco con GFP. Tras la introducción en una célula de mamífero, se forma ARNm de DT-A maduro o ARNm de Bar-GFP a través del empalme del intrón y se traduce en proteína DT-A o Barnasa completamente funcional para matar la célula. Los números por encima de los mapas genéticos basados en las secuencias de codificación de DT-A y Barnase indican las posiciones de nucleótidos donde los intrones fueron insertados.

En estos experimentos, después de la introducción de un gen de barnasa que comprende un intrón en células de mamífero y la incubación durante otros 3 días, las células se examinaron bajo el microscopio y se registró CPE de

las células. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 14. La figura 14 ilustra los efectos mortales en células de mamífero (riñón embrionario humano HBK293) por transducción con baculovirus recombinantes que albergaban genes tóxicos durante 48 horas. A, B y C: campos representativos fotografiados con una lente objetivo 20x bajo iluminación de campo brillante usando una fuente de luz de tungsteno. D: Mismo campo que en C, obtenido una imagen por iluminación de fluorescencia usando una combinación de filtros con longitudes de onda de excitación y transmisión adecuadas para la fluorescencia GFP. A, Bac-CMV-inDTA (hGH); B, Bac-CMV-inBar (SV40)-GFP; C, Bac-CMV-GFP; D, la misma imagen que C que muestra la expresión de GFP. Los resultados en la FIG. 14 muestran que los baculovirus recombinantes que portaban genes de DT-A o de barnasa interrumpidos por intrones causaban la fragmentación de células HEK293, un signo típico de células sometidas a apoptosis, mientras que los baculovirus recombinantes que portaban el gen GFP no causaron esta fragmentación. En las células 293 transducidas con baculovirus que portaban Bar-GFP, se observó una expresión de GFP muy débil (datos no mostrados). Ya sea transducido por 100 µl o 250 µl de los baculovirus recombinantes que portaban el gen DT-A que comprendía el intrón de hGH o un gen de barnasa que comprendía un intrón del antígeno T grande de SV40, la mayoría de las células HEK 293 se redondearon y se separaron sueltamente, mostrando una fuerte CPE, mientras que todas las células HEK 293 transducidas con baculovirus recombinante que portaban GFP no mostraron ningún signo de CPE y estuvieron creciendo tanto como el control negativo. Estos resultados demuestran que en células HEK293 de mamífero, los intrones (intrón de hGH o intrón de T-antígeno grande de SV40) se dividieron y se formaron ARNm de DT-A o ARNm de barnasa-GFP y se tradujeron, de manera que las células huésped expresaron las proteínas de fusión DT-A o Barnasa-GFP, destruyendo así las células HEK293 huésped.

Tabla 2. Expresión de DT-A en células HEK293 humanas a través de la transducción de baculovirus

Muestra	Descripción	Volumen añadido (µl)	CPE observada
1	medio ESF921	100	-
2	medio ESF921	250	-
3	Baculovirus Bac-CMV-GFP	100	-
4	Baculovirus Bac-CMV-GFP	250	-
5	Baculovirus Bac-CMV-inDTA	100	++++
6	Baculovirus Bac-CMV-inDTA	250	++++
7	Baculovirus Bac-CMVtetO-inDTA-10-TetR	100	++++
8	Baculovirus Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR	250	++++

Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra la producción de vectores de AAV que albergan los ORF de toxina en células de insecto.

En estos experimentos, la producción de vectores de AAV que llevan el gen DT-A que comprende el intrón de la hormona del crecimiento humano o el gen de Barnasa que comprende el intrón del antígeno T grande del SV40, y fusionado en marco con el gen GFP en células de insecto (figura 15, figura 16). La figura 15 ilustra un método para producir vectores de AAV que llevan un gen DT-A que comprende el intrón de la hormona del crecimiento humano o el gen de la barnasa que comprende el intrón del T-antígeno grande de SV40 y fusionado en marco con el gen GFP en células de insecto que llevan un transgén AAV integrado de forma estable. La figura 16 ilustra mapas genéticos y transcripcionales de vectores AAV representativos que portan un gen DT-A que comprende un intrón de la hormona del crecimiento humano o un gen de Barnasa que comprende un intrón de antígeno T grande de SV40 y fusionado en marco con el gen GFP. Los números por encima de los mapas genéticos basados en la secuencia codificante de DT-A y la secuencia de codificación de Barnasa indican las posiciones de nucleótidos en las que se insertaron los intrones.

La producción del vector AAV se realizó en células Sf9 con los baculovirus recombinantes que albergaban los ORF de toxina interrumpida por intrón. Se utilizaron los baculovirus recombinantes para co-infectar células Sf9 con un segundo baculovirus recombinante que expresaba los genes Rep y Cap de AAV durante 3 días y se purificaron los vectores de AAV y se titularon. Los resultados en las Tablas 3 y 4 muestran que se produjeron rendimientos muy similares de vectores de AAV que portaban los ORF de la toxina interrumpida por intrón, en comparación con los vectores de AAV que portaban sólo el gen GFP.

En estos experimentos, las células Sf9 se cultivaron, hasta aproximadamente 1E+9 células/ml de medio ESF921 (Expression Systems, CA) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se diluyeron 1:1 después con medios frescos y se infectaron con 10 moi de Bac-RepCap9 y 5moi de Bac-

CMV-inDTA o Bac-CMVtetOinDTA-p10-TetR durante 3 días. Los gránulos de células se cosecharon por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y se lisaron en tampón de lisis de Sf9 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 2mM, 1% de sarkosilo, 1% de tritón X-100, 125 unidades/ml de benzonasa). El ADN celular se digirió por incubación a 37°C durante 60 min. Los lisados celulares se eliminaron por centrifugación a 8000 rpm durante 30 min y se cargaron en tubos de centrífuga SW28 que contenían 5 ml de 1,55 g/cc, y 10 ml de 1,32 g/cc de soluciones de CsCl. Después de la centrifugación a 28.000 rpm durante aproximadamente 16 horas a 15°C, se recogió la fracción que contenía rAAV perforando el tubo de centrífuga usando una aguja de jeringa y se sometió a una segunda ronda de ultracentrifugación de CsCl. La fracción que contenía rAAV se recogió de nuevo perforando el tubo de centrifugación usando una aguja de jeringa y se dializó en tampón PBS para eliminar las sales y los detergentes. Los títulos vectoriales se determinaron por ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real de acuerdo con el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados, presentados en la Tabla 3 y en la Tabla 4, muestran que se pueden producir altos títulos de vectores de AAV portadores del gen DT-A tóxico en células Sf9 usando el baculovirus recombinante que porta el gen DT-A que comprende un intrón con o sin supresión de tet, lo que indica que la inserción de un intrón es necesaria para la producción del vector AAV.

15 Tabla 3. Producción de vectores de AAV que llevan el gen DT-A

Muestra	Descripción	Rendimiento total (vg/litro cultivo)	Rendimiento relativo (%)
1	AAV9 - CMV - GFP (vector de control)	6,63E+14	100
2	AAV9 - CMV - inDTA (hGH)	7,53E+14	114
3	AAV9 - CMVtetO - inDTA	5.32E+14	80

Tabla 4. Producción de vectores AAV9 y AAV2 portadores del gen de DT-A que comprende el intrón de la hormona del crecimiento humano o el gen de Barnasa que comprende el intrón del T-antígeno grande de SV40

Muestra	Descripción	Rendimiento total (vg/litro cultivo)
1	AAV9-CMV-GFP (vector de control)	6,63 E+14
2	AAV9-CMV-inDTA	7,53 E+14
3	AAV2-CMV-GFP (hGH) (vector de control)	1,15 E+15
4	AAV2-CMV-inDTA (hGH)	1,15E+15
5	AAV2-CMV-inBar(SV40)-GFP	6,58E+14
6	AAV2-hTERT-inDTA(hGH)	9,30E+14

20 Estos resultados confirman que los intrones de mamíferos no eran funcionales en células de insecto, lo que dio como resultado la producción exitosa de vectores AAV que llevan los ORFs de toxina interrumpidos por intrón. Además, tanto los vectores AAV2 como AAV9 fueron producidos con rendimientos similares, lo que indica que esta producción del vector de AA V fue universal y no específica del serotipo.

Ejemplo 12

25 Este ejemplo ilustra la muerte no específica por vectores AAV que contienen DT-A bajo control del promotor CMV.

Puesto que los baculovirus recombinantes que albergan los genes de la toxina interrumpida por intrón fueron capaces de matar las células mamíferas mediante la transducción, los inventores examinaron si los vectores AAV que albergan los genes de la toxina también podrían ejercer el efecto de matanza en las células HEK293. Para probar esta posibilidad, las células HEK293 se sembraron en placas de 24 pocillos durante la noche y se transdujeron con los vectores AAV2 y AAV9. Los resultados muestran que tras la transducción durante 48 horas, las células HEK293 transducidas con vectores AAV2 o AAV9 portadores de DTA o el gen de barnasa mostraron una morfología celular fragmentada, un fenómeno típico de células sometidas a apoptosis. En contraste, no hubo ningún signo de apoptosis en las células transducidas con AAV2 o 9 vectores portadores del gen GFP (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los intrones fueron empalmados de las secuencias codificantes de la toxina para formar los ARNm maduros y los ARNm se tradujeron en proteínas de toxina que mataron las células HEK293. Puesto que AAV2 exhibe una eficacia de transducción in vitro mucho mejor que AAV9, se eligió para posteriores experimentos in vitro. Se realizó un ensayo de proliferación celular sobre células HEK293 para confirmar adicionalmente el efecto de eliminación de células y los resultados se muestran en la FIG. 17a. Las células HEK293 transducidas con AAV2-CMV-inDTA (hGH) se inhibieron sin signos de crecimiento, mientras que las células

transducidas con AAV2-CMV-GFP crecieron, así como las no tratadas. Además, se realizó un ensayo de viabilidad celular para verificar la citotoxicidad de AAV2-CMV-inDTA (hGH) en células Hep3B. Los resultados se muestran en la fig. 17b. Se observó una buena curva dosis-respuesta. Con la disminución de los vectores AAV2 que llevaban DTA, la viabilidad celular aumentó, mientras que esencialmente no hubo cambios en la viabilidad celular para las células tratadas con AAV2-CMV-GFP.

La figura 17 ilustra el efecto de la muerte de AAV2-CMV-inDTA (hGH) en células de mamífero. (a) Proliferación de células 293 transducidas con vectores AAV2. Las células (1,5E+5 células/pocillo) se sembraron en una placa de 24 pocillos durante la noche y se transdujeron con AAV2-CMV-inDTA (hGH) o AAV2-CMV-GFP. Los números de células se contaron en diferentes puntos de tiempo. Cuando alcanzaron la confluencia, las células se dividieron en áreas de cultivo más grandes y se dejaron crecer. (b) La viabilidad de las células Hep3B transducidas con vectores AAV2. Se sembraron células Hep3B (3.2E+4 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos durante la noche y se transdujeron con una dilución en serie de 4 veces de AAV2-CMV-GFP o AAV2-CMV-inDTA (hGH). La viabilidad celular se determinó con el Kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo (Promega).

La figura 18 ilustra los efectos de muerte en células HEK293 humanas por transducción con vectores de AAV que albergan genes tóxicos durante 48 horas. Las imágenes fueron fotografiadas con una lente 20x bajo iluminación de tungsteno (A, B y C) o iluminación fluorescente (D). A, AAV2-CMV-inDTA (hGH); B, AAV2-CMV-inBar(SV40)-GFP; C, AAV2-CMV-GFP; D, la misma imagen que C que muestra la expresión de GFP.

En estos experimentos, las células HEK 293 que albergan un AAV con CMV-inDTA (hGH) o CMV-inBar(SV40)-GFP se redondearon y se despegaron sueltamente, mostrando un CPE pesado. Sin embargo, todas las células HEK.293 transducidas con baculovirus recombinante portador de GFP no mostraron ningún signo de CPE, y estuvieron creciendo, así como el control negativo. Estos resultados demuestran que en estas células de mamífero, los intrones (intrón de hGH o intrón de antígeno T de SV40 grande) se cortaron y se formaron y tradujeron el ARNm de DT-A o el ARNm de barnasa-GFP y las células huésped expresaron DT-A funcional o Barnasa-GFP-proteínas de fusión, matando así las células HEK293 huésped.

Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra la producción de un vector de AAV que comprende el gen DT-A con el marco de lectura interrumpido con un intrón, bajo las secuencias del potenciador de AFP control y del promotor.

En estos experimentos, las secuencias del potenciador de AFP humano y del promotor fueron ambas amplificadas por PCR a partir de ADN genómico purificado de células de riñón embrionario humano HEK293. El potenciador de AFP se amplificó con el cebador directo 5'-*CCGCACGCGTCTTAGAAATATGGGGGTAGGGGTGG-3'* (SEQ ID NO: 27) (el tipo de letra en cursiva indica el sitio de restricción para MluI) y el cebador inverso 5'-*CTCAAACCTCTAGTGGCCTGGATAAAGCTGAGTG-3'* (SEQ ID NO: 28). Se amplificó el promotor AFP con el cebador directo 5'-*CTTTATCCAGGCCACTAGAGTTTGAGGAGAATATTTG-3'* (SEQ ID NO: 29)

y el cebador inverso 5'-*ACTTACCTGACCGGTTGCTAGTTATTTTGTTAT-3'* (SEQ ID NO: 30). Los dos fragmentos PCR se unieron juntos por una segunda amplificación por PCR con el cebador directo para el potenciador de AFP y el cebador inverso para el promotor AFP como se describe anteriormente. El fragmento de la PCR final se digirió con MluI y Agel y se ligó a los sitios MluI y Agel de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar el promotor CMV y crear pFB-hAFP-inDTA (hGH).

AAV2-hAFP-inDTA (hGH) se produjo en células de insecto por los métodos descritos en la presente memoria a un título de 1,69E+15.

Ejemplo 14

Este ejemplo ilustra la producción de un vector AAV que comprende el gen DT-A con el marco de lectura interrumpido con un intrón, bajo el control de la secuencia del promotor survivina (SURV) humano.

En estos experimentos, la secuencia promotora de survivina humana (SURV) fue amplificada por PCR con ADN genómico purificado a partir de células HEK293 de riñón embrionario humano con el cebador directo 5'-*GGGGACTAGTCTGGCCATAGAACCAGAGAAGTGA-3'* (SEQ ID NO: 31) (el tipo de letra en cursiva indica el sitio de restricción para SpeI) y el cebador inverso 5'-*TTTTACCGGTCCACCTCTGCCAACGGGTCCCGCG-3'* (SEQ ID NO: 32) (la letra cursiva indica el sitio de restricción para Agel). El fragmento de PCR se digirió con SpeI y Agel y se ligó a los sitios SpeI y Agel de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar el promotor de CMV y crear pFB-hSURV-inDTA (hGH).

