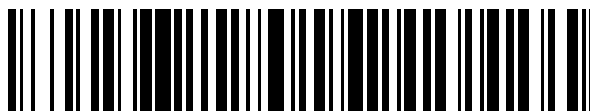


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 223**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 15198010 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3023500**

54 Título: **Células de insecto para la producción de vectores de AAV**

30 Prioridad:

21.06.2006 EP 06115804

21.06.2006 US 815262 P

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

06.10.2020

73 Titular/es:

UNIQUE IP B.V. (100.0%)

Paasheuvelweg 25

1105 BP Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

HERMENS, WILHELMUS THEODORUS

JOHANNES MARIA;

HAAST, SASKIA JACOBA PETRONELLA;

BIESMANS, DENNIS JOHAN y

BAKKER, ANDREW CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 785 223 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

Células de insecto para la producción de vectores de AAV

Campo de la invención

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la producción de virus adeno-asociados en células de insecto y a virus adeno-asociados con mejoras en la expresión y estabilidad de las proteínas Rep virales que aumentan la productividad de vectores virales adeno-asociados en células de insecto.

Antecedentes de la invención

10 **[0002]** Un virus adeno-asociado (AAV) se puede considerar como uno de los vectores virales más prometedores para la terapia génica humana. El AAV tiene la capacidad de infectar eficazmente células humanas que se dividen así como que no se dividen, el genoma viral de un AAV se integra en un único sitio cromosómico en el genoma de la célula huésped, y lo más importante, aunque el AAV está presente en muchos seres humanos nunca ha sido asociado con ninguna enfermedad. En vista de estas ventajas, un virus adeno-asociado recombinante (rAAV) está siendo evaluado en pruebas clínicas de terapia génica para hemofilia B, melanoma maligno, fibrosis quística, y otras enfermedades.

15 **[0003]** Las células huésped que sostienen la replicación de AAV *in vitro* se derivan todas de tipos de células de mamíferos. Por lo tanto, los rAAV para su uso en terapia génica han sido producidos hasta ahora en líneas celulares de mamíferos tal como por ejemplo 293 células, células COS, células HeLa, células KB, y otras líneas celulares de mamíferos (véase por ejemplo los documentos US 6,156,303, US 5,387,484, US 5,741,683, US 5,691,176, US 5,688,676, US 20020081721, WO 00/47757, WO 00/24916, y WO 96/17947). Los vectores de rAAV se producen habitualmente en tales sistemas de cultivo de células de mamíferos al proporcionar plásmidos de ADN que contienen el gen terapéutico flanqueados por el origen de la replicación de AAV (repeticiones terminales invertidas o ITR), los genes para las proteínas de replicación de AAV Rep78; Rep68; Rep52, y Rep40, y los genes para proteínas de virión o estructurales VP1, VP2, y VP3. Además, un plásmido que contiene genes tempranos de adenovirus (E2A, E4ORF6, VARNA) está provisto para mejorar la expresión de los genes del AAV y mejorar el rendimiento del vector (ver por ejemplo Grimm et al., 1998, *Hum. Gene Ther.* 9: 2745-2760). Sin embargo, en la mayor parte de estos sistemas de cultivo de células de mamíferos, el número de partículas de AAV generadas por célula es del orden de 10^4 partículas (revisado en Clark, 2002, *Kidney Int.* 61(Suppl. 1): 9-15). Para un estudio clínico, pueden requerirse más de 10^{15} partículas de rAAV. Para producir este número de partículas de rAAV, se requeriría la transfección y el cultivo con aproximadamente 10^{11} células 293 cultivadas humanas, el equivalente de 5 000 175-cm² matraces de células, que significa la transfección de hasta 10^{11} células 293. Por lo tanto, la producción a gran escala de rAAV usando sistemas de cultivo de células de mamíferos para obtener material para pruebas clínicas ya ha demostrado ser problemática, la producción a escala comercial ni siquiera puede ser factible. Además siempre existe el riesgo, de que un vector para uso clínico que se produzca en un cultivo de células de mamíferos se contamine con material indeseable, quizás patogénico presente en la célula huésped de mamíferos.

40 **[0004]** Para superar estos problemas de los sistemas de producciones de mamíferos, recientemente, se ha desarrollado un sistema de producción de AAV utilizando células de insecto (Urabe et al., 2002, *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943; US 20030148506 y US 20040197895). Para la producción de AAV en células de insecto fueron necesarias algunas modificaciones para conseguir la estequiometría correcta de las tres proteínas de la cápside del AAV (VP1, VP2 y VP3), que se basa en una combinación de un uso alterno de dos sitios de aceptación de empalme y la utilización subóptima de un codón de inicio de ACG para VP2 que no sea reproducido con precisión por células de insecto. Para imitar la estequiometría correcta de las proteínas de la cápside en células de insecto Urabe et al. (2002; *supra*) usan un constructo que se transcribe en un único mensajero policistrónico que es capaz de expresar las tres proteínas VP sin requerir empalmes y donde el codón de inicio que está más arriba se sustituye por el codón de inicio ACG subóptimo. En la solicitud en trámite junto con la presente (PCT/NL2005/050018) los presentes inventores han mejorado además la infectividad de la producción basada en vectores rAAV producidos por baculovirus mediante la optimización adicional de la estequiometría de proteínas de la cápside del AAV en células de insecto.

50 **[0005]** Para la expresión de las proteínas Rep de AAV en el sistema de expresión de células de insecto de AAV como se desarrolló inicialmente por Urabe et al. (2002; *supra*), se utiliza un constructo de baculovirus recombinante que alberga dos unidades de expresión Rep independientes (una para Rep78 y una para Rep52), cada una bajo el control de un promotor de células de insecto separado, los promotores Δ IE1 y PolH, respectivamente. En este sistema, el promotor Δ IE1, un promotor mucho más débil que el promotor PolH, fue elegido para impulsar la expresión de Rep78 al conocerse que en las células de mamíferos una expresión menos abundante de Rep78 en comparación con Rep52 favorece altos rendimientos de vectores (Li et al., 1997, *J Virol.* 71: 5236-43; Grimm et al., 1998, *supra*).

55 **[0006]** Si embargo más recientemente, Kohlbrenner et al. (2005, *Mol. Ther.* 12: 1217-25) informaron de que el constructo de baculovirus para la expresión de las dos proteínas Rep, como se utiliza por Urabe et al., sufre una

inestabilidad inherente. Al separar la orientación palindrómica de los dos genes Rep en el vector original de Urabe y diseñar dos vectores de baculovirus separados para expresar Rep52 y Rep78, Kohlbrenner et al. (2005; *supra*) aumentaron la estabilidad de pasaje del vector. Sin embargo, a pesar de la expresión consistente de Rep78 y Rep52 de los dos constructos independientes de baculovirus-Rep en células de insecto durante al menos 5 pasajes, el rendimiento del vector rAAV es 5 a 10 veces menor en comparación con el constructo de baculovirus-Rep original diseñado por Urabe et al. (2002, *supra*).

[0007] Por tanto sigue existiendo la necesidad de superar las graves limitaciones anteriores de la producción a gran escala (comercial) de vectores de AAV en células de insecto. Por tanto es un objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos que permitan una producción de rendimiento elevado y estable (a gran escala) de vectores de AAV en células de insecto.

Descripción de la invención

Definiciones

[0008] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unido/a operativamente" se refiere a una unión de elementos de polinucleótidos (o polipéptidos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una secuencia reguladora de transcripción está unida operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que están enlazadas habitualmente son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, son contiguas y están en un marco de lectura.

[0009] "Secuencia de control de expresión" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que regula la expresión de una secuencia de nucleótidos a la que está unida operativamente. Una secuencia de control de expresión está "unida operativamente" a una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y/o la traducción de la secuencia de nucleótidos. Así, una secuencia de control de expresión puede incluir promotores, potenciadores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), terminadores de transcripción, un codón de inicio delante de un gen de codificación de proteínas, una señal de empalme para intrones, y codones de terminación. El término "secuencia de control de expresión" pretende incluir, como mínimo, una secuencia cuya presencia está diseñada para influir en la expresión, y pueden incluir también componentes ventajosos adicionales. Por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias compañeras de fusión son secuencias de control de expresión. El término también puede incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que los codones de inicio potenciales, indeseables dentro y fuera del marco, se eliminan de la secuencia. También puede incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que se retiren los sitios de empalme potenciales indeseables. Incluye secuencias o secuencias de poliadenilación (pA) que dirigen la adición de una cola poliA, es decir, una cadena de residuos de adenina en el extremo 3' de un ARNm, secuencias conocidas como secuencias poliA. También se puede diseñar para mejorar la estabilidad del ARNm. Las secuencias de control de expresión que afectan a la estabilidad de la transcripción y la traducción, por ejemplo, los promotores, así como las secuencias que afectan a la traducción, por ejemplo, secuencias de Kozak, son conocidas en las células de insecto. Las secuencias de control de expresión pueden ser de tal naturaleza que modulan la secuencia de nucleótidos a la que están unidas operativamente de manera que se consigan niveles de expresión más bajos o niveles de expresión más altos.

[0010] Como se utiliza en este documento, el término "promotor" o "secuencia reguladora de la transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de una o más secuencias codificantes, y está localizado en dirección ascendente con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de transcripción de la secuencia codificante, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN-polimerasa dependiente del ADN, sitios de inicio de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero sin carácter limitativo sitios de unión del factor de transcripción, sitios de unión a proteínas activadoras y represoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocidos por un experto en la materia para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de los tejidos bajo la mayoría de condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado fisiológica o evolutivamente, por ejemplo por la aplicación de un inductor químico. Un promotor "específico de tejidos" solo está activo en tipos específicos de tejidos o células.

[0011] Los términos "sustancialmente idéntico", "identidad sustancial" o "esencialmente similar" o "similitud esencial" significa que dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos, cuando están alineados óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan parámetros predeterminados, comparten al menos un cierto porcentaje de identidad de secuencia tal y como se define en otra parte del presente documento. GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de toda su longitud, maximizando el número de coincidencias y minimiza el número de espacios. Generalmente, se utilizan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización de creación de espacios = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y una penalización de extensión de espacios = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos la matriz de

puntuación por defecto usada es nwsgapdna y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, *PNAS* 89, 915-919). Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con las secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Los alineamientos de secuencia y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia pueden determinarse utilizando programas informáticos, tales como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE. UU. o el software libre EMBOSS para Windows (versión actual 2.7.1-07). Alternativamente, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar buscando en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

[0012] Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas Rep parvovirales de la invención también pueden estar definidas por su capacidad de hibridar con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N.º 10, respectivamente, bajo condiciones de hibridación moderada, o preferiblemente rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas se definen aquí como condiciones que permiten una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 25, preferiblemente aproximadamente 50 nucleótidos, 75 o 100 y más preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, para hibridar a una temperatura de aproximadamente 65 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y un lavado a 65 °C en una solución que comprende aproximadamente 0,1 M de sal, o menos, preferiblemente 0,2 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante toda la noche, es decir al menos durante 10 horas y preferiblemente el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones permitirán normalmente la hibridación específica de secuencias que tienen aproximadamente un 90 % o más de identidad de secuencia.