AAV2-hSURV-inDTA (hGH) se produjo en células de insectos mediante los métodos descritos en la presente memoria descriptiva a un título de 1,41E+15 vg/litro cultivo.

Ejemplo 15

Este ejemplo ilustra la producción de un vector de AAV que comprende un gen de DT-A con el marco de lectura interrumpido con un intrón, bajo el control de la secuencia del promotor de ciclooxigenasa-2 (COX2) humano.

5 En estos experimentos, el promotor de ciclooxigenasa-2 humano (COX2) se amplificó por PCR con ADN genómico purificado a partir de células HEK293 de riñón embrionario humano con el cebador directo
 5'-*GCCCACTAGTTGAGGTACCTGGTGTAGTTT-3'* (SEQ ID NO: 33) (el tipo de letra en cursiva indica el
 sitio de restricción para SpeI) y el cebador inverso 5'-
 10 *ATATACCGGTCAGCGGCGGGCAGGGCGCGG-3'* (la fuente en cursiva indica el sitio de restricción para AgeI). El fragmento de la PCR se digirió con SpeI y AgeI y se ligó a los sitios SpeI y AgeI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar el promotor de CMV y crear pFB-hCOX2-inDTA (hGH).

AAV2-hCOX2-inDTA (hGH) se produjo en células de insecto por los métodos descritos en la presente memoria descriptiva a un título de 2,22E+13 vg/litro cultivo.

EJEMPLO 16

15 Este ejemplo ilustra la producción de un vector de AAV que comprende el gen de DT-A con el marco de lectura interrumpido con un intrón, bajo el control de la secuencia promotora del receptor del tipo A de colecistoquinina humana (CCKAR) (Takata, Y., et al., J Gastroenterol. 37:815 - 820, 2002).

En estos experimentos, la secuencia del promotor del receptor de tipo-A de la colecistoquinina humana (CCKA.R) se amplificó por PCR con ADN genómico purificado a partir de cepas de HEK293 de riñón embrionario humano con el
 20 cebador directo 5'-*GCCCACTAGTACCCAGGTACCTATGTTCAAAAAG-3'* (SEQ ID NO: 35) (el tipo de letra en cursiva indica el sitio de restricción para SpeI) y el cebador inverso 5'-
GCGCACCGGTTTGCTGCTGCTTCCACCAAG-3' (SEQ ID NO: 36) (el tipo de letra cursiva indica el sitio de restricción para AgeI). El fragmento de PCR se digirió con SpeI y AgeI y se ligó a los sitios SpeI y AgeI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar el promotor CMV y crear pFB-hCCKAR-inDTA (hGH).

25 Se produjo AAV2-hCCKAR-inDTA (hGH) en células de insecto por los métodos descritos en la presente memoria a un título de 1,96E+14 vg/litro de cultivo.

Ejemplo 17

Este ejemplo ilustra la producción de un vector AAV que comprende el gen de DT-A con el marco de lectura interrumpido con un intrón, bajo el control de la secuencia promotora del gen CXCR4 humano (Caruz, M., et al., FEBS Letters, 426: 271-278, 1998).

30 En estos experimentos, la secuencia promotora CXCR4 humana se amplificó por PCR con ADN genómico purificado a partir de células HEK293 de riñón embrionario humano con el cebador directo 5'-
GCCCACTAGTTACCGACCACCCGCAAACAG-3' (SEQ ID NO: 37) (el tipo de formato en cursiva indica el sitio de restricción para SpeI) y el cebador inverso 5'-
 35 *GCGCACCGGTGTAACCGCTGGTCTCCAGA-3'* (SEQ ID NO: 38) (el tipo de formato en letra cursiva indica el sitio de restricción para AgeI). El fragmento de la PCR fue digerido con SpeI y AgeI y ligado a los sitios SpeI y AgeI de pFB-CMV-inDTA (hGH) para reemplazar el promotor CMV y crear pFB-hCXCR4-inDTA (hGH).

Se produjo AAV2-hCXCR4-inDTA (hGH) en células de insecto por los métodos descritos en la presente memoria descriptiva a un título de 1,81E+15 vg/litro de cultivo.

Ejemplo 18

40 Este ejemplo ilustra la muerte específica de tumor mediante vectores AAV que llevan DT-A bajo el control de promotores específicos de tumor.

En estos experimentos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se transdujeron con vectores AAV2 que llevaban DT-A bajo el control de diversos promotores específicos de tumor como se describió anteriormente. Los
 45 resultados indican que las células de neuroblastoma BE(2)-M17 fueron destruidas por DT-A bajo el control de hSURV o hCXCR4 pero no del promotor de hAFP, mientras que las células Hep3B y HepG2 de carcinoma hepatocelular fueron destruidas por DT-A bajo el control de los promotores AFP, SURV o CXC4. La línea de células de pulmón humano normal WI38 no se vio afectada por el DT-A bajo el control del promotor AFP, SURV o hTERT. La figura 19 ilustra resultados representativos de la muerte celular por AAV2-hSURV-inDTA (hGH). En estos
 50 experimentos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se transdujeron con AAV2-CMV-GFP (a), (c), (e) y (g) o AAV2-hSURV-inDTA (hGH) (b), (d), (f), y (h). Las fotografías se tomaron 3 días después de la transducción, (a) y (b), WI38; (c) y (d), HepG2; (e) y (f), Hep3B, y (g) y (h), BE(2)-M17.

Las tres líneas celulares tumorales también se ensayaron con DTA bajo el control de los promotores COX2, CCKAR y hTERT humanos, pero no se observó ningún efecto significativo de muerte celular. Con el fin de caracterizar más los efectos de la muerte celular, los ensayos de viabilidad celular se realizaron con DTA bajo el control de los promotores AFP, SURV, y CXCR4. La Figura 20 ilustra el ensayo de viabilidad celular de células tumorales por vectores AAV2 que llevan DT-A bajo el control de diversos promotores específicos de tumores. En estos experimentos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se transdujeron con vectores AAV2 en diluciones en serie de 4 veces durante 4 días y se ensayó la viabilidad celular con el kit de ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter Glo. (a) células HepG2, (b) células Hep3B, y (c) células BE(2)-M17. Los tres promotores específicos de tumores muestran actividad de transcripción en células HepG2. Entre los cuales el promotor CXCR4 exhibió la actividad más alta que conducía a que DTA matara a células HepG2 cuando se usaban títulos altos de vectores AAV2 (Figura 20a). Para las células Hep3B, el DTA bajo el control del promotor SURV mostró el efecto de muerte más fuerte, mientras que AFP y CXCR4 mostraron actividades de muerte parcial (Figura 20b). Curiosamente, el promotor AFP no estaba activo en células BE(2)-M17, mientras que DTA bajo el control de ambos promotores CXCR4 y SURV mostraba un fuerte efecto de muerte (Figura 20c).

Cualquier discusión de las referencias citadas en la presente memoria se limita a resumir meramente las aseveraciones hechas por sus autores y no se admite que la referencia o parte de la misma sea una técnica anterior relevante. El solicitante se reserva el derecho de impugnar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

Listado de secuencias

<110> Chen, Haifeng

<120> VECTORES QUE ALBERGAN GENES TÓXICOS, MÉTODOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 1007-0025

<150> US 61/568595
<151> 08-12-2011

<150> US 61/618689
<151> 31-03-2012

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 144
<212> ADN
<213> Virus simio 40

<400> 1
catggcccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia 60
atctcaciaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca 120
atgtatctta tcatgtctgg atct 144

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus Corynebacterium diphtheriae

<400> 2
gattatgatc actagtcgag 20

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DT-A con secuencia de intrón de la hormona del crecimiento humano

<400> 3

5 gggcgcttac cttttgaat ggaatctaca 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 10 <400> 4
 attcaaaaag gtaagcgccc ctaaaatccc 30
 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 5
 tttgtatac ctggggagaa accagagggc 30
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> amplificación por PCR de DT-A e intrón de HGH solapante

 <400> 6
 gattatgac actagtcgag 20

 30 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> amplificación por PCR de DT-A e intrón de HGH solapante

 <400> 7
 tttgtatac ctggggagaa accagagggc 30

 40 <210> 8
 <211> 1683
 <212> ADN
 <213> Virus Corynebacterium diphtheriae

 45 <400> 8

ES 2 623 259 T3

gtgagcagaa aactgtttgc gtcaatctta atagggggc tactggggat aggggcccc 60
 ccttcagccc atgcaggcgc tgatgatggt gttgattctt ctaaactctt tgtgatggaa 120
 aacttttctt cgtaccacgg gactaaacct ggttatgtag attccattca aaaaggtata 180
 caaaagccaa aatctggtac acaaggaat tatgacgatg attggaaagg gttttatagt 240
 accgacaata aatacgacgc tgggggatac tctgtagata atgaaaacc gctctctgga 300
 aaagctggag gcgtggtcaa agtgacgtat ccaggactga cgaaggttct cgcactaaaa 360
 gtggataatg ccgaaactat taagaaagag ttaggtttaa gtctcactga accgttgatg 420
 gagcaagtcg gaacggaaga gtttatcaaa aggttcggtg atggtgcttc gcgtgtagtg 480
 ctccagccttc ccttcgctga ggggagttct agcgttgaat atattaataa ctgggaacag 540
 gcgaaagcgt taagcgtaga acttgagatt aattttgaaa cccgtggaaa acgtggccaa 600
 gatgcatggt atgagtatat ggctcaagcc tgtgacggaa atcgtgtcag gcgatcagta 660
 ggtagctcat tgtcatgcat aaatcttgat tgggatgtca taagggataa aactaagaca 720
 aagatagagt ctttgaaaga gcatggccct atcaaaaata aaatgagcga aagtcccaat 780
 aaaacagtat ctgaggaaaa agctaaacaa tacctagaag aatttcatca aacggcatta 840
 gagcatcctg aattgtcaga acttaaaacc gttactggga ccaatcctgt attcgtctgg 900
 gctaactatg cggcgtgggc agtaaacggt gcgcaagtta tcgatagcga aacagctgat 960
 aatttgaaa agacaactgc tgctctttcg atacttcctg gtatcggtag cgtaatgggc 1020
 attgcagacg gtgccgttca ccacaataca gaagagatag tggcacaatc aatagcttta 1080
 tcgtctttaa tggttgctca agctattcca ttgtaggag agctagttga tattggtttc 1140
 gctgcatata atttttaga gagtattatc aatttatttc aagtagttca taattcgtat 1200
 aatcgtcccg cgtattctcc ggggcataaa acgcaaccat ttcttcatga cgggatgct 1260
 gtcagttgga aactggttga agattcgata atccgaactg gttttcaagg ggagagtggg 1320
 cacgacataa aaattactgc tgaaaatacc ccgcttccaa tcgcggtgtg cctactaccg 1380
 actattcctg gaaagctgga cgtaataaag tccaagactc atatttccgt aaatggtcgg 1440
 aaaataagga tgcgttcgag agctatagac ggtgatgtaa ctttttgcg ccctaaatct 1500
 cctgtttatg ttgtaatgg tgtgcatgag aatcttcacg tggcatttca cagaagcagc 1560
 tcggagaaaa ttcattctaa tgaaatttcg tcggattcca taggcgttct tgggtaccag 1620
 aaaacagtat atcacaccaa ggtaattct aagctatcgc tattttttga aatcaaaagc 1680
 tga 1683

5 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia codificadora de barnasa amplificada de plásmido pF1A-T7

<400> 9
 cccgaattcg ccacatggc acaggtatc aac 33

15 <210> 10

ES 2 623 259 T3

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> secuencia codificadora de barnasa amplificada de plásmido pF1A-T7

<400> 10
tgctcacat tctgatttt gtaaaggtct 30

10 <210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia codificadora de GFP amplificada de plásmido pFB-GFP

<400> 11
20 caaaaatcag aatggtgagc aagggcgagg 30

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificadora de GFP amplificada de plásmido pFB-GFP

30 <400> 12
gggggtacc tcattactg tacagctcgt cc 32

<210> 13
<211> 33
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PCR a secuencia codificadora de barnasa fusionada con secuencia codificadora GFP

40 <400> 13
cccgaattcg ccacatggc acaggtatc aac 33

<210> 14
45 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> PCR a secuencia codificadora de barnasa fusionada con GFP

<400> 14
gggggtacc tcattactg tacagctcgt cc 32

55 <210> 15
<211> 832
<212> ADN
<213> Bacillus amyloliquefaciens

60 <400> 15

ES 2 623 259 T3

```

ctggaaaacg tcacattgct tccgcatatc gggtcagcaa cggctaaaat ccgcttgaat      60
atgttcacac aagccgctca aaacatgatt gacgccgat acggaagaac gccgaaaaac      120
cttactaagg aatttcaata agaagaaaaa tcccggttgg ttcagccggg gtttattttt      180
cgctagataa aaagtactat ttttaaattc tttctattcc tttctttcgt tgctgataca      240
atgaaaagga atcagcttca catgatgaaa atgggaggta ttgctttgaa aaaacgatta      300
tcgtggattt ccgtttgttt actggtgctt gtctccggcg cggggatgct gttttcaaca      360
gctgccaaaa cggaaacatc ttctcacaag gcacacacag aagcacaggt tatcaacacg      420
tttgacgggg ttgcggatta tcttcagaca tatcataagc tacctgataa ttacattaca      480
aatcagaag cacaagccct cggctgggtg gcatcaaaag ggaaccttgc agacgtcgct      540
ccggggaaaa gcatcggcgg agacatcttc tcaaacaggg aaggcaact cccgggcaaa      600
agcggacgaa catggcgtga agcggatatt aactatacat caggcttcag aaattcagac      660
cggattcttt actcaagcga ctggctgatt taaaaaaca cggaccatta tcagaccttt      720
acaaaaatca gataacgaaa aaaacggctt ccctcgggag gccgtttttt tcagctttac      780
ataaagtgtg taataaattt ttcttcaaac tctgatcggg caatttcact tt              832

```

5 <210> 16
 <211> 4733
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Gen GFP a partir de vector de clonación
 <400> 16

ES 2 623 259 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tattttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacotta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
attccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgta	600
ccggactcag atctogagct caagcttcca attctgcagt cgacggtagc gcgggcccgg	660
gatccaccgg tcgccacccat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc	720
atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc	780
gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg	840
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc	900
taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc	960
caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag	1020
ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac	1080
ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	1140
gccgacaagc agaagaacgg catcaagggtg aactcaaga tccgccacia catcgaggac	1200

ES 2 623 259 T3

ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg 1260
 ctgctgcccc acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag 1320
 aagcgcgatc acatggctct gctggagttc gtgaccgccc cgggatcac tctcgcatg 1380
 gacgagctgt acaagtaaag cggccgcgac tctagatcat aatcagccat accacatttg 1440
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 1500
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 1560
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 1620
 ccaaactcat caatgtatct taaggcgtaa attgtaagcg ttaatatttt gttaaaattc 1680
 gcgttaaatt tttgttaaatt cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc 1740
 ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag 1800
 agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc 1860
 gatggcccac tacgtgaacc atcacccata tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa 1920
 gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg 1980
 aacgtggcga gaaaggaag gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt 2040
 gtacgggtca cgctcgcgct aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc 2100
 gcgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa 2160
 atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 2220
 tgaaaaagga agagtcctga ggcggaagaa accagctgtg gaatgtgtgt cagttagggt 2280
 gtgaaagtcc cccaggtctc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 2340
 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc 2400
 atctcaatta gtcagcaacc atagtcctgc ccctaactcc gccatcccg cccctaactc 2460
 cggccagttc cggccattct cggcccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg 2520
 ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc 2580
 taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 2640
 gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 2700
 gcacaacaga caatcggtct ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc 2760
 ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca agacgaggca 2820
 gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc 2880
 actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 2940
 tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 3000
 acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 3060
 cgtactcgga tggaaagccg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 3120

ES 2 623 259 T3

ctcgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgagca tgcccgcgag cgaggatctc 3180
 gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 3240
 ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggtc 3300
 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 3360
 ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcata gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 3420
 tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 3480
 atttcgatcc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg 3540
 ccggctggat gatcctccag cgcggggata tcatgctgga gttcttcgcc caccctaggg 3600
 ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aaccgcgct atgacggcaa 3660
 taaaaagaca gaataaacg cacggtgttg ggtcgtttgt tcataaacgc ggggttcggt 3720
 cccagggtg gactctgtc gatacccac cgagaccca ttggggccaa tacgcccggc 3780
 tttcttcctt ttccccacc cccccccaa gttcgggtga aggcccaggg ctcgcagcca 3840
 acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct caggttactc atatatactt tagattgatt 3900
 taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga 3960
 ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca 4020
 aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactct ctgcttgcaa acaaaaaaac 4080
 caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 4140
 taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag 4200
 gccaccaatt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 4260
 cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 4320
 taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg 4380
 agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc 4440
 ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaaggc cagggtcggg acaggagagc 4500
 gcacgagggg gcttcacagg ggaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc 4560
 acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa 4620
 acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggcctttt ctggcctttt gctcacatgt 4680
 tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgcatg cat 4733

<210> 17
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia codificadora de barnasa con intrón de SV40LT

10

<400> 17
 ccccgatcc gccaccatgg cacaggtatt tgcttctcc taaa 45

15

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 623 259 T3

<220>
 <223> secuencia codificadora de barnasa con SV40LT

5 <400> 18
 tgttgataac ctaaaataca caaacaatta 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia codificadora de barnasa junto con la secuencia codificadora de GFP

15 <400> 19
 tgtatttag gttatcaaca cgttgacgg 30

<210> 20
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificadora de barnasa junto con la secuencia codificadora de GFP

25 <400> 20
 ggggggtacc tcattactg tacagctcgt cc 32

<210> 21
 30 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> secuencia codificadora de barnasa con GFP y CMV

<400> 21
 ccccgattc gccaccatgg cacaggtatt tgcttctcc ttaa 45

40 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia codificadora de barnasa con GFP y CMV

<400> 22
 50 ggggggtacc tcattactg tacagctcgt cc 32

<210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 23
 ggcacgcgt atcatcagct ttcaaagac 30

<210> 24
 60 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 65 cgcgaccggt cgctgcctga aactcgcgcc 30

<210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> gen gp64 baculovirus
 <400> 25
 10 ccctctgtgt acttgctct aacg 24
 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> gen gp64 baculovirus
 <400> 26
 20 cggtgaaacg caaagtcgag caccg 25
 <210> 27
 <211> 35
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 ccgcacgcgt ctagaaata tggggtagg ggtgg 35
 30 <210> 28
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 28
 ctcaaactct agtggcctgg ataaagctga gtg 33
 <210> 29
 <211> 37
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 45 cttatccag gccactagag tttgaggaga atatttg 37
 <210> 30
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 30
 acttacctga ccggttgcta gttatttgt tat 33
 <210> 31
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 31
 60 ggggactagt ctggccatag aaccagagaa gtga 34
 <210> 32
 <211> 34
 <212> ADN
 65 <213> Homo sapiens

<400> 32
 tttaccggt ccacctctgc caacgggtcc cgcg 34

5 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 33
 gccactagt tgaggtagct ggttagttt 30

15 <210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 34
 atataccggt cagcggcggg cagggcgagg 30

25 <210> 35
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 35
 gccactagt acccaggtac ctatgtcaa aag 33

35 <210> 36
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 36
 gcgcaccggt ttgctgctg cttccacca ag 32

45 <210> 37
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 37
 gccactagt taccgaccac ccgcaaacag 30

55 <210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 38
 gcgcaccggt gtaaccgctg gttctccaga 30

<210> 39
 <211> 844
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificadora de DT-A que comprende el intrón de hGH

60 <400> 39

ES 2 623 259 T3

atgggcgctg atgatgttgt tgattcttct aaatcttttg tgatggaaaa cttttcttctg 60
 taccacggga ctaaacctgg ttatgtagat tccattcaaa aaggtaagcg cccctaaaat 120
 ccctttggca caatgtgtcc tgaggggaga ggcagcgacc tgtagatggg acggggggcac 180
 taaccctcag ggtttggggt tctgaatgtg agtategcca tgtaagcca gtatttgccc 240
 aatctcagaa agctoctggc tocctggagg atggagagag aaaaacaaac agctcctgga 300
 gcagggagag tgctggcctc ttgctctccg gctccctctg ttgcctctg gtttctcccc 360
 aggtatacaa aagccaaaat ctggtacaca aggaaattat gacgatgatt ggaaagggtt 420
 ttatagtacc gacaataaat acgacgctgc gggatactct gtagataatg aaaaccgct 480
 ctctggaaaa gctggaggcg tggcacaagt gacgtatcca ggactgacga aggttctcgc 540
 actaaaagtg gataatgccg aaactattaa gaaagagtta ggtttaagtc tcaactgaacc 600
 gttgatggag caagtcggaa cggagagtt tatcaaaagg ttcgggtgatg gtgcttcgcg 660
 tgtagtgtc agccttccct tcgctgaggg gagttctagc gttgaatata ttaataactg 720
 ggaacaggcg aaagcgtaa gcgtagaact tgagattaat tttgaaacct gtggaaaacg 780
 tggccaagat gcgatgtatg agtatatggc tcaagcctgt gcaggaaatc gtgtcaggcg 840
 atga 844

5 <210> 40
 <211> 694
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificadora de DT-A que comprende el intrón antígeno de SV40LT

<400> 40
 atggcacagg tatttgcttc ttccttaaat cctgggtgtg atgcaatgta ctgcaaacia 60
 tggcctgagt gtgcaaagaa aatgtctgct aactgcatat gcttgctgtg cttactgagg 120
 atgaagcatg aaaatagaaa attatacagg aaagatccac ttgtgtgggt tgattgctac 180
 tgcttcgatt gctttagaat gtggtttggc cttgatcttt gtgaaggaa cttacttctg 240
 tgggtgtgaca taattggaca aactacctac agagatttaa agctctaagg taaatataaa 300
 atttttaagt gtataatgtg ttaaactact gattctaatt gtttgtgtat tttaggttat 360
 caacacgttt gacgggggtg cggattatct tcagacatat cataagctac ctgataatta 420
 cattacaaaa tcagaagcac aagccctcgg ctgggtggca tcaaaaggga accttgcaga 480
 cgtcgtccg gggaaaagca tcggcggaga catcttctca aacagggag gcaaactcca 540
 gggcaaaagc ggacgaacat ggcgtgaagc ggatattaac tatacatcag gcttcagaaa 600
 ttcagaccgg attctttact caagcgactg gctgatttac aaaacaacg accattatca 660
 gacctttaca aaaatcagaa tgggtgagcaa gggc 694

15 <210> 41
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de GFP con secuencia codificadora de DT-A que comprende el intrón antígeno de SV40LT

<400> 41
gagctgtaca agtaa 15

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende:
 - una secuencia que codifica un polipéptido tóxico; y
 - un intrón que interrumpe la secuencia, por lo que el intrón se empalma en células de mamífero pero no en células de insecto para formar un ARNm que se traduce para formar niveles tóxicos de células del polipéptido tóxico en células de mamífero pero no en células de insecto.
2. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido tóxico se selecciona del grupo que consiste en toxina diftérica (DT-A), barnasa, ricina, abrina y exotoxina de Pseudomonas.
3. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido tóxico se selecciona del grupo que consiste en una toxina diftérica (DT-A) y un polipéptido de barnasa.
4. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos un elemento de expresión unido operativamente a la secuencia.
5. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el elemento de expresión se selecciona del grupo que consiste en un promotor CMV, un promotor AFP, un potenciador AFP, un promotor hSURV, un promotor CXCR4, un promotor hTERT, un promotor COX2, y un promotor CCKAR.
6. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el elemento de expresión se selecciona del grupo que consiste en un promotor hSURV y un promotor CXCR4.
7. Un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón de la hormona del crecimiento humano y un intrón del antígeno T grande de SV40.
8. Un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el ácido nucleico comprende, en 5' a 3', un primer ITR, un promotor, una primera porción de una secuencia que codifica un polipéptido tóxico, un intrón, una segunda porción de una secuencia que codifica un polipéptido tóxico, una señal de poliadenilación y un segundo ITR.
9. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el primer ITR es un ITR de AAV.
10. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el segundo ITR es un ITR de AAV.
11. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor CMV, un promotor hSURV, un promotor hCXCR4 y un promotor hAFP.
12. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la secuencia que codifica el polipéptido tóxico codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en DT-A y Barnasa.
13. Un vector viral que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el vector se selecciona del grupo que consiste en un baculovirus, un retrovirus, un adenovirus y un virus adeno-asociado (AAV).
14. Un vector viral de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el vector se selecciona del grupo que consiste en AAV2 y AAV9.
15. Un cultivo celular que comprende:
 - una pluralidad de células de insecto que comprenden el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6; y
 - un medio de cultivo.
16. Un cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho medio de cultivo celular comprende más de 10^9 genomas de AAV/ml.