[0013] Las condiciones moderadas se definen aquí como condiciones que permiten unas secuencias de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, para hibridar a una temperatura de aproximadamente 45 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y un lavado a temperatura ambiente en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante toda la noche, es decir al menos durante 10 horas y preferiblemente el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones permitirán normalmente la hibridación específica de secuencias que tienen hasta un 50 % de identidad de secuencia. El experto en la materia será capaz de modificar estas condiciones de hibridación a fin de específicamente identificar secuencias que varían en identidad entre un 50 % y un 90 %.

Descripción detallada de la invención

[0014] La presente invención se refiere el uso de parvovirus animales, en particular dependovirus tales como AAV infeccioso humano o simico, y componentes del mismo (por ejemplo, un genoma de parvovirus animal) para su uso como vectores para la introducción y/o expresión de ácidos nucleicos en células de mamíferos. En particular, la invención se refiere a mejoras en productividad de tales vectores parvovirales cuando se producen en células de insecto.

[0015] Los virus de la familia de los *Parvoviridae* son pequeños virus animales de ADN. La familia *Parvoviridae* se puede dividir en dos subfamilias: los *Parvovirinae*, que infectan vertebrados, y los *Densovirinae*, que infectan insectos. Los miembros de la subfamilia *Parvovirinae* se denominan aquí parvovirus e incluyen el género *Dependovirus*. Como se puede deducir del nombre de su género, los miembros del *Dependovirus* son únicos en que normalmente requieren una coinfección con un virus auxiliar tal como adenovirus o herpesvirus para una infección productiva en un cultivo celular. El género *Dependovirus* incluye AAV, que infectan normalmente a seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, y 6) o a primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4), y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adeno-asociados bovinos, caninos, equinos, y ovinos). Se describe más información sobre parvovirus y otros miembros de *Parvoviridae* en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 en *Fields Virology* (3ª Ed. 1996). Por conveniencia la presente invención se ejemplifica y describe de manera adicional en el presente documento con referencia a los AAV. Sin embargo, se entiende que la invención no está limitada a AAV sino que puede aplicarse asimismo a otros parvovirus.

[0016] La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de los AAV es una molécula de ADN monocatenario lineal que tiene menos de aproximadamente 5 000 nucleótidos (nt) de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos de codificación únicas para las proteínas de replicación (Rep) no estructurales y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP (VP1; -2 y -3) forman la cápside. Los 145 nt terminales son autocomplementarios y se organizan de modo que se pueda formar un dúplex intramolecular energéticamente estable formando una horquilla en forma de T. Estas estructuras de horquilla funcionan como un origen para la replicación de ADN viral, sirviendo como cebadores para el complejo de ADN-polimerasa celular. Después de la infección por wtAAV en células de mamíferos los genes

Rep (es decir Rep78 y Rep52) se expresan a partir del promotor P5 y el promotor P19, respectivamente y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma viral. Un evento de empalme en el ORF Rep da como resultado la expresión en realidad de cuatro proteínas Rep (es decir Rep78; Rep68; Rep52 y Rep40). Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm no empalmado, que codifica las proteínas Rep78 y Rep52, en células de mamíferos es suficiente para la producción de vectores de AAV. También en células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 bastan para la producción de vectores de AAV.

[0017] Un "vector parvovírico o AAV recombinante" (o "vector rAAV") se refiere en el presente documento a un vector que comprende una o más secuencias de polinucleótidos de interés, genes de interés o "transgenes" que están flanqueados por secuencias de repetición terminales invertidas parvovirales o AAV (ITR). Tales vectores rAAV se pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas en caso de existir en una célula huésped de insecto que esté expresando AAV rep y productos genéticos cap (es decir AAV Rep y proteínas cap). Cuando un vector rAAV se incorpora en un constructo de ácido nucleico principal (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o baculovirus usado para la clonación o transfección), entonces al vector rAAV se le hace referencia habitualmente como un "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetado de AAV y funciones auxiliares necesarias.

[0018] En un primer aspecto la invención se refiere a una célula de insecto que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que codifica las proteínas Rep parvovirales no estructurales Rep 78 y Rep52, donde las proteínas parvovirales Rep52 y parvovirales Rep78 se expresan en la célula de insecto, donde el codón de inicio para la proteína parvoviral Rep78 es un codón de inicio subóptimo. El codón de inicio subóptimo es preferiblemente un codón de inicio que efectúa la omisión parcial del exón. La omisión parcial del exón se entiende que significa en el presente documento que al menos parte de los ribosomas no inician la traducción en el codón de inicio subóptimo de la proteína Rep78 sino en un codón de inicio más abajo, por el que preferiblemente el codón de inicio más abajo es el codón de inicio de la proteína Rep52. El codón de inicio subóptimo efectúa preferiblemente la omisión parcial del exón en la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula de insecto. Preferiblemente, el codón de inicio subóptimo hace una omisión parcial del exón en una célula de insecto para producir en la célula de insecto una proporción molar de Rep78 a Rep52 en el rango de 1:10 a 10:1, 1:5 a 5:1, o 1:3 a 3:1, preferiblemente a alrededor de 20-40 horas tras la infección, más preferiblemente a alrededor de 30-40 horas tras la infección, usando una expresión de baculovirus. La ración molar de la Rep78 y Rep52 se puede determinar mediante el método de Western blot como se describe en el ejemplo 1.1.3, preferiblemente usando un anticuerpo monoclonal que reconozca un epítipo común tanto de Rep78 como de Rep52, o usando el anticuerpo descrito en ejemplo 1.1.3.

[0019] El término "codón de inicio subóptimo" aquí no solo se refiere al propio codón de inicio de trinucleótidos sino también a su contexto. Así, un codón de inicio subóptimo puede consistir en un codón ATG "óptimo" en un contexto subóptimo, por ejemplo un contexto no Kozak. Sin embargo, son más preferidos los codones de inicio subóptimos donde el propio codón de iniciación de trinucleótidos es subóptimo, es decir no es ATG. Subóptimo se entiende en el presente documento como que significa que el codón es menos eficiente en la iniciación de la traducción en un contexto que de otro modo sería idéntico en comparación con el codón ATG normal. Preferiblemente, la eficiencia de codón subóptimo es inferior al 90, 80, 60,40 o 20 % de la eficiencia del codón ATG normal en un contexto que de otro modo sería idéntico. Los métodos para comparar la eficiencia relativa de iniciación de traducción son conocidos *per se* para la persona experta. Se pueden seleccionar codones de inicio subóptima preferida de entre ACG, TTG, CTG, y GTG. Se prefiere el ACG.

[0020] Una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus animales, se entiende en el presente documento como una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep no estructurales que se requieren y son suficientes para la producción de vectores parvovirales en células de insecto tales como las proteínas Rep78 y Rep52. La secuencia de nucleótidos de parvovirus animal es preferiblemente de un dependovirus, más preferiblemente de un virus adeno-asociado (AAV) humano o simio y más preferiblemente de un AAV que infecta normalmente seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4). Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus animales se da en la SEQ ID N.º 10, que representa una parte del genoma de la secuencia del serotipo 2 de secuencia que codifica las proteínas Rep. La secuencia de codificación Rep78 comprende los nucleótidos 11-1876 y la secuencia codificante Rep52 comprende los nucleótidos 683-1876. Se entiende que los pesos moleculares exactos de las proteínas Rep78 y Rep52, al igual que las posiciones exactas de los codones de inicio de la traducción pueden diferir entre parvovirus diferentes. Sin embargo, la persona experta conocerá cómo identificar la posición correspondiente en la secuencia de nucleótidos de otros parvovirus distintos de AAV-2. Una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep de parvovirus animales puede definirse también así como una secuencia de nucleótidos:

a) que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50, 60, 70, 80, 88, 89, 90, 95, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 11:

b) que tiene al menos un 50, 60, 70, 80, 81, 82, 85, 90, 95, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las posiciones 11-1876 de la SEQ ID N.º: 10:

- c) cuya cadena complementaria hibrida con una secuencia de moléculas de ácidos nucleicos de (a) o (b);
 d) secuencias de nucleótidos cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (c) debido a la degeneración del código genético.

5 Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica proteínas Rep de parvovirus animales que se requieren y son suficientes para la producción de vectores parvovirales en células de insecto.

10 **[0021]** Una secuencia de nucleótidos preferida adicional de la invención comprende una secuencia de control de la expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de la SEQ. ID N.º: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a la SEQ. ID N.º: 7, anterior al codón de inicio de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rep78 parvoviral. Una secuencia con una identidad sustancial a la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID N.º: 7 y que ayudará a aumentar la expresión de la proteína Rep78 parvoviral es por ejemplo una secuencia que tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de identidad con la secuencia de nueve nucleótidos de la SEQ ID N.º: 7.

15 **[0022]** La eliminación de posibles sitios de inicio de traducción falsos en las secuencias codificantes de proteínas Rep, aparte de los sitios de inicio de traducción de Rep78 y Rep52, de otros parvovirus la entenderá bien un experto en la materia, así como la eliminación de sitios de empalme putativo que se pueden reconocer en células de insecto. Las varias modificaciones de las secuencias parvovirales de tipo salvaje para una expresión apropiada en células de insecto se consigue mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética bien conocidas tal como se describe por ejemplo en Sambrook & Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3ª ed), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Varias modificaciones adicionales de las zonas de codificación de proteínas Rep son conocidas por el experto en la materia que podrían aumentar la producción de proteína Rep. Estas modificaciones están dentro del alcance de la presente invención.

20 **[0023]** En un aspecto adicional la invención se refiere a un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas Rep parvovirales tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, en el constructo, la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep parvovirales está unida operativamente a secuencias de control de la expresión de proteínas para la expresión en una célula de insecto. Estas secuencias de control de la expresión incluirán al menos un promotor que esté activo en células de insecto. Las técnicas conocidas por un experto en la materia para expresar genes foráneos en células huésped de insecto se pueden usar para practicar la invención. La metodología para la ingeniería molecular y la expresión de polipéptidos en células de insecto es descrita, por ejemplo, en Summers & Smith. 1986. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures*, Texas Agricultural Experimental Station Bull. N.º 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. En Prokop et al., *Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications*, 97-152; King, L. A. & R. D. Possee, 1992, *The baculovirus expression system*, Chapman and Hall, Reino Unido; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Nueva York; W. H. Freeman & Richardson, C. D., 1995, *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 39; US 4,745,051; US2003148506; y WO 03/074714. Un promotor especialmente adecuado para la transcripción de la secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas Rep parvovirales es por ejemplo el promotor de poliedro. Sin embargo, se conocen otros promotores que están activos en células de insecto en la técnica, por ejemplo los promotores p10; p35, IE-1 o ΔIE-1 y promotores adicionales descritos en las referencias anteriores.