FIG. 1

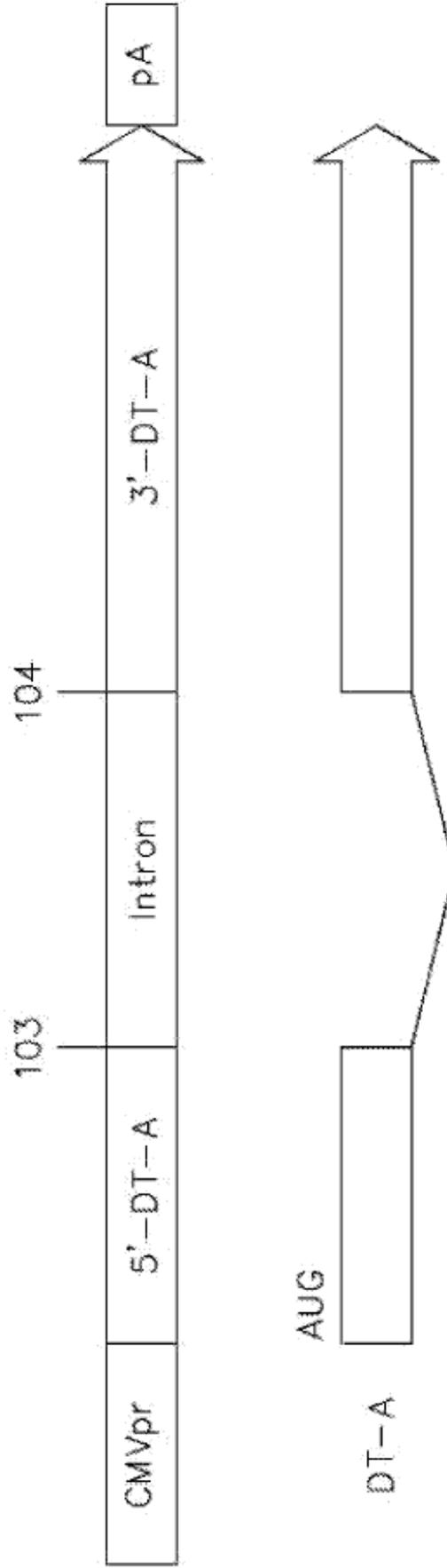


FIG. 2

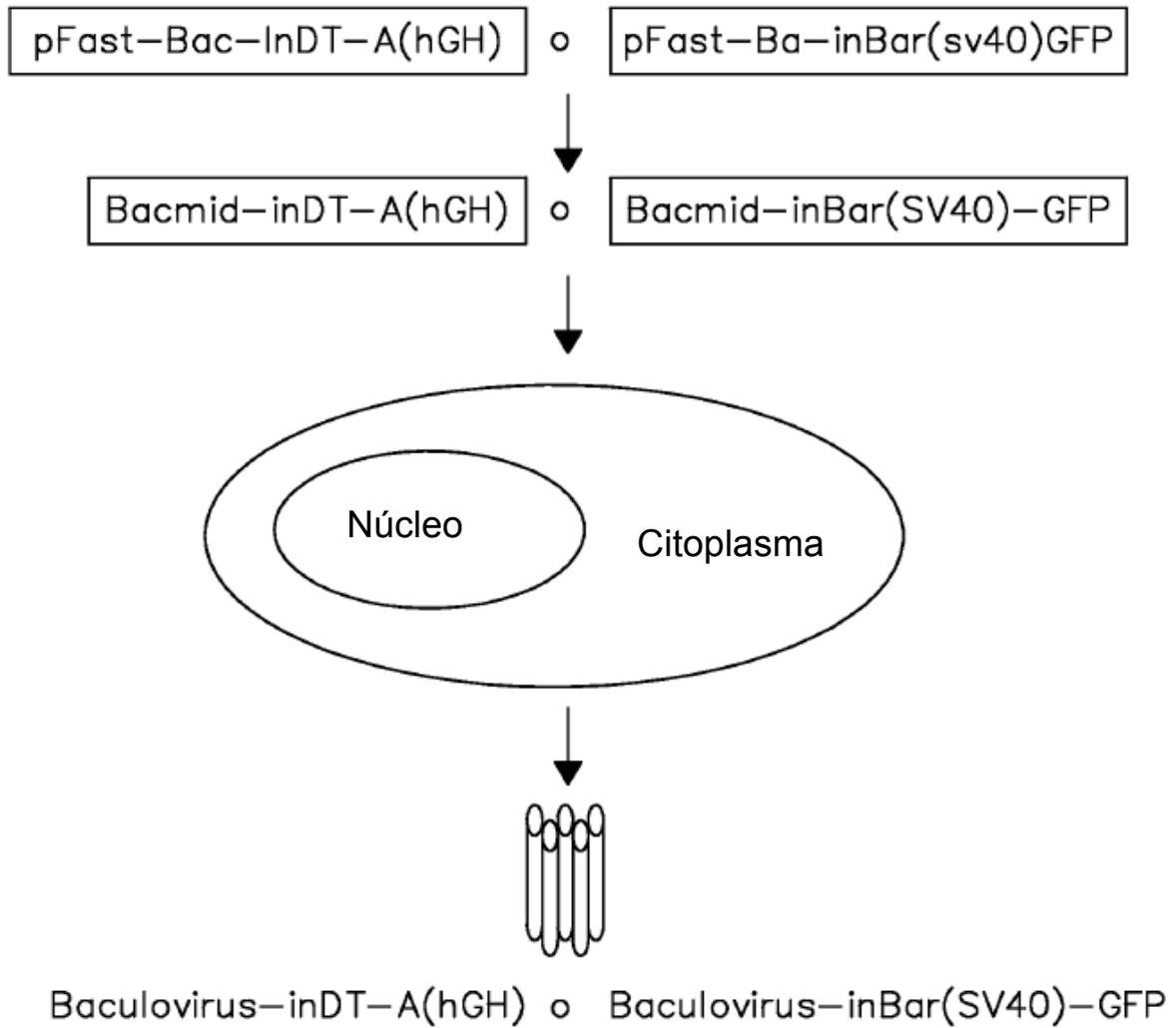


FIG. 3A

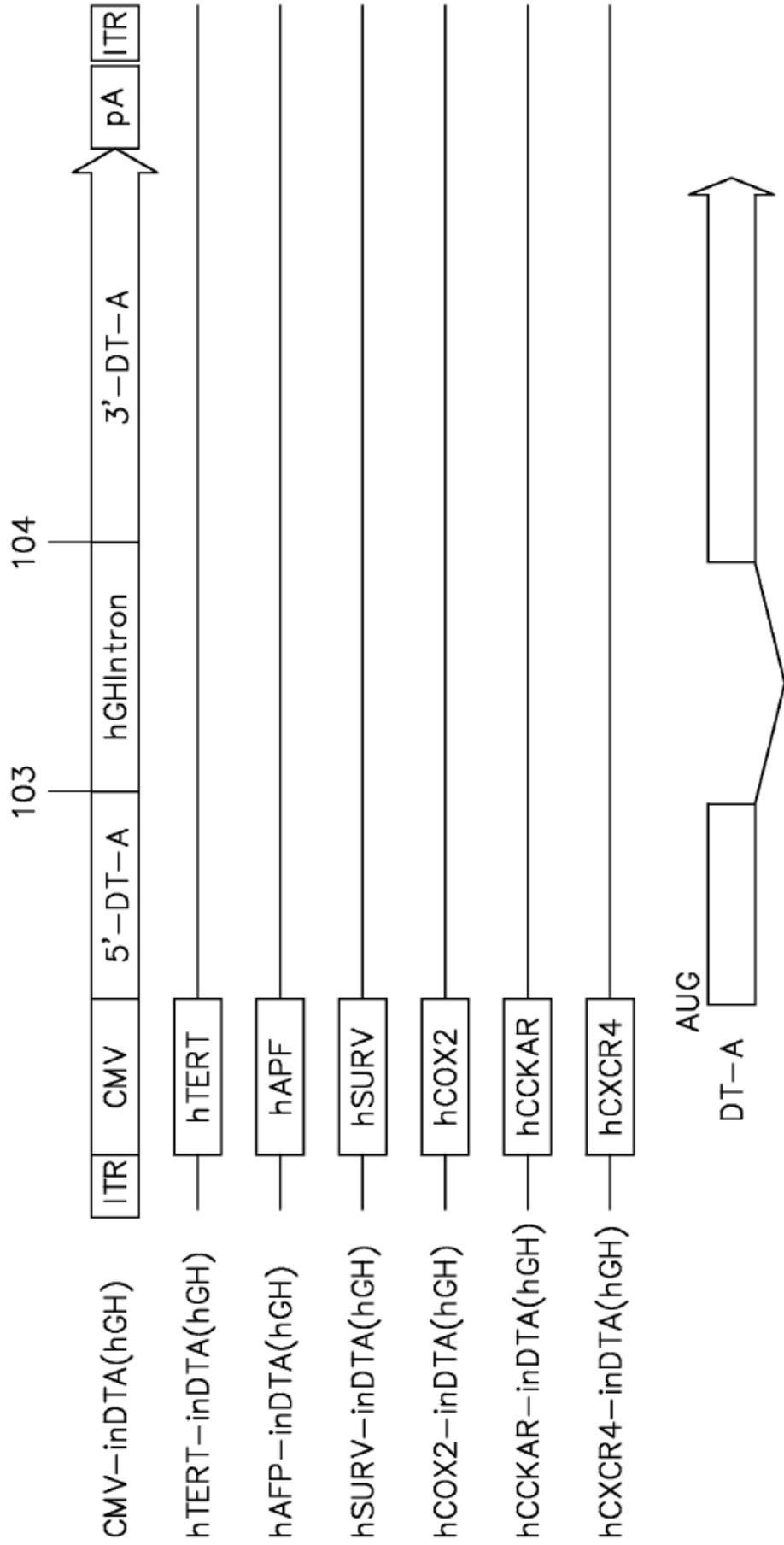


FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 4

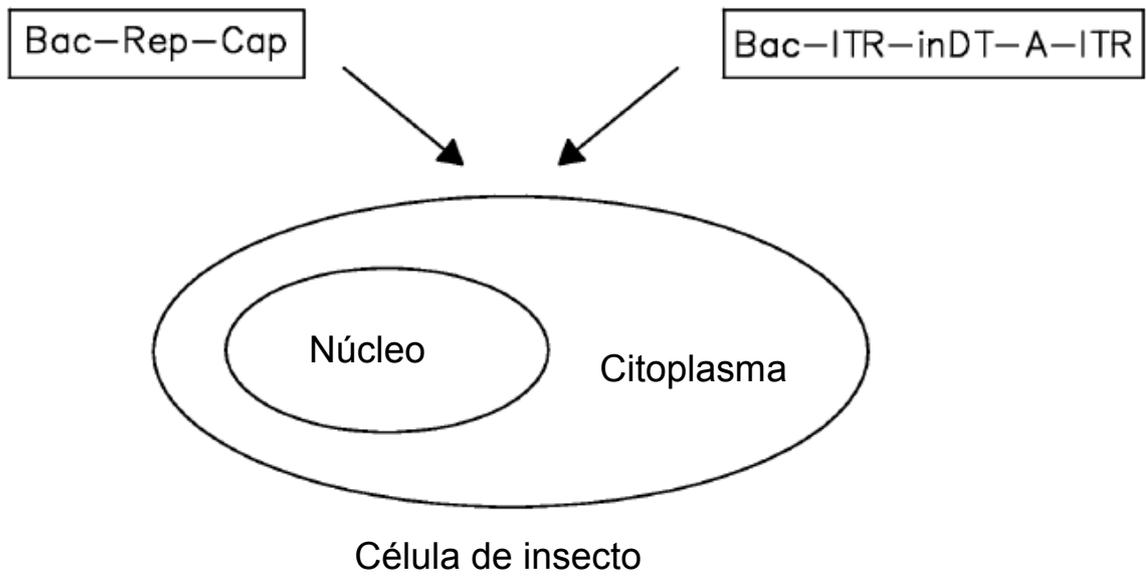


FIG. 5

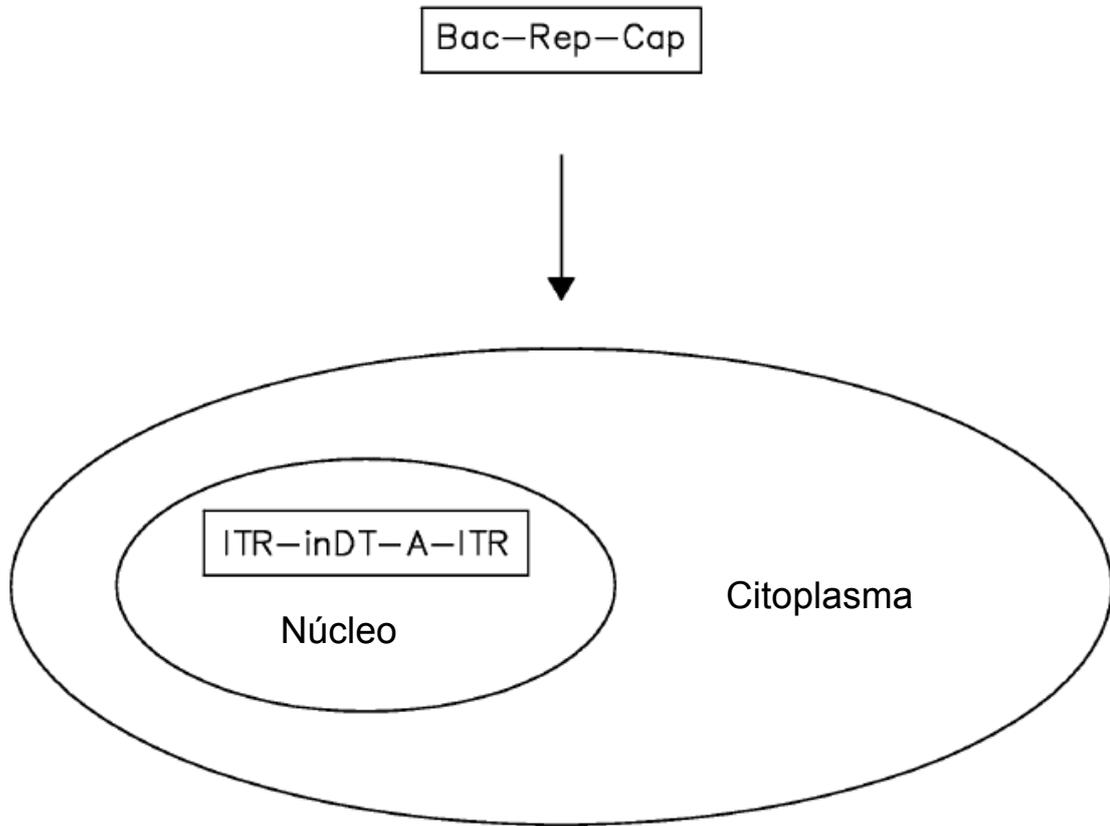


FIG. 6

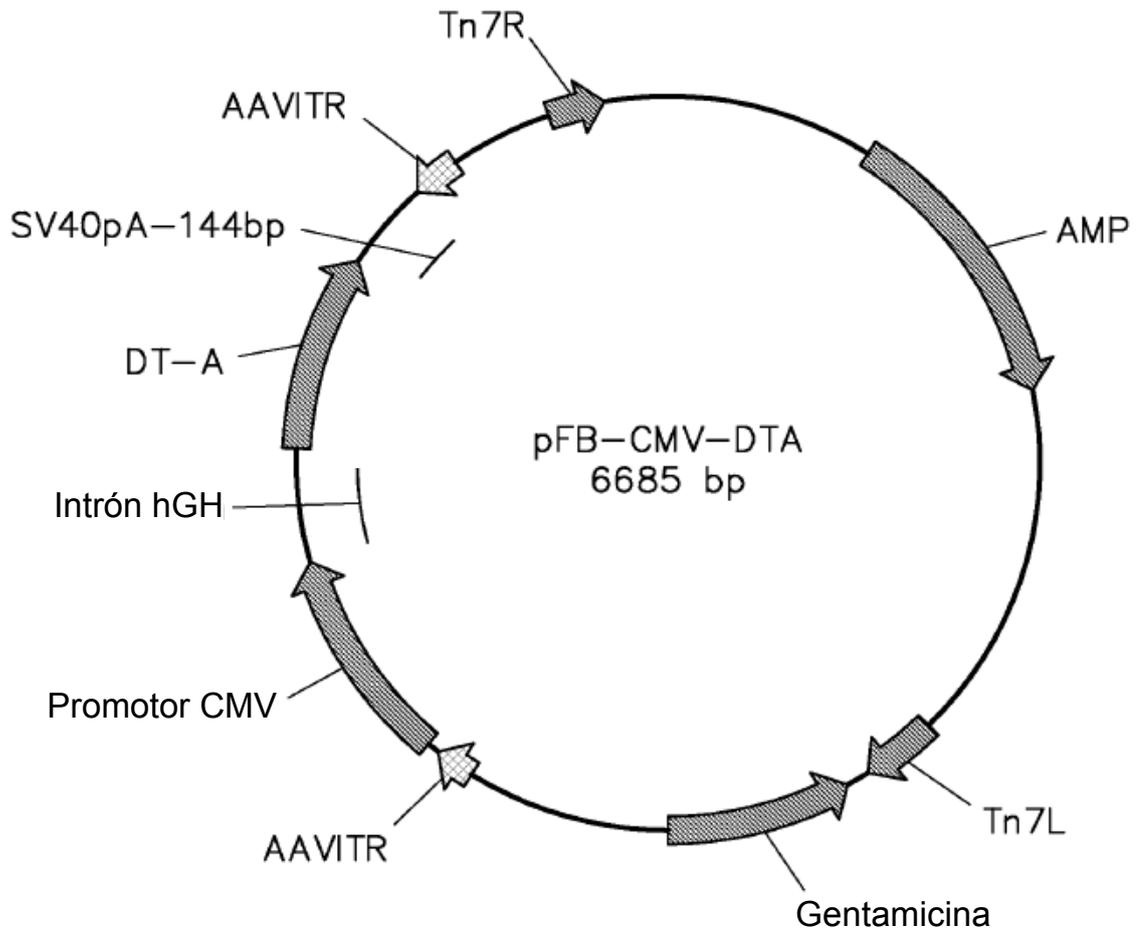


FIG. 7

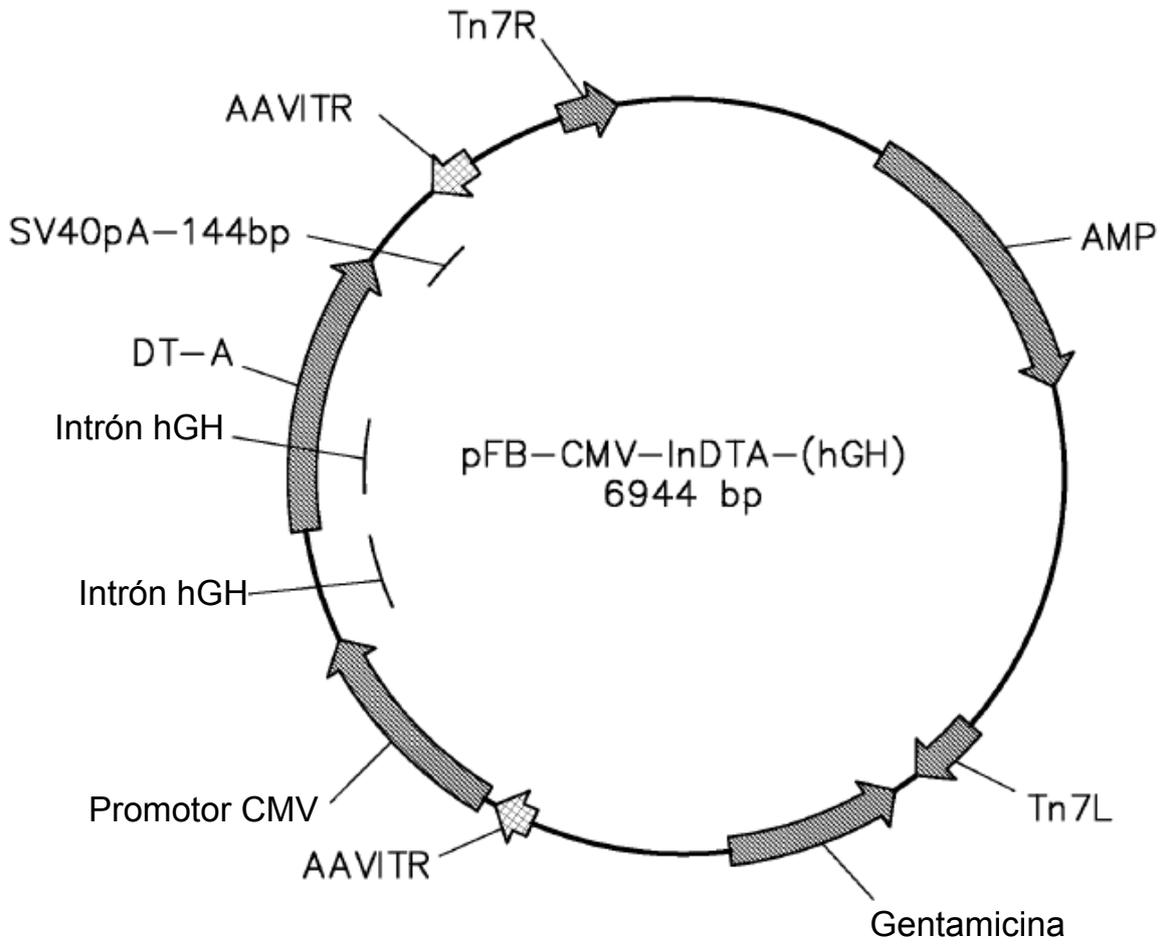


FIG. 8

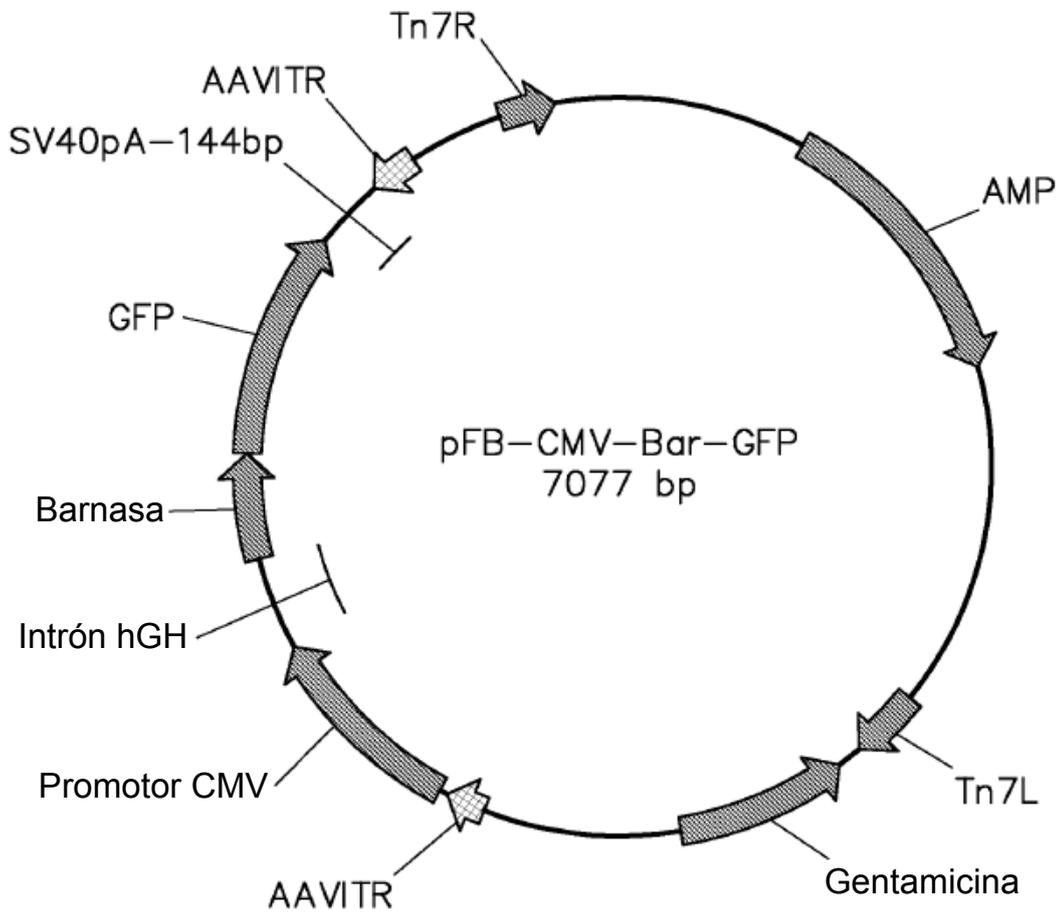


FIG. 9

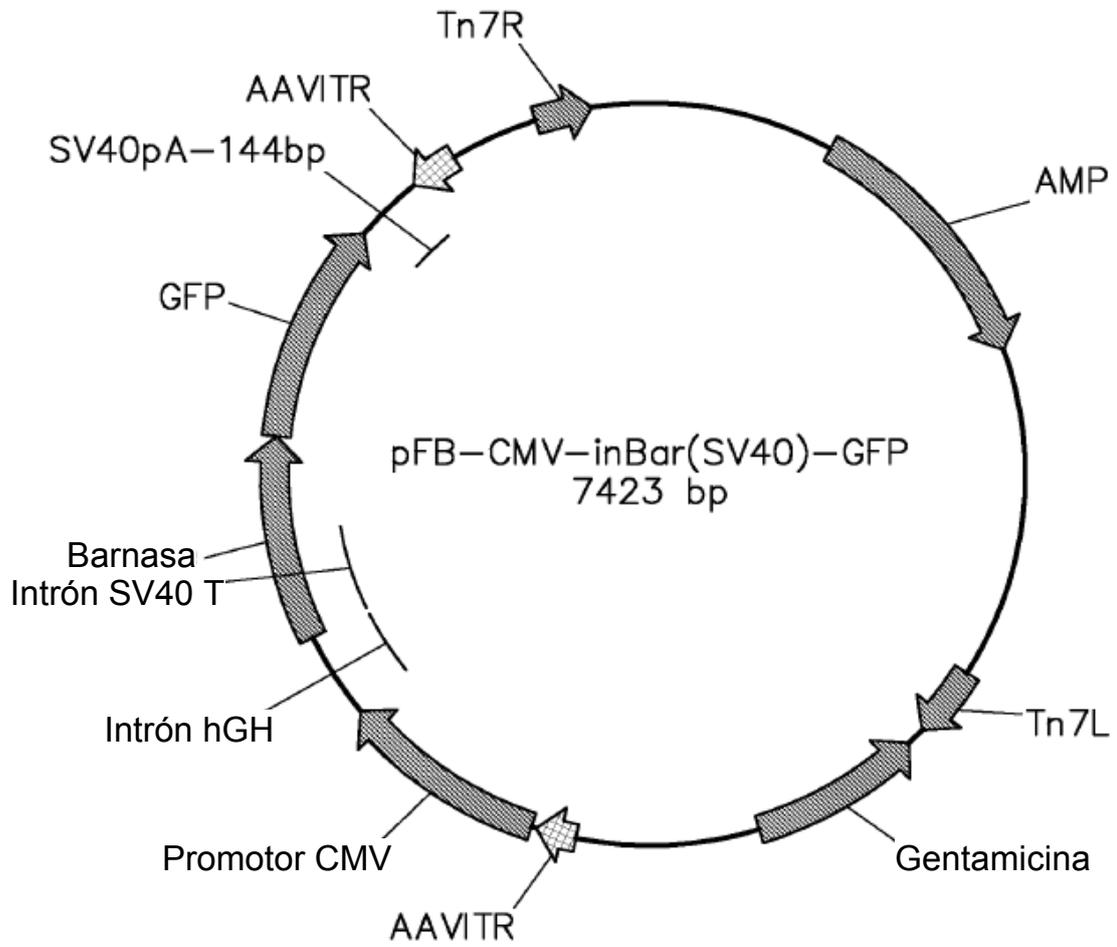