30 **[0024]** Preferiblemente el constructo de ácido nucleico para la expresión de las proteínas Rep parvovirales en células de insecto es un vector compatible con células de insecto. Un "vector compatible con células de insecto" o "vector" se entiende que es una molécula de ácido nucleico capaz de una transformación o transfección productiva de un insecto o célula de insecto. Los vectores biológicos ejemplares incluyen plásmidos, moléculas lineales de ácido nucleico, y virus recombinantes. Se puede emplear cualquier vector siempre que sea compatible con las células de insecto. El vector puede integrarse en el genoma de las células de insecto pero la presencia del vector en la célula de insecto no necesita ser permanente y también se incluyen vectores episómicos transitorios. Los vectores se pueden introducir por cualquier medio conocidos, por ejemplo por tratamiento químico de las células, electroporación, o infección. En una forma de realización preferida, el vector es un baculovirus, un vector viral, o un plásmido. En una forma de realización más preferida, el vector es un baculovirus, es decir el constructo es un vector baculoviral. Se describen vectores baculovirales y métodos para su uso en las referencias citadas anteriores sobre ingeniería molecular de células de insecto.

40 **[0025]** En otro aspecto la invención se refiere a una célula de insecto que comprende no más de un tipo de secuencias de nucleótidos que comprenden un marco de lectura abierto único que codifica una proteína Rep parvoviral. Preferiblemente el marco de lectura abierto único codifica una o más de las proteínas Rep parvovirales, más preferiblemente el marco de lectura abierto codifica todas las proteínas Rep parvovirales, más preferiblemente el marco de lectura abierto codifica toda la longitud de la proteína Rep parvoviral de la que preferiblemente al menos ambas proteínas Rep 52 y Rep 78 se pueden expresar en la célula de insecto. Se entiende en el presente documento que la célula de insecto puede comprender más de una copia del tipo único de secuencia de nucleótidos, por ejemplo en un vector episómico multicopia, pero que estos son copias múltiples de esencialmente una y la misma molécula de ácido nucleico, o al menos moléculas de ácido nucleico que codifican una y la misma

secuencia de aminoácidos Rep, por ejemplo moléculas de ácido nucleico que solo difieren entre sí debido a la degeneración del código genético. La presencia de solo un tipo de molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas Rep parvovirales evita la recombinación entre secuencias homólogas como puede estar presente en diferentes tipos de vectores que comprenden secuencias Rep, que pueden dar lugar a construcciones de expresión Rep defectuosas que afectan a (la estabilidad de) los niveles de producción parvovirales en células de insecto. Preferiblemente, en la célula de insecto, la secuencia de nucleótidos comprendiendo el marco de lectura abierto único que codifica una o más proteínas Rep parvovirales forma parte de un constructo de ácido nucleico donde las secuencias de nucleótidos están unidas operativamente a las secuencias de control de expresión en una célula de insecto. Una célula de insecto preferida adicional comprende como una "primera" secuencia de nucleótidos una secuencia de nucleótidos tal como se ha definido anteriormente que codifica proteínas Rep parvovirales, preferiblemente una secuencia codificante con un codón de inicio subóptimo tal como se ha definido anteriormente, o un constructo de ácido nucleico tal como se ha definido anteriormente o la célula de insecto comprende como un "primer" constructo de ácido nucleico un constructo de ácido nucleico tal como se ha definido anteriormente que comprende tales secuencias de nucleótidos.

[0026] Cualquier célula de insecto que permita la replicación de un vector parvoviral recombinante (rAAV) y que se pueda mantener en un cultivo se puede usar conforme a la presente invención. Por ejemplo, la línea celular usada puede ser de *Spodoptera frugiperda*, líneas celulares de *drosophila*, o líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*. Las células de insecto o líneas celulares preferidas son células de las especies de insecto que son susceptibles a una infección por baculovirus, incluyendo por ejemplo Se301; SelZD2109, SeUCR1, Sf9; Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1; Tn368, HzAm1; Ha2302, Hz2E5, High Five (Invitrogen, CA, EE. UU) y *expresSF+®* (US 6,103,526; Protein Sciences Corp., CT, EE. UU.).

[0027] Una célula de insecto preferida según la invención, además de la "primera" secuencia de nucleótidos o constructo de ácido nucleico descrito anteriormente, comprende además:

- a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de repetición terminal invertida parvoviral (ITR); y,
- b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral unidas operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.

[0028] En el contexto de la invención "al menos una secuencia de nucleótidos ITR parvovirales" se entiende que significa una secuencia palindrómica, que comprende de manera mayormente complementaria, secuencias dispuestas simétricamente también referidas como regiones "A", "B", y "C". La ITR funciona como un origen de replicación, un sitio con un papel "cis" en la replicación, es decir, siendo un sitio de reconocimiento para proteínas de replicación de actuación trans tal como por ejemplo la Rep 78 (o Rep68) que reconocen el palíndromo y las secuencias específicas internas del palíndromo. Una excepción a la simetría de la secuencia ITR es la región "D" de la ITR. Es única (que no tiene un complemento dentro de una ITR). La mella de ADN monocatenario ocurre en la juntura entre las regiones A y D. Es la región donde se inicia la síntesis de nuevo ADN. La región D se encuentra normalmente a un lado del palíndromo y proporciona direccionalidad al paso de replicación de ácido nucleico. Un parvovirus que se replica en una célula de mamífero tiene normalmente dos secuencias ITR. Sin embargo, es posible diseñar una ITR de modo que sitios de unión estén en ambas cadenas de las regiones A y las regiones D están situadas simétricamente, una a cada lado del palíndromo. En una plantilla de ADN circular bicatenario (por ejemplo, un plásmido), la replicación asistida por Rep78 o Rep68 de ácido nucleico procede entonces en ambas direcciones y basta una única ITR para la replicación parvoviral de un vector circular. Así, una secuencia de nucleótidos ITR se puede usar en el contexto de la presente invención. Preferiblemente, sin embargo, se utilizan dos u otro número par de ITR regulares. Más preferiblemente, se usan dos secuencias ITR. Una ITR parvoviral preferida es una ITR de AAV. Por razones de seguridad puede ser deseable construir un vector parvoviral recombinante (rAAV) que sea incapaz de propagarse adicionalmente después de la introducción inicial en una célula. Tal mecanismo de seguridad para limitar la propagación indeseable de vectores en un receptor puede proporcionarse usando rAAV con una ITR quimérica como se describe en US2003148506.

[0029] El número de constructos de ácido nucleico empleados en la célula de insecto para la producción del vector parvoviral recombinante (rAAV) no es limitante en la invención. Por ejemplo, se pueden emplear uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más constructos separados para producir rAAV en células de insecto conforme a los métodos de la presente invención. Si se emplean cinco constructos, un constructo codifica AAV VP 1, otro constructo codifica AAV VP2, otro constructo más codifica AAV VP3, otro constructo adicional codifica la proteína Rep tal como se ha definido anteriormente y un constructo final comprende al menos un ITR de AAV. Si se utilizan menos de cinco constructos, los constructos pueden comprender varias combinaciones de al menos un ITR de AAV y las secuencias codificantes de proteínas Rep, y el VP1, VP2, VP3. Preferiblemente, se utilizan dos constructos o tres constructos, con dos constructos siendo más preferidos tal como se ha descrito anteriormente. Si se utilizan dos constructos, preferiblemente la célula de insecto comprende: (a) un primer constructo de ácido nucleico para la expresión de las proteínas Rep tal como se ha definido anteriormente, dicho constructo comprende además las terceras secuencias de nucleótidos tal y como se define en (b) anteriormente (que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral unidas operativamente a al menos una secuencia de control de expresión para la expresión en una célula de insecto; véase también a continuación); y (c) un segundo constructo de ácido

nucleico comprendiendo la segunda secuencia de nucleótidos tal y como se ha definido en (a) anteriormente (que comprende al menos una secuencia de nucleótidos ITR de AAV/parvoviral). Si se usan tres construcciones, preferiblemente se usa la misma configuración que se utiliza para dos construcciones excepto que se usan construcciones separadas para la expresión de las proteínas de la cápside y para la expresión de las proteínas Rep. Las secuencias en cada constructo pueden estar en cualquier orden una con respecto a la otra. Por ejemplo, si un constructo comprende ITR y un ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de la cápside VP, el ORF VP puede estar situado en el constructo de manera que, en la replicación del ADN entre secuencias ITR, el ORF VP se replique o no se replique. Para otro ejemplo, las secuencias codificantes de Rep y/o el ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de la cápside VP pueden estar en cualquier orden en un constructo. Se entiende que también el segundo, tercero y demás constructo(s) de ácido nucleico preferiblemente son unos vectores compatibles con células de insecto, preferiblemente unos vectores baculovirales tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, en la célula de insecto de la invención, una o más de la primera secuencia de nucleótidos, segunda secuencia de nucleótidos, tercera secuencia de nucleótidos y cuarta secuencia de nucleótidos y otras secuencias de nucleótidos opcionales se pueden integrar de forma estable en el genoma de la célula de insecto. Un experto en la materia sabe cómo introducir de forma estable una secuencia de nucleótidos en el genoma de insecto y cómo identificar una célula con tal secuencia de nucleótidos en el genoma. La incorporación en el genoma puede estar asistida, por ejemplo, por el uso de un vector que comprende secuencias de nucleótidos altamente homólogas a regiones del genoma de insecto. El uso de secuencias específicas, tal como transposones, es otra forma de introducir una secuencia de nucleótidos en un genoma.

[0030] En la invención, la tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína de cápside (Cap) parvoviral se entiende aquí que comprende secuencias que codifican cada una de las tres proteínas de cápside parvovirales, VP1; -2 y -3. La tercera secuencia de nucleótidos comprendiendo las secuencias codificantes de proteína de la cápside puede estar presente de varias formas. Por ejemplo pueden usarse secuencias codificantes separadas para cada una de las proteínas de la cápside VP1; -2 y -3, por el que cada secuencia codificante está unida operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto. Más preferiblemente, sin embargo, la tercera secuencia de nucleótidos comprende un único marco de lectura abierto que codifica las tres proteínas de la cápside parvovirales animales (AAV) VP1, VP2, y VP3, donde el codón de inicio para la traducción de la proteína de la cápside VP1 es un codón de inicio subóptimo que no es ATG como por ejemplo lo describe Urabe et al. (2002, *supra*). Un codón de inicio subóptimo para la proteína de la cápside VP1 puede ser tal como se ha definido anteriormente para la proteína Rep78. Los codones de inicio subóptimos más preferidos para la proteína de la cápside VP1 se pueden seleccionar de entre ACG, TTG, CTG y GTG, de los cuales CTG y GTG son más preferidos. Una tercera secuencia de nucleótidos preferida para la expresión de las proteínas de la cápside comprende además una secuencia de control de expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de la SEQ. ID N.º: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a la SEQ. ID N.º: 7, anterior al codón de inicio de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside VP1. Una secuencia con una identidad sustancial a la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID N.º: 7 y que ayudará a aumentar la expresión del VP1 es por ejemplo una secuencia que tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de identidad con la secuencia de nueve nucleótidos de la SEQ ID N.º: 7. Una tercera secuencia de nucleótidos preferida adicional para la expresión de las proteínas de la cápside comprende además preferiblemente al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside VP1 seleccionada de entre una C en la posición de nucleótidos 12, una A en la posición de nucleótidos 21, y una C en la posición de nucleótidos 24 (con referencia a posición 1 siendo el primer nucleótido del codón de inicio de la traducción; véase la SEQ ID N.º1). La eliminación de posibles codones de inicio falsos para la traducción de VP1 de otros serotipos será bien entendida por un experto en la materia, así como será la eliminación de sitios de empalme putativo que se puedan reconocer en células de insecto. Varias modificaciones adicionales de regiones de codificación de VP se conocen por un experto en la materia que podría o bien aumentar el rendimiento del VP y del virión o bien tener otros efectos deseados, tales como un tropismo alterado o reducir la antigenicidad del virión. Estas modificaciones están dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente la secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas de la cápside está unida operativamente a las secuencias de control de la expresión para la expresión en una célula de insecto, que al menos incluirá un promotor que esté activo en las células de insecto. Tales secuencias de control y demás técnicas y materiales (por ejemplo vectores) para expresar proteínas de la cápside parvovirales en células huésped de insecto ya se han descrito anteriormente para las proteínas Rep.