FIG. 10

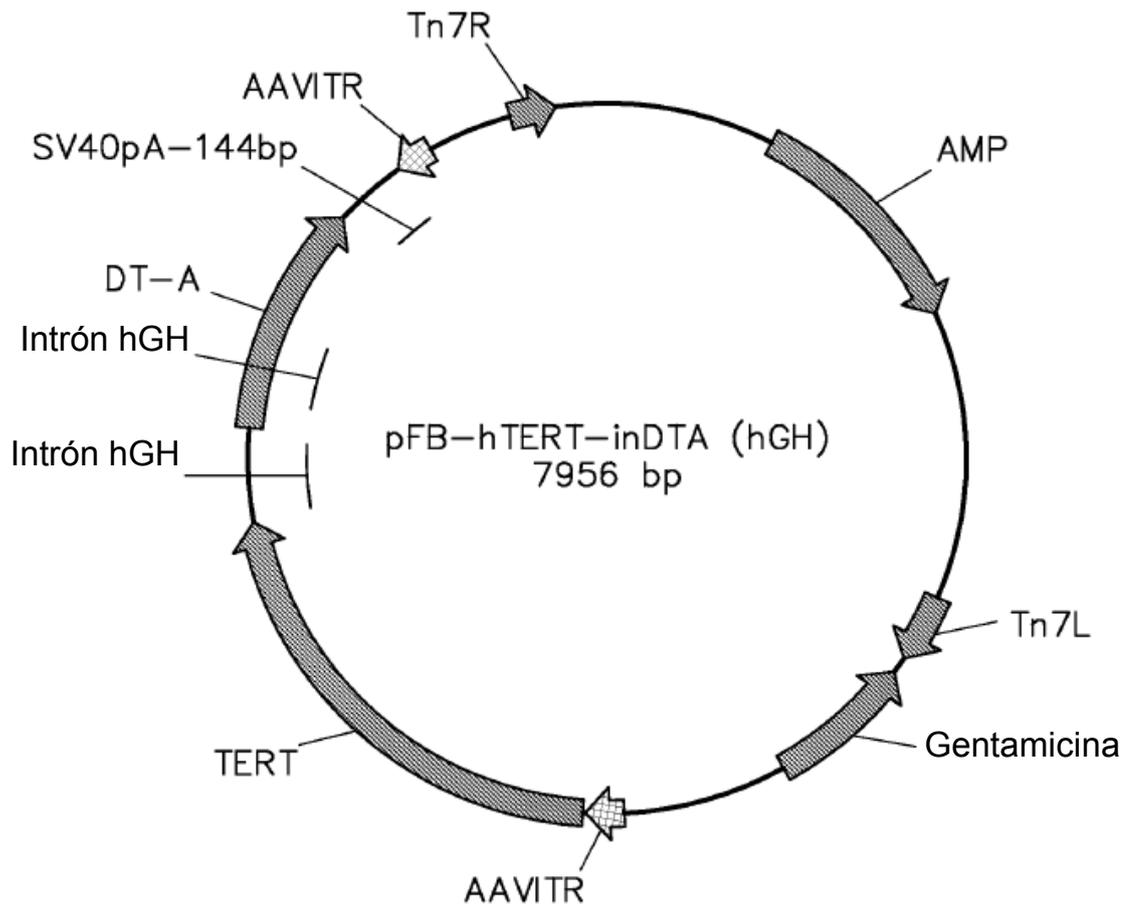


FIG. 11

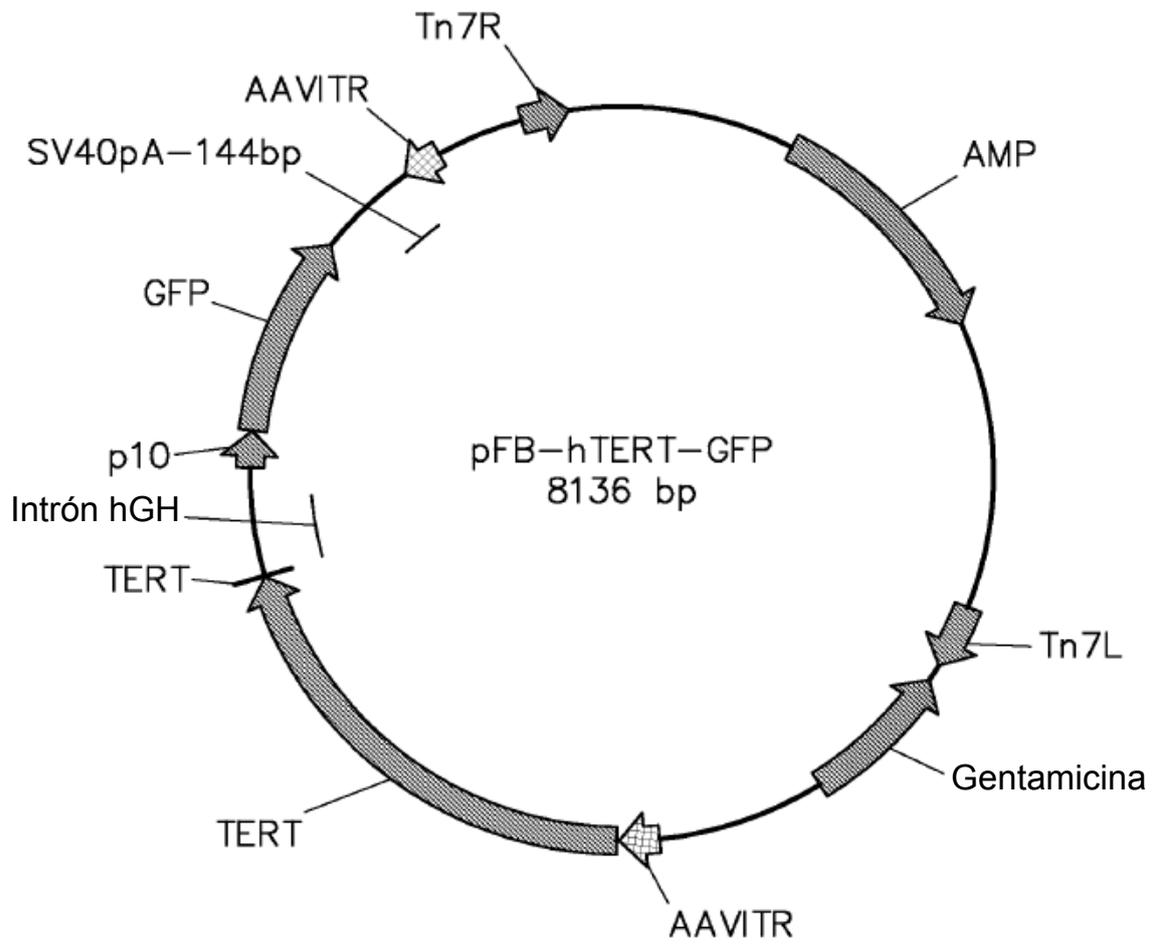


FIG. 12

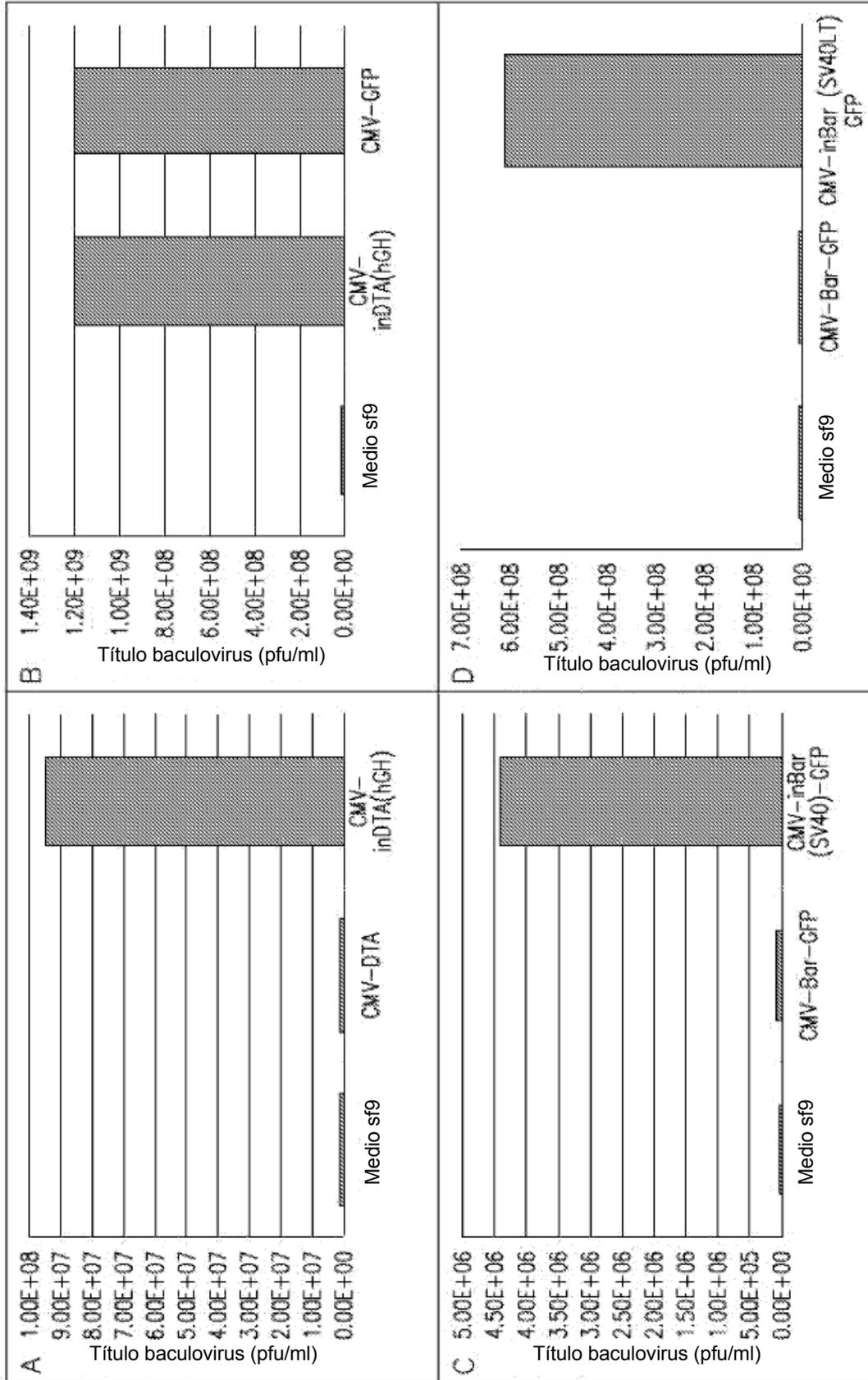


FIG. 13

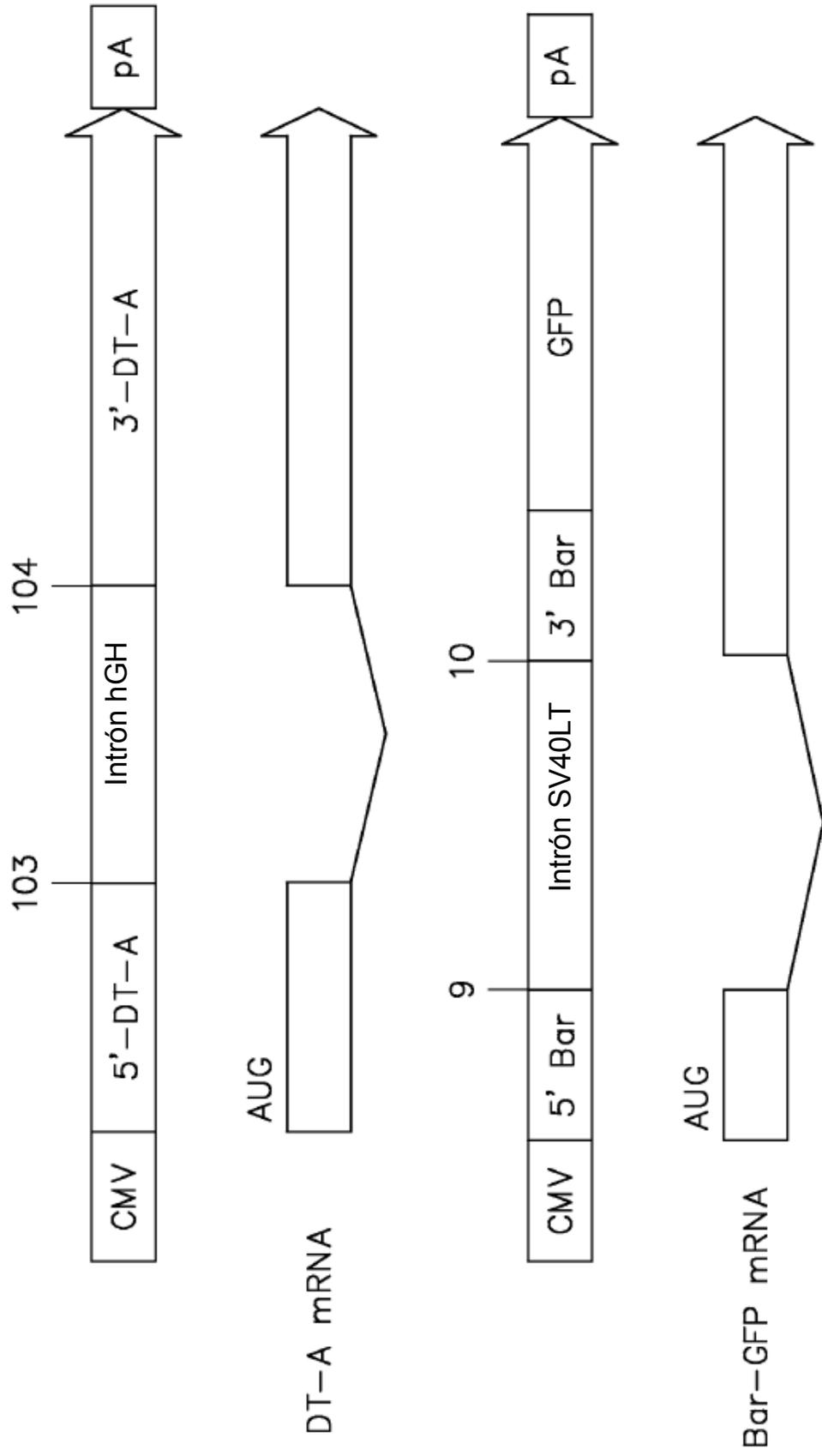


FIG. 14

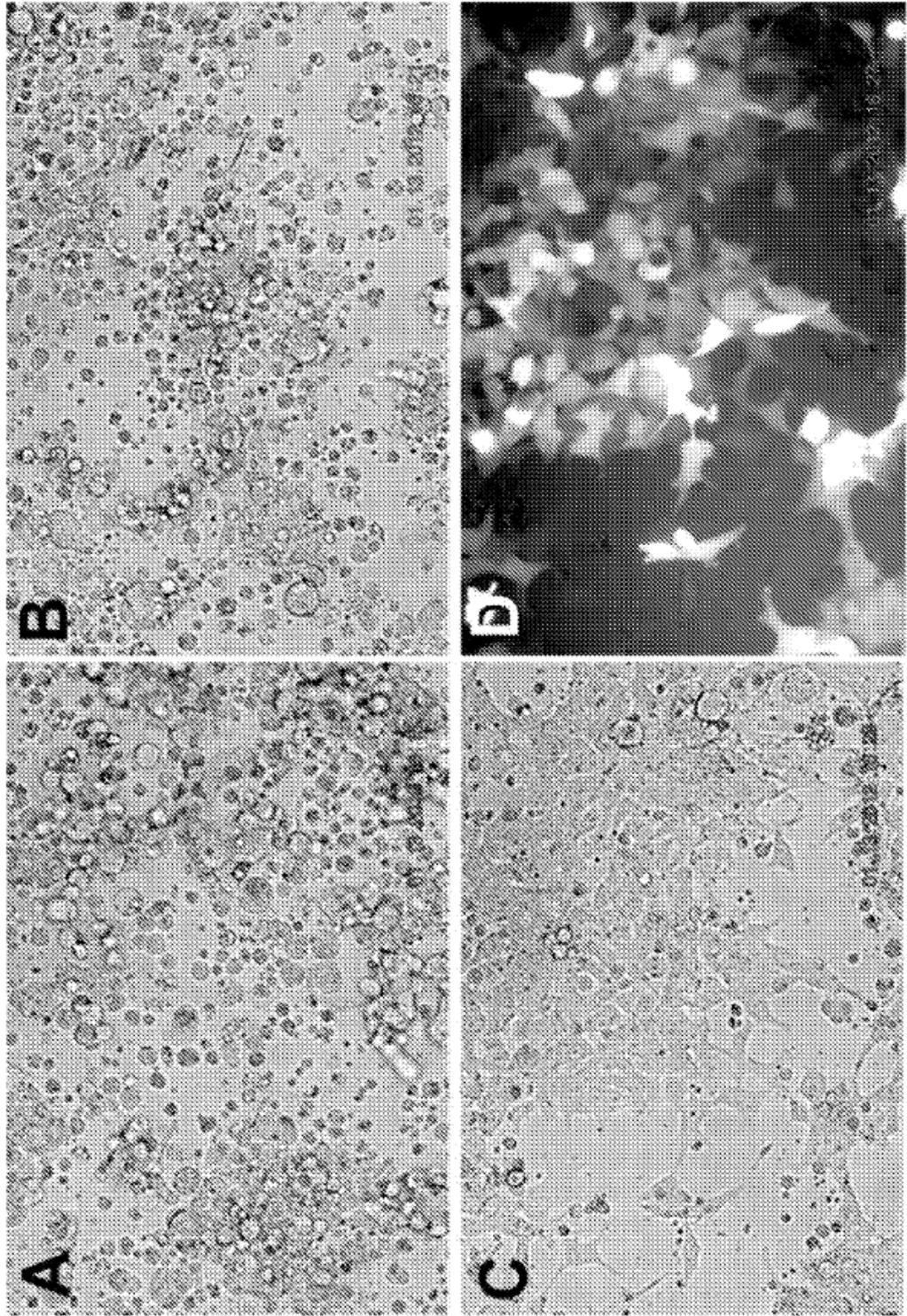