[0031] En una forma de realización preferida de la invención, la segunda secuencia de nucleótidos presente en las células de insecto de la invención, es decir la secuencia comprendiendo al menos un ITR parvoviral (AAV), comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por el que preferiblemente la al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés se incorpora al genoma de un vector parvoviral recombinante (rAAV) producido en la célula de insecto. Preferiblemente, la al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés es una secuencia para la expresión en una célula de mamífero. Preferiblemente, la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales (AAV) y donde al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está localizada entre las dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales (AAV). Preferiblemente,

la secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés (para la expresión en la célula de mamífero) se incorporará en el vector parvoviral recombinante (rAAV) producido en la célula de insecto si se localiza entre dos ITR regulares, o se localiza a cada lado de una ITR diseñada con dos regiones D.

5 **[0032]** La segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en el presente documento puede comprender así una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un "producto génico de interés" para la expresión en una célula de mamífero, situado de manera que se incorporarán en un vector parvoviral recombinante (rAAV) replicado en la célula de insecto. Cualquier secuencia de nucleótidos se puede incorporar para la expresión posterior en una célula de mamífero transfectada con el vector parvoviral recombinante (rAAV) producido conforme a la presente invención. La secuencia de nucleótidos puede por ejemplo codificar una proteína puede expresar un agente de 10 ARNi, es decir, una molécula de ARN que es capaz de una interferencia de ARN como por ejemplo un ARNh_c (ARN de horquilla corta) o un ARNip (ARN pequeño de interferencia). "ARNip" significa un ARN pequeño de interferencia que es un ARN bicatenario de longitud corta que no es tóxico en células de mamífero (Elbashir et al., 2001, *Nature* 411: 494-98; Caplen et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 98: 9742-47). En una forma de realización preferida, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender dos secuencias de nucleótidos y cada una codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero. Cada una de las dos 15 secuencias de nucleótidos que codifican un producto de interés está localizada de manera que se incorporará en un vector parvoviral recombinante (rAAV) replicado en la célula de insecto.

20 **[0033]** El producto de interés para la expresión en una célula de mamífero puede ser un producto génico terapéutico. Un producto génico terapéutico puede ser un polipéptido, o una molécula de ARN (ARNip), u otro producto génico que, cuando se expresa en una célula diana, proporciona un efecto terapéutico deseado tal como por ejemplo la ablación de una actividad no deseada, por ejemplo la ablación de una célula infectada, o la complementación de un defecto genético, por ejemplo que causa una deficiencia en una actividad enzimática. Los ejemplos de productos genéticos de polipéptidos terapéuticos incluyen CFTR, Factor IX, lipoproteína-lipasa, (LPL preferiblemente LPL S447X; véase el documento WO 01/00220), apolipoproteína A1, uridinadifosfato 25 glucuronosiltransferasa (UGT), proteína de interacción de regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RP-GRIP), y citocinas o interleucinas como por ejemplo IL-10.

30 **[0034]** Alternativamente, o además como un segundo producto génico, la segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que sirve como proteínas marcadoras para evaluar la expresión y la transformación celular. Las proteínas marcadoras adecuadas para este fin son por ejemplo la proteína fluorescente GFP y genes marcadores seleccionables de la timidina-cinasa de HSV (para la selección en medio HAT), higromicina B fosfotransferasa bacteriana (para la selección en higromicina B), Tn5 aminoglucósido-fosfotransferasa (para la selección con G418), y dihidrofolato reductasa (DHFR) (para la selección en metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Se han previsto fuentes para la obtención de estos genes marcadores y métodos para 35 su uso en Sambrook & Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3^a ed), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Además, la segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que puede servir como un mecanismo a prueba de fallos que permite curar a un sujeto de células transducidas con el vector parvoviral recombinante (rAAV) de la invención, si se considera necesario. Tal secuencia 40 de nucleótidos, a menudo referida como un gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que sea capaz de matar las células transgénicas en las que se expresa la proteína. Los ejemplos adecuados de tales genes suicidas incluyen por ejemplo el gen de citosina desaminasa de *E. coli* o uno de los genes de timidina-cinasa del virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de varicela-zóster, en cuyo caso se puede usar ganciclovir como profármaco para matar las células transgénicas en el sujeto (véase 45 por ejemplo Clair et al., 1987, *Antimicrob. Agentes Chemoter.* 31: 844-849).

50 **[0035]** En otra forma de realización uno de los productos genéticos de interés puede ser una proteína de AAV. En particular, una proteína Rep, tal como Rep78 o Rep68, o un fragmento funcional de la misma. Una secuencia de nucleótidos que codifica una Rep78 y/o una Rep68, si está presente en el genoma de un vector parvoviral recombinante (rAAV) de la invención y expresado en una célula de mamífero transducida con el vector, permite la integración del vector parvoviral recombinante (rAAV) en el genoma de la célula de mamífero transducida. La expresión de la Rep78 y/o Rep68 en una célula de mamífero transducida rAAV o infectada puede proporcionar una ventaja para determinados usos del vector parvoviral recombinante (rAAV), al permitir una expresión permanente o a largo plazo de cualquier otro producto génico de interés introducido en la célula por el vector.

55 **[0036]** En los vectores parvovirales recombinantes (rAAV) de la invención la al menos una secuencia(s) de nucleótidos que codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero, preferiblemente está(n) unidos operativamente a al menos una secuencia de control de expresión compatible con células de mamífero, por ejemplo, un promotor. Muchos de estos promotores se conocen en la técnica (véase Sambrook y Russel, 2001, *supra*). Se pueden usar promotores constitutivos que se expresan en términos generales en muchos tipos de célula, tales como el promotor CMV. Sin embargo, serán más preferidos los promotores que sean inducibles, específicos del tejido, específicos del tipo de célula, o específicos del ciclo celular. Por ejemplo, 60 para la expresión específica del hígado se puede seleccionar un promotor a partir de un promotor de α 1-anti-

tripsina, un promotor de globulina de unión a la hormona tiroidea, un promotor de albúmina, promotor LPS (globulina de unión a tiroxina), promotor de HCR-ApoCII híbrido, promotor de HCR-hAAT híbrido y un promotor de apolipoproteína E. Otros ejemplos incluyen el promotor E2F para la expresión selectiva de tumores, y, en particular, selectiva de tumores de células neurológicas (Parr et al., 1997, *Nat. Med.* 3:1145-9) o el promotor IL-2 para su uso en células mononucleares de la sangre (Hagenbaugh et al., 1997, *J Exp Med*; 185: 2101-10).

[0037] El AAV es capaz de infectar un número de células de mamíferos. Véase, por ejemplo, Tratschin et al. (1985, *Mol. Cell Biol.* 5:3251-3260) y Grimm et al. (1999, *Hum. Gene Ther.* 10:2445-2450). Sin embargo, la transducción de AAV de fibroblastos sinoviales humanos es significativamente más eficiente que en células murinas similares, Jennings et al., *Arthritis Res*, 3:1 (2001), y la tropicidad celular del AAV difiere entre serotipos. Véase, por ejemplo, Davidson et al. (2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3428-3432), que analizan las diferencias entre AAV2, AAV4, y AAV5 con respecto al tropismo de las células del CNS de mamíferos y la eficiencia de transducción.

[0038] Las secuencias de AAV que se pueden usar en la presente invención para la producción de vectores de AAV recombinantes en células de insecto se pueden derivar del genoma de cualquier serotipo de AAV. Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa en el nivel del aminoácido y del ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los varios serotipos de AAV y una visión de conjunto de las similitudes genómicas véase por ejemplo el número de registro de GenBank U89790; el número de registro de GenBank J01901; el número de registro de GenBank AF043303; el número de registro de GenBank AF085716; Chlorini et al. (1997, *J. Vir.* 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, *J. Vir.* 45:555-64); Chlorini et al. (1999, *J. Vir.* 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, *J. Vir.* 72:309-319); y Wu et al. (2000, *J. Vir.* 74: 8635-47). Los serotipos de AAV 1, 2, 3, 4 y 5 son la fuente preferida de secuencias de nucleótidos de AAV para su uso en el contexto de la presente invención. Preferiblemente las secuencias ITR de AAV para su uso en el contexto de la presente invención se derivan de AAV1, AAV2, y/o AAV4. Asimismo, las secuencias codificantes Rep (Rep78 y Rep52) se derivan preferiblemente de AAV1, AAV2, y/o AAV4. Las secuencias codificantes para las proteínas de la cápside VP1, VP2, y VP3 para su uso en el contexto de la presente invención pueden sin embargo tomarse de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o de partículas de tipo AAV recién desarrolladas obtenidas por ejemplo por técnicas de redistribución de cápside y bibliotecas de cápsides de AAV.

[0039] Las secuencias de ITR y AAV Rep se conservan particularmente entre la mayoría de serotipos. Las proteínas Rep78 de varios serotipos de AAV son por ejemplo idénticos en más de un 89 % y la identidad de secuencia de nucleótidos total en el nivel de genoma entre AAV2; AAV3A, AAV3B, y AAV6 es de alrededor del 82 % (Bantel-Schaal et al., 1999, *J. Virol.*, 73(2):939-947). Además, se sabe que las secuencias Rep e ITR de muchos serotipos de AAV complementan de forma cruzada eficazmente (es decir, sustituyen funcionalmente) las secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células de mamíferos. El documento US2003148506 informa de que las secuencias Rep e ITR también complementan de forma cruzada eficazmente otras secuencias Rep e ITR en células de insecto.

[0040] Se sabe que las proteínas VP de AAV determinan la tropicidad celular del virión de AAV. Las secuencias codificantes de proteínas VP están significativamente menos conservadas que las proteínas Rep y los genes entre serotipos de AAV diferentes. La capacidad de Rep y secuencias ITR de complementar de forma cruzada las secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas de rAAV pseudotipadas comprendiendo las proteínas de la cápside de un serotipo (por ejemplo, AAV3) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2). Tales partículas rAAV pseudotipadas son una parte de la presente invención.

[0041] Las secuencias de "AAV" modificadas también se pueden usar en el contexto de la presente invención, por ejemplo para la producción de vectores rAAV en células de insecto. Tales secuencias modificadas por ejemplo incluyen secuencias que tienen al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o más identidad de secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos (por ejemplo, una secuencia que presente aproximadamente un 75-99 % de identidad de secuencia de nucleótidos) con un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o ITR de AAV9, Rep, o VP se pueden usar en lugar de secuencias de ITR de AAV, Rep, o VP de tipo salvaje.