FIG. 15

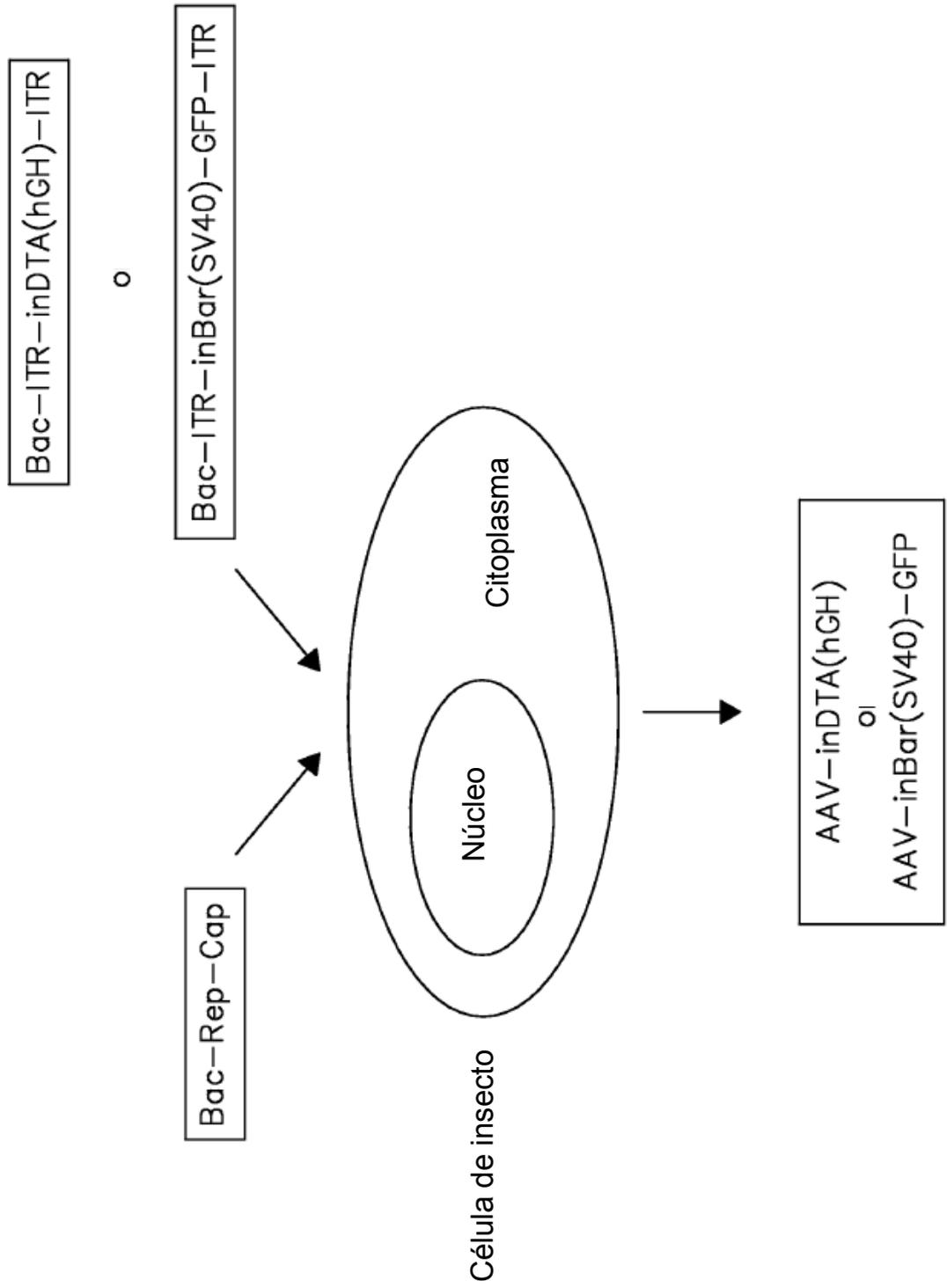


FIG. 16

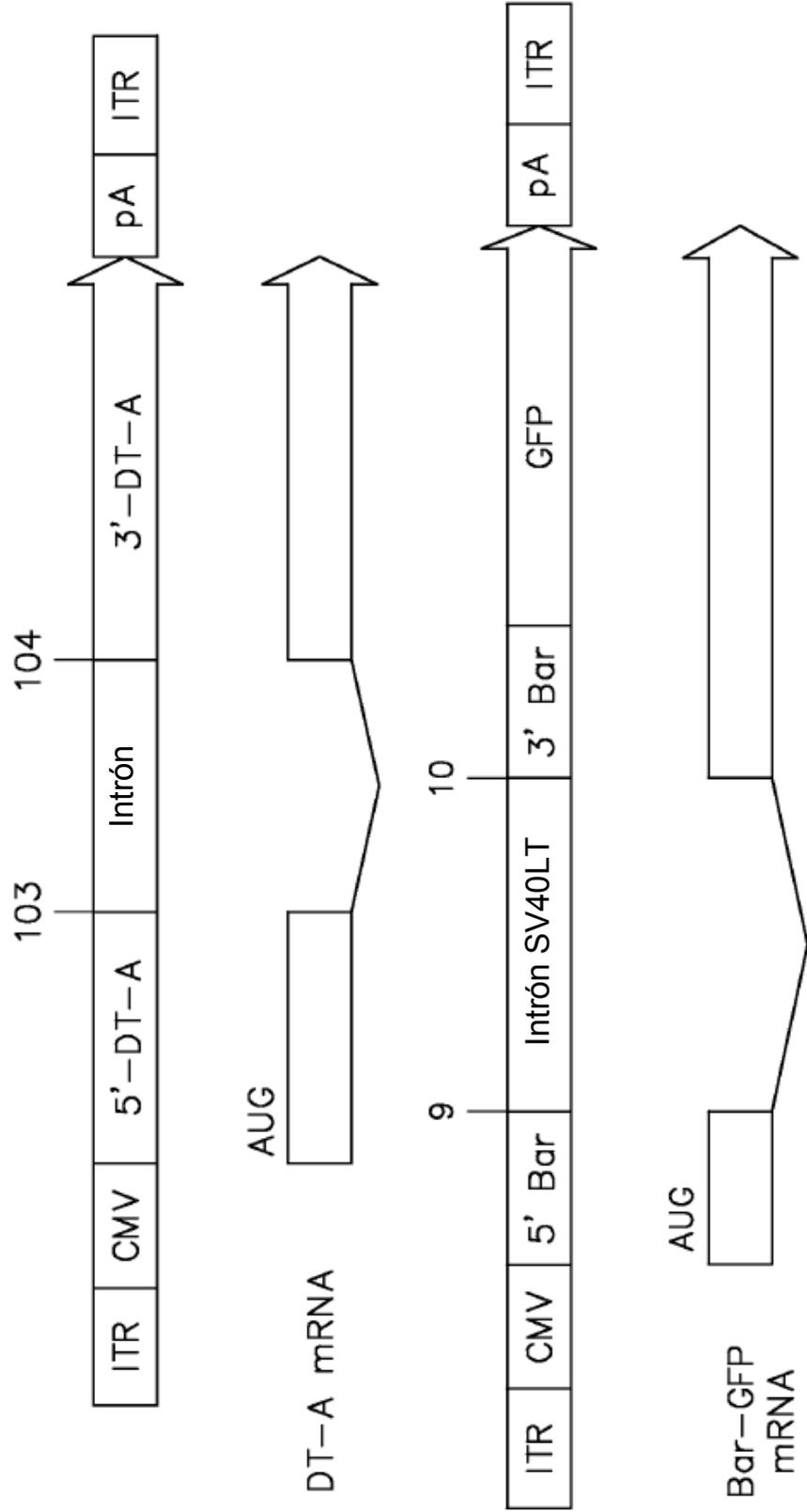


FIG. 17A

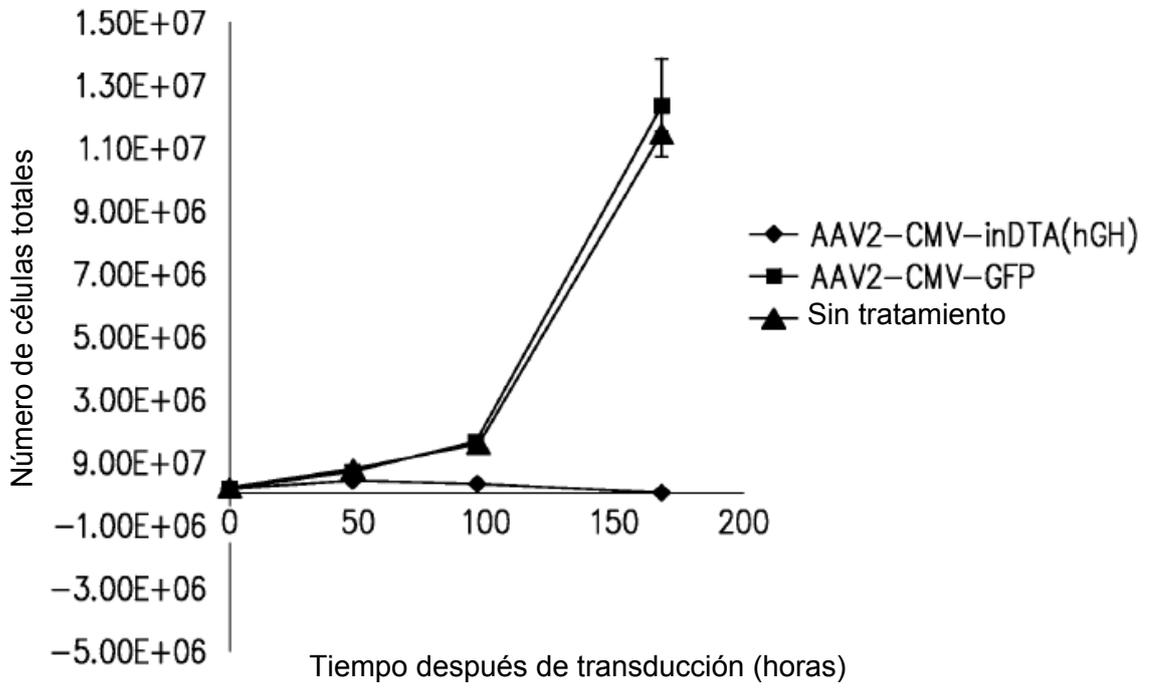


FIG. 17B

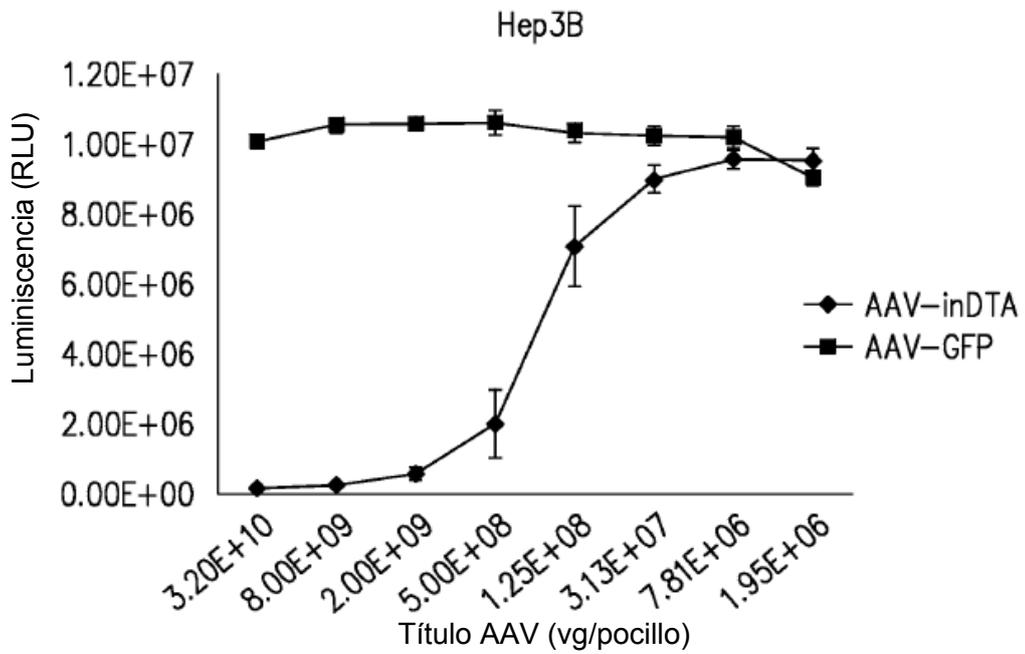


FIG. 18

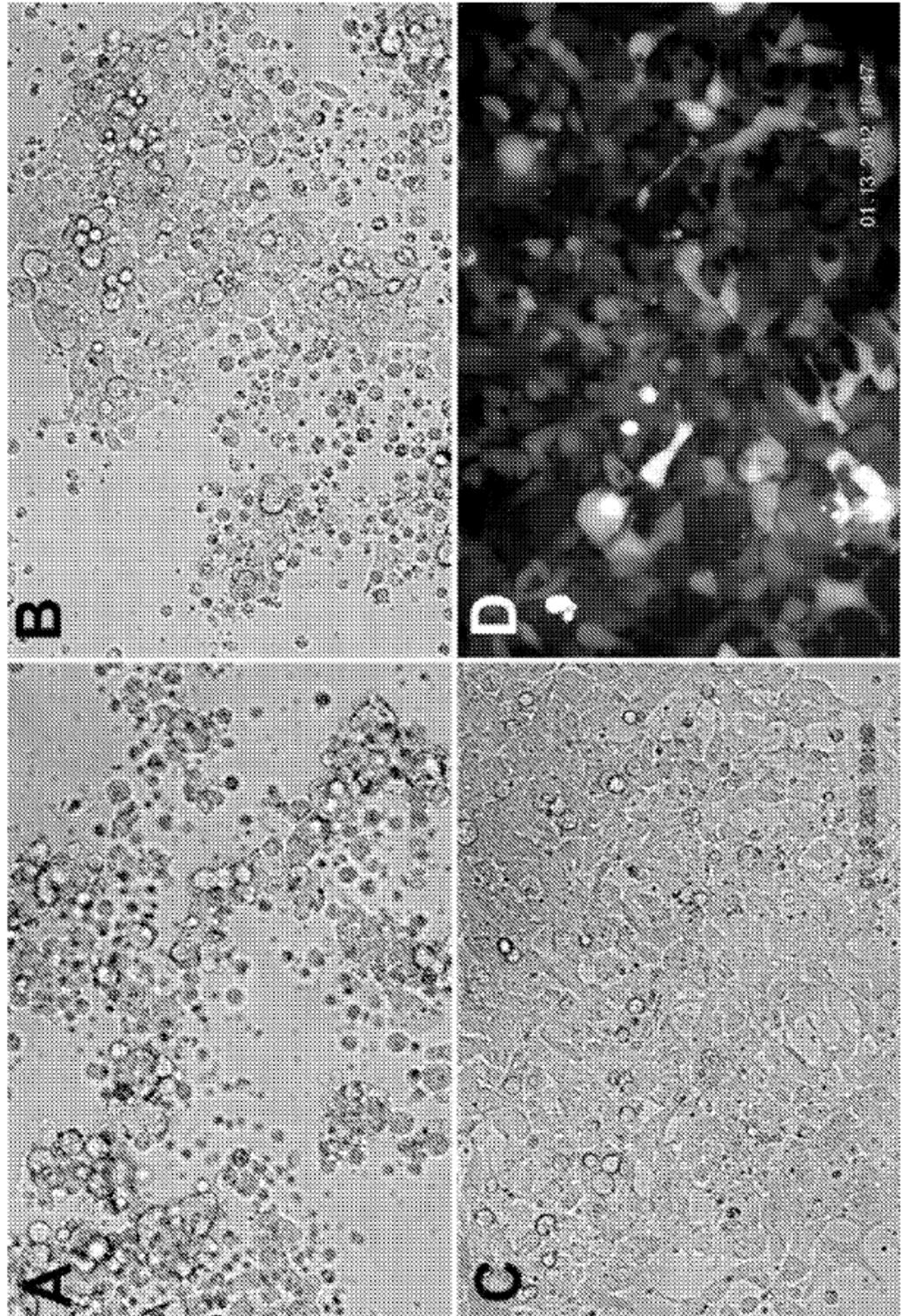