[0042] Aunque es similar a otros serotipos de AAV en muchos aspectos, el AAV5 difiere de otros serotipos de AAV humanos y símicos más que otros serotipos humanos y símicos conocidos. En vista de ello, la producción de rAAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en células de insecto. Donde se emplean métodos de la invención para producir rAAV5, se prefiere que uno o más constructos que comprenden, colectivamente en el caso de más de un constructo, una secuencia de nucleótidos que comprende una ITR de AAV5, una secuencia de nucleótidos comprende una secuencia codificante Rep de AAV5 (es decir una secuencia de nucleótidos comprende un AAV5 Rep78). Tales secuencias Rep e ITR se pueden modificar como se desee para obtener una producción eficiente de rAAV5 o de vectores de rAAV5 pseudotipados en células de insecto. Por ejemplo, el codón de inicio

de las secuencias Rep se puede modificar, sitios de empalme de VP se pueden modificar o eliminar, y/o el codón de inicio VP1 y los nucleótidos cercanos se pueden modificar para mejorar la producción de vectores rAAV5 en la célula de insecto.

5 **[0043]** En otro aspecto la invención se refiere así a un método para la producción de un virión parvoviral recombinante (rAAV) (que comprende un vector parvoviral recombinante (rAAV) tal como se ha definido anteriormente) en una célula de insecto. Preferiblemente, el método comprende las etapas de: (a) cultivar de una célula de insecto como se ha definido anteriormente en el presente documento en tales condiciones que se produzca el vector parvoviral recombinante (rAAV); y, (b) recuperar el vector parvoviral recombinante (rAAV). Se entiende aquí que el vector parvoviral recombinante (rAAV) producido en el método es preferiblemente un virión de AAV o parvoviral infeccioso que comprenden los ácidos nucleicos del vector parvoviral recombinante (rAAV).
10 Las condiciones de crecimiento para las células de insecto en cultivo, y la producción de productos heterólogos en células de insecto en cultivo se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo en las referencias anteriores citadas sobre ingeniería molecular de células de insectos.

15 **[0044]** Preferiblemente el método comprende además el paso de la purificación de la afinidad de los (viriones comprendiendo el) vector parvoviral recombinante (rAAV) que usa un anticuerpo anti-AAV, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo anti-AAV es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo especialmente adecuado es un anticuerpo de camélido monocatenario o un fragmento del mismo como por ejemplo uno obtenible de camellos o llamas (véase por ejemplo Muyldermans, 2001, *Biotechnol.* 74: 277-302). El anticuerpo para la purificación de la afinidad del rAAV es preferiblemente un anticuerpo que se enlaza específicamente a un
20 epítipo en una proteína de la cápside de AAV, por el que preferiblemente el epítipo es un epítipo que está presente en una proteína de la cápside de más de un serotipo de AAV. Por ejemplo el anticuerpo se puede elevar o seleccionar basándose en un enlace específico a la cápside de AAV2 pero al mismo tiempo también puede enlazarse específicamente a las cápsides de AAV1, AAV3 y AAV5.

25 **[0045]** En un aspecto adicional la invención se refiere a un virión de rAAV producido en los métodos descritos anteriormente de la invención, usando los constructos de ácido nucleico y las células tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente el virión de rAAV comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por la que al menos una secuencia de nucleótidos no es una secuencia de nucleótidos de AAV nativa, y por la cual en la estequiometría de las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2, y VP3 la cantidad de VP1: (a) es al menos un 100, 105, 110, 120, 150, 200 o 400 % de la cantidad de VP2; o (b)
30 es al menos un 8, 10, 10.5, 11, 12, 15, 20 o 40 % de la cantidad de VP3; o (c) es al menos tal y como se define tanto en (a) como en (b). Preferiblemente, la cantidad de VP1, VP2 y VP3 se determina usando un anticuerpo que reconoce un epítipo que es común a cada de VP1, VP2 y VP3. Varios inmunoensayos están disponibles en la técnica que permitirá cuantificarán las cantidades relativas de VP1, VP2 y/o VP3 (véase por ejemplo *Using Antibodies*, E. Harlow & D. Lane, 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Un anticuerpo adecuado que reconoce un epítipo que es común para cada una de las tres proteínas de la cápside es por ejemplo el anticuerpo B1 anti-Cap de ratón (como está comercialmente disponible de Progen, Alemania). Un virión de rAAV preferido según la invención es un virión que comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por el que al menos una secuencia de nucleótidos no es una secuencia de nucleótidos de AAV nativa, y por la cual el virión de AAV comprende un VP1 la proteína de la cápside comprende
40 una leucina o una valina en la posición de aminoácido 1. Un virión de AAV más preferido según la invención tiene la proporción de proteínas de la cápside tal como se ha definido anteriormente y comprende un VP1 la proteína de la cápside comprende una leucina o una valina en la posición de aminoácido 1.

45 **[0046]** En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa así normalmente "al menos uno/a".

Descripción de las figuras

50 **[0047]**

Figura 1:

A) Organización de la expresión Rep en el genoma de AAV tipo salvaje. Los genes de Rep78 y Rep 52 se expresan a partir del promotor P5 y P19 respectivamente. La expresión del Rep68 y Rep40 (que son las variantes insertadas de resp. Rep78 y Rep52) no se muestran.
55 B) El constructo de la invención tiene el ORF Rep bajo el control de un único promotor (por ejemplo el promotor poliedro (PolH)). Este promotor conduce la expresión tanto de Rep78 como de Rep52 porque el codón de inicio ATG Rep78 se convierte al codón de inicio ACG alterno y es omitido parcialmente por el ribosoma.

C) El constructo original por Urabe et al. (2002; *supra*) impulsa el Rep78 y Rep52 independientemente de dos promotores diferentes (resp. Δ IE1 y polH).

5 Figura 2: Análisis por Western blot de proteínas Rep expresadas a partir de baculovirus recombinante que se pasó 5 veces en células de insecto. El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (REP/Bac-to-Bac original) resulta en una reducción lenta de la expresión del Rep78/52 durante 5 pasajes. La unidad de expresión para el Rep78 y 52 diseñada por Urabe et al., 2002 insertada en la estructura de baculovirus PSC (REP/PSC original) también da como resultado una reducción de la expresión de Rep78/52 tras el pasaje en células de insecto. Sin embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP con el codón de inicio ACG en la estructura PSC (REP-ACG/PSC) da como resultado la expresión estable del Rep78/52 durante al menos 5 pasajes. El análisis por Western blot se realizó como se ha descrito en ejemplo 1.1.3.

Figura 3: Resultados de la Tabla 1 representados en un gráfico.

15 Figura 4: Comparación de las estabildades de varias construcciones de rAAV en células de insecto. La producción de rAAV en células SF+ se realizó como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Para todas producciones el baculovirus que contiene ITR y el gen de la cápside que contiene baculovirus eran idénticos, el número de pasaje era el mismo que el gen Rep que contiene baculovirus. se usaron 4 genes Rep diferentes que contienen baculovirus: 1) el REP-ACG/PSC, 2) SLR: el constructo original por Urabe et al. (2002, *supra*), 3) Rep52 + Rep78(B2B): Dos baculovirus Bac-to-Bac separados, uno con el gen Rep 78 y el otro con el gen Rep 52. 4) Rep52 + Rep78(PSC): Dos baculovirus de Protein Science separados uno conteniendo el gen Rep 78 y el otro conteniendo el gen Rep 52.

20 Figura 5: Estabilidad de los constructos de baculovirus REP-ACG / PSC hasta el pasaje 8. Las producciones de rAAV en células SF + se realizaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

25 Figura 6: Comparación del efecto del efecto del pasaje en la expresión de la proteína rep del constructo original de Urabe et al. (2002; *supra*) con un constructo REP-ACG / PSC conforme a la invención. Los pasajes de baculovirus y el Western blot se hicieron tal como se ha descrito en ejemplo 1. Durante un pasaje normal de los baculovirus rep, se tomaron muestras 40 horas después de la adición de los baculovirus a las células SF y se realizó un Western blot.

Ejemplos

Ejemplo 1: Constructos Rep

1.1. Materiales y métodos

30 1.1.1 Construcción de plásmidos de Baculovirus

[0048] Para expresar el Rep78 y Rep52 a partir de un único ARN mensajero bicistrónico, el codón de inicio ATG de Rep78 situado en el vector de expresión pFastBacDualSLR (Urabe et al., 2002, *supra*) fue convertido en ACG. El cebador previo usado fue:

35 BamHI
5'-cgcggatcctgtaagACGGCGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTC-3' (SEQ ID N.º 8)

Secuencia de cebador directa

[0049] El cebador-3' que fue usado en la reacción por PCR estaba flanqueando el gen REP78 y contiene un sitio de XbaI (TCTAGA):

40 XbaI
5' -AGGCTCTAGATTTCGAAAGCGGCCCG-3
(SEQ ID N.º 9)

Secuencia de cebador inversa

45 **[0050]** La secuencia entre el conjunto de cebador anteriormente mencionado se amplificó por PCR (volumen de reacción 50 μ l; 1x Tampón Pfx Amp., 0,3 mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 150mM cebador directo, 150mM cebador inverso, 2x solución intensificadora, plantilla 50 ng (pFastBacDualSLR), 1 U Platinum Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) usando el siguiente protocolo: 1 ciclo de 95 °C, 5 min; 35 ciclos de 95 °C, 15 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 1 ciclo de 72 °C, 10 min; 4 °C, para siempre). El producto de la PCR fue clonado en PCR-blunt II-TOPO usando el kit de clonación de Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen). El Rep78 fue subclonado en pFastBacDual (Invitrogen) utilizando los sitios de restricción SpeI y XbaI. El casete de expresión Rep mutado fue clonado finalmente (utilizando las enzimas de restricción BstZ17I y AvrII) en el constructo de expresión de baculovirus (abierto con EcoRV y XbaI) pPSC10 (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT, EE. UU.). El análisis de las secuencias del constructo se verificó por Baseclear, Leiden, Países Bajos.

50

1.1.2 Producción de baculovirus recombinante

[0051] Los baculovirus recombinantes derivados del virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) fueron producidos usando el GeneXpress BaculoKIT (Protein Sciences Corporation). La transfección fue realizada de la siguiente manera: en un tubo de fondo redondo de 14ml se mezclaron 200 µl medio GRACE con 6 µl de cellfectina (Invitrogen), y en un tubo Eppendorf de 200 µl se mezcló medio GRACE con 50 µl de ADN viral (Protein Sciences) y 2 µg de plásmido de transferencia (REP). El contenido del tubo de Eppendorf se añadió al tubo y se mezcló cuidadosamente. Después un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se añadió 1 300 µl de GRACE a la mezcla de transfección. Se lavaron células de insecto en un matraz T25 con medio GRACE y la mezcla de transfección se añadió gota a gota a la capa celular. Después una incubación de 6 horas a 28 °C se añadió cuidadosamente suero suplementado SF900II con FBS al 10 % y el matraz T25 se puso en una estufa 28 °C durante 5 días tras los que se cosechó el baculovirus recombinante.

1.1.3 Análisis por Western blot

[0052] Las células de insecto (SF+) se infectaron con baculovirus-REP. Tras 16, 40, y 64 horas tras la infección de las células se tomó una muestra y se lisaron las células mediante la adición de un tampón de lisis 0,1V 10 x TRIS (1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS, 0,01 M MgCl, Tritón X-100 al 1 %, pH 8,5, filtro esterilizado) y se incubó a 28 °C durante 30 minutos en un agitador (Innova 44, New Brunswick). El ADN y ARN libres se degradaron por incubación con benzonasa a 37 °C durante 30 minutos. El lisado celular fue centrifugado (1 900 x g; 15 min; 4 °C). El tampón de muestra NuPAGE LDS (4x; Invitrogen) fue añadido a una muestra del sobrenadante y se cargó sobre un gel Bis-Tris al 4-12 % (120V). Se transfirieron proteínas a una membrana PVDF (BioRad) durante 30 minutos, 10V (transferencia semiseca). Se realizó una inmunoquímica Western bloqueando la membrana con tampón de bloqueo Superblock-PBS (PIERCE) y una incubación posterior con anti-rep de ratón (303.9, Progen, Alemania; dilución 1:50) y HRP anti-ratón de conejo (DAKO, dilución 1:500). Las proteínas Rep se visualizaron por tinción quimioluminiscente con lumi-light más sustrato de Western blot (Roche).

1.2 Resultados

[0053] El rendimiento del constructo Rep recién diseñado de la invención (REP-ACG / PSC) fue comparado con los constructos Rep originales tanto en 1) estructura de baculovirus PSC como en 2) estructura de baculovirus Bac-to-Bac (Urabe et al., 2002). Estas tres construcciones se pasaron en serie hasta el pasaje 5. Se realizaron experimentos de producción de AAV1-LPL usando constructos Rep del pasaje 2, 3, 4 y 5 en combinación con un baculovirus recombinante AAV-Cap y un AAV-LPL respectivamente del pasaje 2, 3, 4 y 5 (los baculovirus AAV-Cap y AAV-LPL recombinantes usados aquí se describen más abajo en el ejemplo 2). Se determinaron los rendimientos de producción AAV1-LPL por qPCR y se muestran en la tabla 1. El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (REP/Bac-to-Bac original) da como resultado una reducción rápida de la producción de AAV durante 5 pasajes. La unidad de expresión para el Rep diseñada por Urabe et al., 2002 insertada en la estructura de baculovirus PSC (REP / PSC original) también da como resultado una reducción de la producción de AAV tras los pasajes en células de insecto. Sin embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP conteniendo el codón de inicio ACG en la estructura PSC (REP-ACG / PSC) da como resultado la producción de AAV estable durante al menos 5 pasajes. Por lo tanto, los rendimientos de producción reproducibles de AAV-LPL en varios pasajes (por ejemplo de 2 a 5) se obtuvieron solo usando baculovirus que contiene el constructo REP-ACG.

Tabla 1: Producción de viriones de rAAV utilizando las construcciones de baculovirus de varios pasajes: se infectaron células Sf9 con tres baculovirus recombinantes que codifican una unidad de vector LPL del pasaje 2, 3, 4 o 5, una unidad de expresión Rep del pasaje 2, 3, 4 o 5 y una unidad de expresión Cap del pasaje 2, 3, 4 o 5. Después tres días se cosecharon las células y se determinaron los rendimientos del AAV (genomas de vector por ml; vg/ml) mediante qPCR.

pasaje	REP / PSC original vg/ml	REP-ACG / PSC vg/ml	REP / Bac-to-Bac original vg/ml
2	5.38E+09	3.04E+09	3.62E+10
3	9.57E+09	4.77E+09	7.28E+09
4	1.66E+09	7.81E+09	7.59E+08
5	7.35E+08	9.90E+09	2.03E+08

Tabla 2: Q-PCR realizada en los diversos constructos de Bac-Rep después del pasaje en células de insecto (Pasaje 2-5).

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

5 **[0054]** La Tabla 2 muestra los resultados de un análisis por PCR cuantitativa (q-PCR) que fue diseñado para la
 unidad de expresión Rep en los baculovirus recombinantes y para un baculovirus ORF flanqueante (copias de gen
 por ml; gc's/ml). La proporción entre los valores de la Q-PCR determina la presencia de delecciones en el baculovirus
 Rep. Una proporción de 1 teóricamente significa que todos baculovirus del lote contienen una secuencia Rep78 o
 52 recombinante. El baculovirus original diseñado por Urabe et al., 2002 (REP/Bac-to-Bac original) muestra que
 cantidades significativas del baculovirus recombinante en el pasaje 5 tienen delecciones en las secuencias Rep. La
 unidad de expresión para Rep78 y 52 diseñada por Urabe et al., 2002 insertada en la estructura de baculovirus
 PSC (REP / PSC original) muestra una pérdida muy temprana y drástica de baculovirus recombinante. Sin
 10 embargo, el baculovirus con la unidad de expresión REP que contiene el codón de inicio ACG en la estructura de
 PSC (REP-ACG / PSC) (clon C4 y A3) muestra baculovirus recombinantes estables durante al menos 5 pasajes.

Ejemplo 2: Constructos Cap

2.1.1 Construcción de plásmidos de Baculovirus

15 **[0055]** Para expresar un VP1, 2, 3 a partir de un único ARN mensajero policistrónico, el constructo de baculovirus-
 AAV-Cap fue diseñado tal como se ha descrito por (Urabe et al., 2002, *supra*). Brevemente, el codón de inicio ATG
 del VP1 se mutó a ACG. Un codón de inicio ATG potencial en la posición 11 se ha cambiado a ACG. El sitio aceptor
 de empalme más abajo del codón de inicio de VP1 fue destruido (mutación en la posición 21 y 24). El casete de
 expresión Cap mutado fue clonado en un constructo de expresión de baculovirus; pFastBacDual
 (pFBDAAV1VPm11) con sitios de restricción BamH1/StuI. Este plásmido (pFBDAAV1VPm11) fue el material de

partida para la introducción de codones de inicio alternos para VP1. El cebador directo usado por Urabe et al. (2002; *supra*) para introducir las mutaciones mencionadas fue:

BamHI 1 11 21 24 5'-cgcggatcctgtaagACGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3' (SEQ ID N.º 1)

5 **[0056]** Los siguientes cebadores directos se usaron para hacer los constructos de expresión usando pFBDAAV1VPm11 (Urabe et al., 2002, *supra*) como material de partida:

5'-cgcggatcctgtaagTTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3' (SEQ ID N.º 2)

5'-cgcggatcctgtaagATTGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3' (SEQ ID N.º 3)

5'-cgcggatcctgtaagGTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3' (SEQ ID N.º 4)

5'-cgcggatcctgtaagCTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC-3' (SEQ ID N.º 5)

10 **[0057]** El cebador inverso que se utilizó en las reacciones de la PCR con los cebadores directos anteriores se dirigió a la posición ~ 230 bp hacia abajo del codón de inicio VP1 y contiene un sitio Stu I único (AGGCCT).
5'-GTCGTAGGCCTTGTCGTGCTCGAGGGCCGC-3'
(SEQ ID N.º 6)

15 **[0058]** Se amplificaron fragmentos con los conjuntos anteriormente mencionados de pares de cebadores directos e inversos por PCR. Después de la digestión de los productos de la PCR con BamHI y StuI los productos de la PCR se subclonaron en los sitios BamHI / StuI de pFBDAAV1vpm11 dando como resultado los diversos constructos de baculovirus-AAV-Cap que se han de evaluar. Los constructos de ADN se verificaron mediante un análisis de secuencias en Baseclear, Leiden, Países Bajos.

2.1.2 Producción de baculovirus recombinante

20 **[0059]** Los baculovirus recombinantes derivados del virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) fueron producidos usando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). El rBac-Cap fue amplificado infectando 2×10^6 células Sf9 por ml a una moi de 0,1. Tres días después de la infección de las células fueron centrifugadas y se recuperó el sobrenadante que contiene el virus.

2.1.3 Producción de AAV recombinante

25 **[0060]** Se produjeron lotes de rAAV usando tres baculovirus recombinantes según Urabe et al., 2002. Sin embargo, para este estudio un baculovirus albergaba un constructo de expresión para el transgen S447X. El agente terapéuticamente activo expresado a partir del transgén es una variante de origen natural de lipoproteína-lipasa humana, un polipéptido monocatenario de 448 aminoácidos. La variante S447X tiene una delección de dos aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína. El segundo baculovirus albergaba un constructo de expresión
30 para los genes de replicación de AAV, Rep 78 y Rep 52. El tercer baculovirus albergó la secuencia de la cápside AAV1 con un codón de inicio ACG o TTG, CTG, GTG para VP1.

[0061] Los lotes de rAAV de mamífero producidos con el sistema de transfección de plásmidos fueron producidos según Grimm et al., 1998 (*Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors*. *Hum Gene Ther*. 1998 Dic 10;9(18):2745-60).

35 2.1.3 Análisis por Western blot

[0062] Se infectaron células de insecto con baculovirus-Cap. A los tres días después de la infección las células se centrifugaron (3 000 g; 15 min). El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro Millex de 0,22µm. El tampón de muestra NuPAGE (Invitrogen) LDS fue añadido a una muestra del sobrenadante y se cargó en un gel Bis-Tris al 4-12 %. El gel se ejecutó a 100V. Se transfirieron proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante 1 hora, 100 V, 350 mA. Se realizó una inmunoquímica Western bloqueando la membrana con Marvel al 1 %, leche desnatada seca y una incubación posterior con anti-Cap de ratón (B1 de Progen, Alemania; dilución 1:50) y HRP anti-ratón de conejo (DAKO, dilución 1:100). Se visualizó el VP1, 2 y 3 por tinción quimioluminiscente con lumi-light más sustrato de Western blot (Roche).

2.1.4 Mediciones bioquímicas

45 **[0063]** Se evaluó la actividad de LPL^{S447X} humana tal y como se ha descrito anteriormente usando un sustrato de emulsión de trioleoilglicerol radiactivo (Nilsson-Ehle y Scholtz, 1976). La masa inmunorreactiva de LPL^{S447X} humana fue evaluada usando un ELISA sándwich con anticuerpos anti-hLPL IgY de pollo y 5D2 de ratón (Liu et al., 2000). Se midieron los niveles de triglicéridos del plasma usando kits comerciales siguiendo los protocolos de fabricante (Boehringer Mannheim, #450032).

50 2.2 Resultados

2.2.1 Construcción de baculovirus recombinante

[0064] Para introducir diferentes codones de inicio alternos para la expresión de VP1 en el plásmido de baculovirus diseñado por Urabe et al. (2002; *supra*) se diseñó una serie de cebadores anteriores con un sitio de restricción de BamHI y o un codón TTG, ATT, GTG o CTG en lugar del codón de inicio ACG del VP1. La PCR que usa estos cebadores en combinación con un cebador posterior que contiene un sitio *StuI* dio como resultado fragmentos amplificados que fueron subclonados en el sitio BamHI/*StuI* de pFBDVPm11 (Bac-Cap). Los plásmidos de baculovirus resultantes se usaron para la preparación de baculovirus recombinantes usando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac. Los baculovirus recombinantes preparados se infectaron en células de insecto para producir cápsides de AAV. A los tres días después de la infección se determinó la expresión de la proteína viral de los diferentes lotes de baculovirus en Western blots. A partir de los Western blots se hizo evidente que el constructo de baculovirus que contenía el codón de inicio TTG para VP1 expresó esta proteína a un nivel más alto en comparación con el codón de inicio ACG utilizado previamente. La proporción entre VP1 y VP2 usando el codón TTG resultó ser de 1:1 que es similar a lo que se ha registrado para AAV de tipo salvaje (no mostrado).