FIG. 19

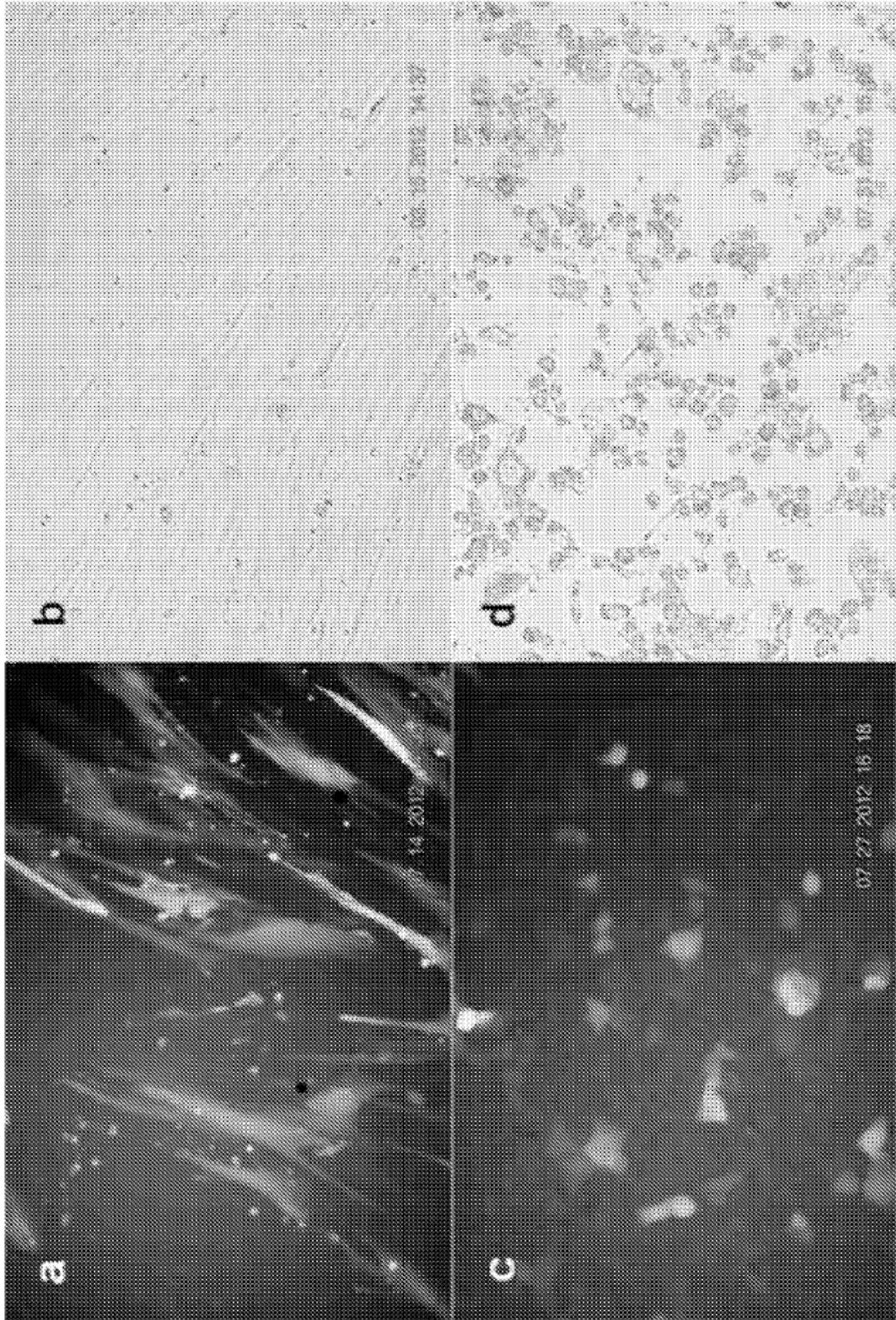


FIG. 19 continuación

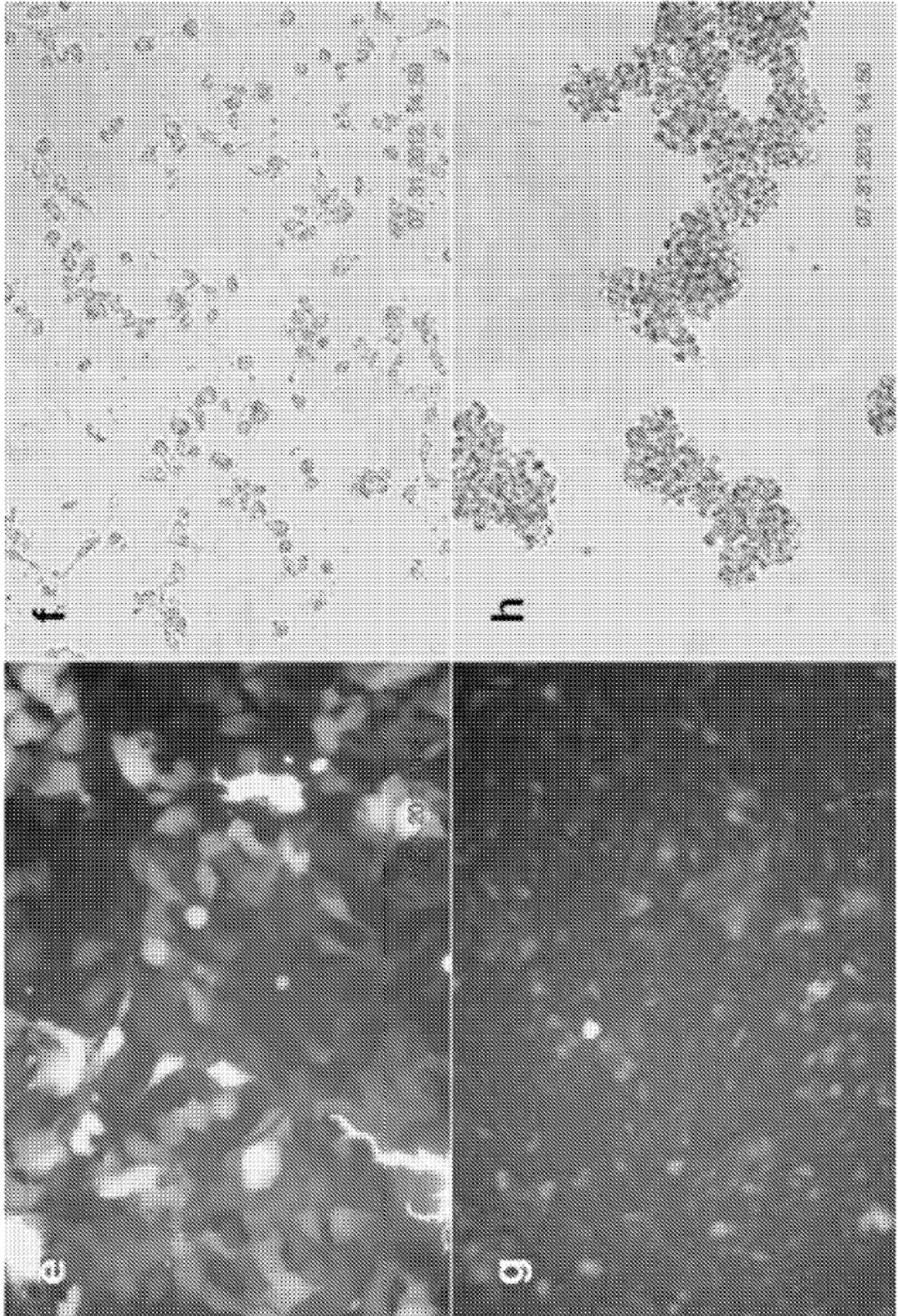


FIG. 20A

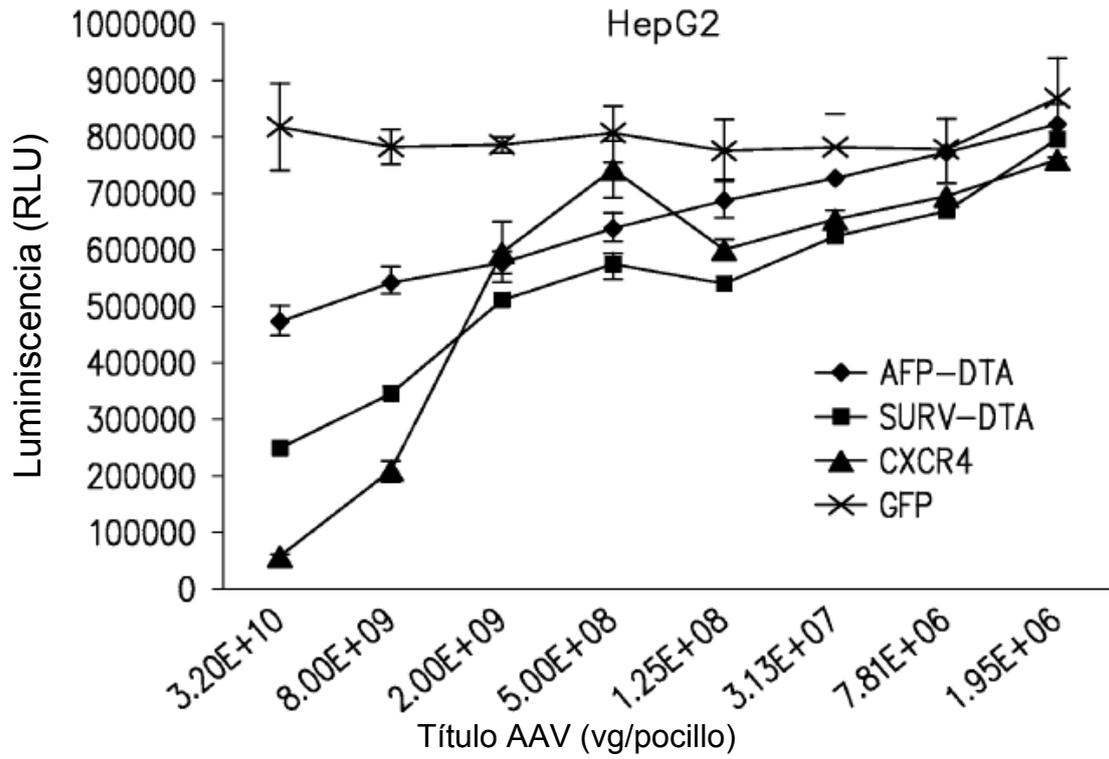


FIG. 20B

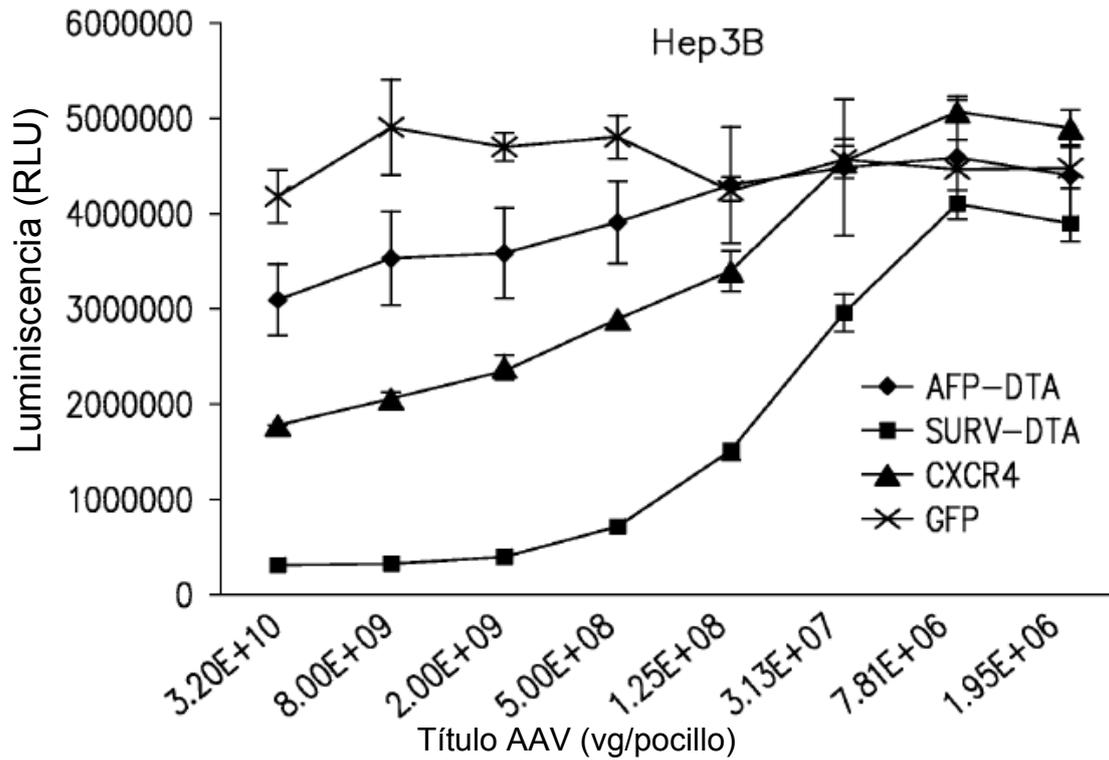


FIG. 20C