2.2.2 Infección de lotes de rAAV en células en cultivo

[0065] Para investigar la infectividad de las cápsides de AAV derivadas de baculovirus recombinantes con el codón de inicio TTG se generó el rAAV. También se generó un lote de rAAV por transfección de plásmidos en células de mamífero HEK293. Se determinó un título del genoma del vector de ambos lotes de rAAV mediante qPCR. Esta graduación se usó para infectar células HEK 293 en una placa de microtitulación con una *moi* en aumento. Dos días después de la infección un ensayo cuantitativo (ensayo LPL^{S447X} de masas) para el producto transgénico (LPL^{S447X}) se realizó en el medio de las células infectadas. El ensayo mostró que la cantidad de LPL^{S447X} producida por rAAV producido por baculovirus fue similar a la LPL producida por el rAAV producido por plásmidos (no mostrado).

2.2.3 Inyección de lotes de rAAV en ratones

[0066] Los lotes de rAAV producidos con el sistema de producción de baculovirus y con el sistema de producción de plásmidos de mamífero convencional se inyectaron por vía intramuscular en ratones para seguir la actividad de la proteína LPL^{S447X} y los triglicéridos en ayunas *in vivo*. A los 3 días, 7 días y 2 semanas después de la inyección se tomaron muestras de sangre y se evaluaron. Entre 3 y 7 días después de la administración del virus, se tomó una muestra de plasma sanguíneo de ambos ratones inyectados con rAAV de mamífero y un ratón inyectado con baculo-rAAV pasó de ser lechoso a completamente transparente. El plasma sanguíneo derivado de un ratón inyectado con baculo-rAAV permaneció relativamente lechoso sin embargo el nivel de grasa se redujo claramente. Los niveles de triglicéridos se redujeron respectivamente de todos los ratones tratados (no mostrado). El día 14, los niveles de TG en ratones tratados tanto con AAV de mamífero como con baculovirus-(TTG)-AAV se redujeron en un 96 %. Las muestras de plasma tomadas dos semanas después de la administración del virus mostraron que la actividad de la LPL^{S447X} de los ratones tratados con AAV de baculovirus y AAV de mamífero fue similar (no mostrado).

Ejemplo 3: Estabilidad de los constructos de rAAV con un codón de inicio Rep 78 modificado en células de insecto

3.1 Comparación de las estabildades de varios constructos de rAAV en células de insecto

[0067] Las producciones de rAAV en células SF + se realizaron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Para todas producciones el baculovirus que contiene ITR y el gen de la cápside que contiene baculovirus eran idénticos, el número de pasaje era el mismo que el gen Rep que contiene baculovirus. se usaron 4 genes Rep diferentes que contienen baculovirus: 1) el REP-ACG/PSC, 2) SLR: el constructo original por Urabe et al. (2002, *supra*), 3) Rep52 + Rep78(B2B): dos baculovirus Bac-to-Bac separados, uno con el gen Rep 78 y el otro con el gen Rep 52. 4) Rep52 + Rep78(PSC): dos baculovirus de ciencias de proteínas separadas uno conteniendo el gen Rep 78 y el otro con el gen Rep 52.

[0068] Los resultados se muestran en la figura 4. En el quinto pase de baculovirus, la producción de rAAV ya ha mejorado en más de un factor 10 usando un REP-ACG / PSC conforme a invención en comparación con el constructo Rep original y en comparación con los constructos Rep divididos.

3.2 Estabilidad de los constructos de baculovirus hasta el pasaje 8

[0069] Las producciones de rAAV en células SF + se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Para todas producciones el baculovirus que contiene ITR y el gen de la cápside que contiene baculovirus eran idénticos, el número de pasaje era el mismo que el baculovirus REP-ACG / PSC. Los resultados se muestran en la figura 5. El baculovirus REP-ACG / PSC es estable al menos hasta pasaje 8. Los títulos de producción de rAAV de REP-ACG / PSC son estables hasta al menos el 8° pasaje del baculovirus.

3.3 Efecto del pasaje en la expresión de proteína rep

[0070] El efecto del número de pasaje en la expresión de la proteína Rep para el constructo original de Urabe et al. (2002; *supra*) se comparó con un constructo REP-ACG / PSC conforme a la invención. Los pasajes de baculovirus y el Western blot se hicieron tal como se ha descrito en ejemplo 1. Durante un pasaje normal de los

5 baculovirus rep, se tomaron muestras 40 horas después de la adición de los baculovirus a las células SF y se realizó un Western blot. La Figura 6 muestra claramente la disminución de la expresión de Rep en los pasajes más altos en comparación con los pasajes anteriores para el constructo original de Urabe (SLR), mientras que la expresión de Rep en la construcción REP-ACG / PSC permanece igual en los pasajes más altos en comparación con los más bajos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0071]

10 <110> uniQure IP B.V.
 <120> Vectores de AAV con secuencias codificantes Rep mejoradas para la producción en células de insecto
 <130> P6009362EP1
 15 <150> EP06115804.4
 <151> 2006-06-21
 <150> US 60/815,262
 <151> 2006-06-21
 20 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.3
 25 <210> 1
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> secuencia sintética artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 1
 cgcggtatcct gtaagacgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49
 35 <210> 2
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> secuencia sintética artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 45 cgcggtatcct gtaagtgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49
 <210> 3
 <211> 49
 <212> DNA
 50 <213> secuencia sintética artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 55 cgcggtatcct gtaagattg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49
 <210> 4
 <211> 49
 <212> DNA
 60 <213> secuencia sintética artificial

ES 2 785 223 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 4
 5 cgcgatcct gtaaggtgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49

 <210> 5
 <211> 49
 <212> DNA
 10 <213> secuencia sintética artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 5
 15 cgcgatcct gtaagctgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc 49

 <210> 6
 <211> 30
 20 <212> DNA
 <213> secuencia sintética artificial

 <220>
 <223> primer
 25

 <400> 6
 gtcgtaggcc ttgtcgtcct cgagggccgc 30

 <210> 7
 <211> 9
 30 <212> DNA
 <213> virus adeno-asociado 2

 <400> 7
 35 cctgtaag 9

 <210> 8
 <211> 49
 <212> DNA
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 8
 45 cgcgatcct gtaagacgg cggggttta cgagatttg attaggtc 49

 <210> 9
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 55

 <400> 9
 aggctctaga ttcgaaagcg gcccg 25

 <210> 10
 <211> 1876
 <212> DNA
 60 <213> virus adeno-asociado 2

 <220>
 <221> CDS
 65

ES 2 785 223 T3

<222> (11)..(1876)

<223> Rep 78

<220>

5

<221> misc_feature

<222> (683)..(1876)

<223> secuencia codificante Rep52

<400> 10

10

```

cgcgagccgcc atg ccg ggg ttt tac gag att gtg att aag gtc ccc agc      49
      Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser
      1          5          10

gac ctt gac gag cat ctg ccc ggc att tct gac agc ttt gtg aac tgg      97
Asp Leu Asp Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp
      15          20          25

gtg gcc gag aag gaa tgg gag ttg ccg cca gat tct gac atg gat ctg      145
Val Ala Glu Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu
      30          35          40          45

aat ctg att gag cag gca ccc ctg acc gtg gcc gag aag ctg cag cgc      193
Asn Leu Ile Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg
      50          55          60

gac ttt ctg acg gaa tgg cgc cgt gtg agt aag gcc ccg gag gcc ctt      241
Asp Phe Leu Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu
      65          70          75

ttc ttt gtg caa ttt gag aag gga gag agc tac ttc cac atg cac gtg      289
Phe Phe Val Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val
      80          85          90

ctc gtg gaa acc acc ggg gtg aaa tcc atg gtt ttg gga cgt ttc ctg      337
Leu Val Glu Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu
      95          100          105

agt cag att cgc gaa aaa ctg att cag aga att tac cgc ggg atc gag      385
Ser Gln Ile Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu
      110          115          120          125

ccg act ttg cca aac tgg ttc gcg gtc aca aag acc aga aat ggc gcc      433
Pro Thr Leu Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala
      130          135          140

gga ggc ggg aac aag gtg gtg gat gag tgc tac atc ccc aat tac ttg      481
Gly Gly Gly Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu
      145          150          155

ctc ccc aaa acc cag cct gag ctc cag tgg gcg tgg act aat atg gaa      529
Leu Pro Lys Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu
      160          165          170

cag tat tta agc gcc tgt ttg aat ctc acg gag cgt aaa cgg ttg gtg      577
Gln Tyr Leu Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val
      175          180          185

```

ES 2 785 223 T3

gcg cag cat ctg acg cac gtg tgg cag acg cag gag cag aac aaa gag Ala Gln His Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu 190 195 200 205	625
aat cag aat ccc aat tct gat gcg ccg gtg atc aga tca aaa act tca Asn Gln Asn Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser 210 215 220	673
gcc agg tac atg gag ctg gtc ggg tgg ctc gtg gac aag ggg att acc Ala Arg Tyr Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr 225 230 235	721
tcg gag aag cag tgg atc cag gag gac cag gcc tca tac atc tcc ttc Ser Glu Lys Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe 240 245 250	769
aat gcg gcc tcc aac tcg cgg tcc caa atc aag gct gcc ttg gac aat Asn Ala Ala Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Ala Ala Leu Asp Asn 255 260 265	817
gcg gga aag att atg agc ctg act aaa acc gcc ccc gac tac ctg gtg Ala Gly Lys Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val 270 275 280 285	865
ggc cag cag ccc gtg gag gac att tcc agc aat cgg att tat aaa att Gly Gln Gln Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile 290 295 300	913
ttg gaa cta aac ggg tac gat ccc caa tat gcg gct tcc gtc ttt ctg Leu Glu Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu 305 310 315	961
gga tgg gcc acg aaa aag ttc ggc aag agg aac acc atc tgg ctg ttt Gly Trp Ala Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe 320 325 330	1009
ggg cct gca act acc ggg aag acc aac atc gcg gag gcc ata gcc cac Gly Pro Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His 335 340 345	1057
act gtg ccc ttc tac ggg tgc gta aac tgg acc aat gag aac ttt ccc Thr Val Pro Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro 350 355 360 365	1105
ttc aac gac tgt gtc gac aag atg gtg atc tgg tgg gag gag ggg aag Phe Asn Asp Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys 370 375 380	1153
atg acc gcc aag gtc gtg gag tgg gcc aaa gcc att ctc gga gga agc Met Thr Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser 385 390 395	1201
aag gtg cgc gtg gac cag aaa tgc aag tcc tgg gcc cag ata gac ccg Lys Val Arg Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro 400 405 410	1249
act ccc gtg atc gtc acc tcc aac acc aac atg tgc gcc gtg att gac Thr Pro Val Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp 415 420 425	1297
ggg aac tca acg acc ttc gaa cac cag cag ccg ttg caa gac cgg atg Gly Asn Ser Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met 430 435 440 445	1345

ES 2 785 223 T3

ttc aaa ttt gaa ctc acc cgc cgt ctg gat cat gac ttt ggg aag gtc 1393
 Phe Lys Phe Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val
 450 455 460
 acc aag cag gaa gtc aaa gac ttt ttc cgg tgg gca aag gat cac gtg 1441
 Thr Lys Gln Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val
 465 470 475
 gtt gag gtg gag cat gaa ttc tac gtc aaa aag ggt gga gcc aag aaa 1489
 Val Glu Val Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys
 480 485 490
 aga ccc gcc ccc agt gac gca gat ata agt gag ccc aaa cgg gtg cgc 1537
 Arg Pro Ala Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg
 495 500 505
 gag tca gtt gcg cag cca tgc acg tca gac gcg gaa gct tcg atc aac 1585
 Glu Ser Val Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn
 510 515 520 525
 tac gca gac agg tac caa aac aaa tgt tct cgt cac gtg ggc atg aat 1633
 Tyr Ala Asp Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn
 530 535 540
 ctg atg ctg ttt ccc tgc aga caa tgc gag aga atg aat cag aat tca 1681
 Leu Met Leu Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser
 545 550 555
 aat atc tgc ttc act cac gga cag aaa gac tgt tta gag tgc ttt ccc 1729
 Asn Ile Cys Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro
 560 565 570
 gtg tca gaa tct caa ccc gtt tct gtc gtc aaa aag gcg tat cag aaa 1777
 Val Ser Glu Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys
 575 580 585
 ctg tgc tac att cat cat atc atg gga aag gtg cca gac gct tgc act 1825
 Leu Cys Tyr Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr
 590 595 600 605
 gcc tgc gat ctg gtc aat gtg gat ttg gat gac tgc atc ttt gaa caa 1873
 Ala Cys Asp Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln
 610 615 620
 taa 1876

<210> 11
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> virus adeno-asociado 2

<400> 11

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

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

5

10

ES 2 785 223 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys
 145 150 155 160

Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu
 165 170 175

Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His
 180 185 190

Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn
 195 200 205

Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr
 210 215 220

Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys
 225 230 235 240

Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala
 245 250 255

Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Ala Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys
 260 265 270

Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln
 275 280 285

ES 2 785 223 T3

Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu
 290 295 300

Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala
 305 310 315 320

Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala
 325 330 335

Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro
 340 345 350

Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp
 355 360 365

Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala
 370 375 380

Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg
 385 390 395 400

Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val
 405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 223 T3

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Célula de insecto que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que codifica las proteínas Rep parvovirales no estructurales Rep78 y Rep52, a partir de la cual ambas proteínas Rep52 parvovirales y Rep78 parvovirales se expresan en la célula de insecto, donde el codón de inicio para la proteína Rep78 parvoviral es un codón de inicio subóptimo.
- 10 **2.** Célula de insecto que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que codifica las proteínas Rep parvovirales no estructurales Rep78 y Rep52, a partir de la cual ambas proteínas Rep52 parvovirales y Rep78 parvovirales se expresan en la célula de insecto, donde el codón de inicio para la proteína Rep78 parvoviral es un codón de inicio ACG, y donde la primera secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep parvovirales no estructurales Rep78 y Rep52 está unida operativamente a un único promotor.
- 3.** Célula de insecto según la reivindicación 1, donde la primera secuencia de nucleótidos forma parte de un constructo de ácido nucleico, y donde la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión en una célula de insecto.
- 15 **4.** Célula de insecto según la reivindicación 3, donde la primera secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas Rep no estructurales Rep78 y Rep52 está unida operativamente a un promotor seleccionado del grupo que consiste en el promotor de poliedro, el promotor p10, el promotor p35, el promotor IE-1 y el promotor delta-IE1.
- 5.** Célula de insecto según la reivindicación 2, donde la primera secuencia de nucleótidos forma parte de un constructo de ácido nucleico, y donde la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor de poliedro.
- 20 **6.** Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula de insecto está seleccionada del grupo que consiste en Se301; SeZD2109, SeUCR1, Sf9; Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1; Tn368, HzAm1; Ha2302, Hz2E5, High Five y *expressSF+*.
- 7.** Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula de insecto comprende además una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de repetición terminal invertida (ITR) parvoviral.
- 25 **8.** Célula de insecto según la reivindicación 7, donde la célula de insecto comprende además una tercera secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral unidas operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión de proteínas Cap en la célula de insecto.
- 9.** Célula de insecto según la reivindicación 7, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales.
- 30 **10.** Célula de insecto según la reivindicación 3 o 5, donde el constructo de ácido nucleico comprendiendo la primera secuencia de nucleótidos comprende además una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral unidas operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión de proteínas Cap en la célula de insecto, y donde la célula de insecto comprende además un segundo constructo de ácido nucleico que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de repetición terminal invertida (ITR) parvoviral.
- 35 **11.** Célula de insecto según la reivindicación 10, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales.
- 12.** Célula de insecto según la reivindicación 3 o 5, donde la célula de insecto comprende además un segundo y un tercer constructo de ácido nucleico, donde:
- 40 (a) el segundo constructo de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de repetición de terminal invertida (ITR) parvoviral; y
- 45 (b) el tercer constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias codificantes de proteína Cap parvoviral unidas operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión de proteínas Cap en la célula de insecto.
- 13.** Célula de insecto según la reivindicación 12, donde la secuencia de nucleótidos de dicho segundo constructo de ácido nucleico comprende dos secuencias de nucleótidos ITR parvovirales.
- 50 **14.** Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, donde la célula de insecto está seleccionada del grupo que consiste en Se301; SeZD2109, SeUCRI, Sf9; Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1; Tn368, HzAml, Ha2302, Hz2E5, High Five and *expressSF+*.

15. Célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, donde el segundo constructo de ácido nucleico comprende además una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés posicionado en 3' o en 5' en la secuencia ITR o entre dos secuencias ITR.
- 5 16. Célula de insecto según la reivindicación 15, donde el producto génico de interés es un agente de ARNi, preferiblemente un ARNhc o un ARNip o un producto génico terapéutico.
- 10 17. Célula de insecto según la reivindicación 16, donde el producto génico terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR), Factor IX, lipoproteína lipasa (LPL), preferiblemente LPL S447X, apolipoproteína A1, uridinadifosfato glucuronosiltransferasa (EGT), proteína de interacción de regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RP-GRIP), citocina e interleucina, preferiblemente IL-10.
- 15 18. Célula de insecto según las reivindicaciones 9-14, donde el segundo constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más de los siguientes polipéptidos: proteína verde fluorescente (GFP), timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV), higromicina B fosfotransferasa, Tn5 aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR), CD20, citosina desaminasa de Escherichia coli, timidina quinasa de citomegalovirus y timidina quinasa de varicela-zóster.
19. Método para la producción de un virión parvoviral recombinante en una célula de insecto, comprendiendo el método las etapas de:
- 20 (a) cultivar la célula de insecto según cualquiera de las reivindicaciones 1-18 en condiciones tales que se produzca el vector parvoviral recombinante; y,
(b) recuperar el vector parvoviral recombinante.
20. Método según la reivindicación 19, donde en dicho método en la célula de insecto que comprende dicha primera secuencia de nucleótidos una proporción molar de Rep78 a Rep52 se produce en el rango de 1:10 - 10:1 a las 20-40 horas tras la infección utilizando la expresión de baculovirus.

Fig 1

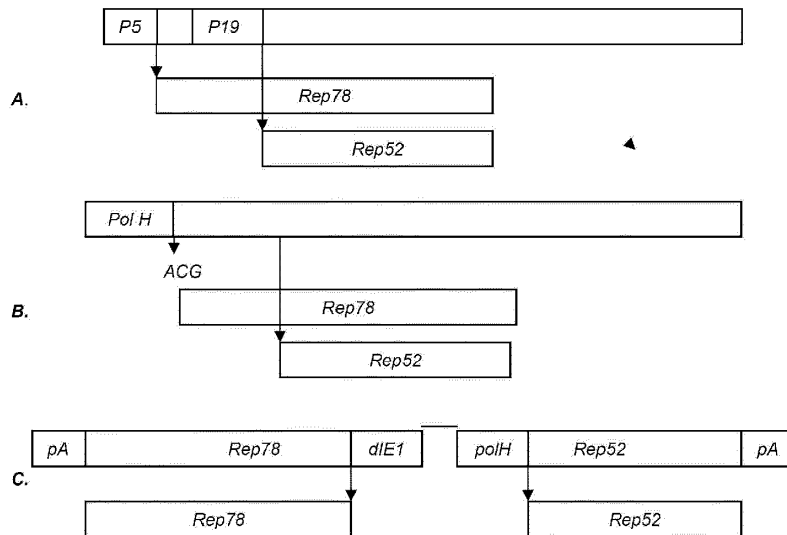
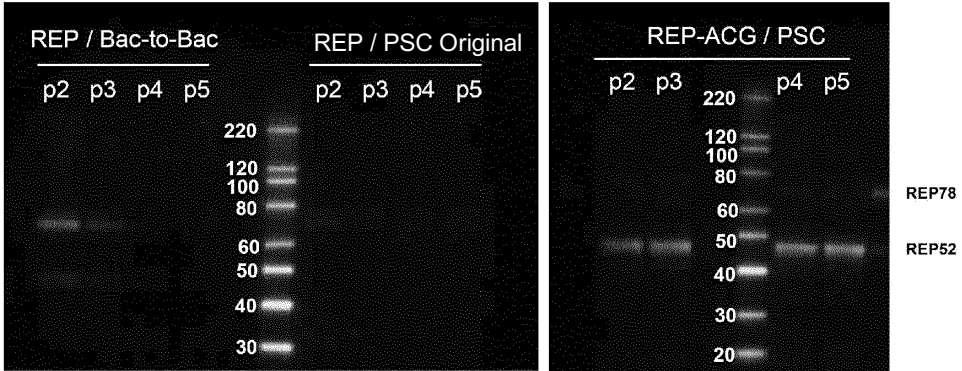
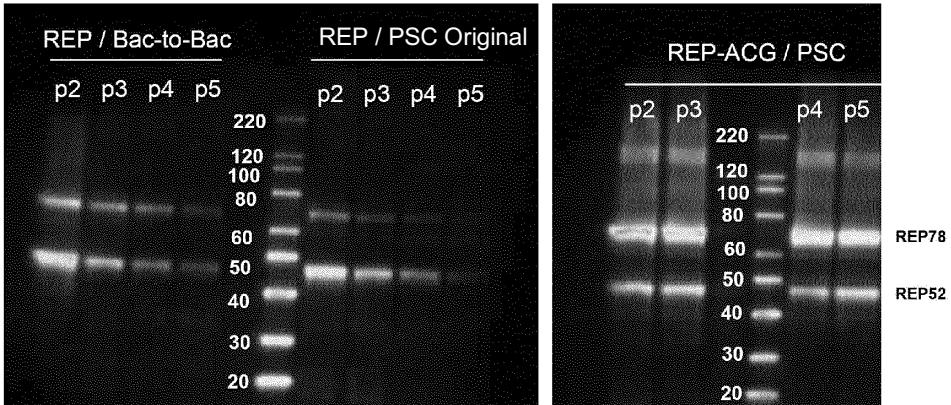


Fig 2

16 horas tras la infección:



40 horas tras la infección:



64 horas tras la infección:

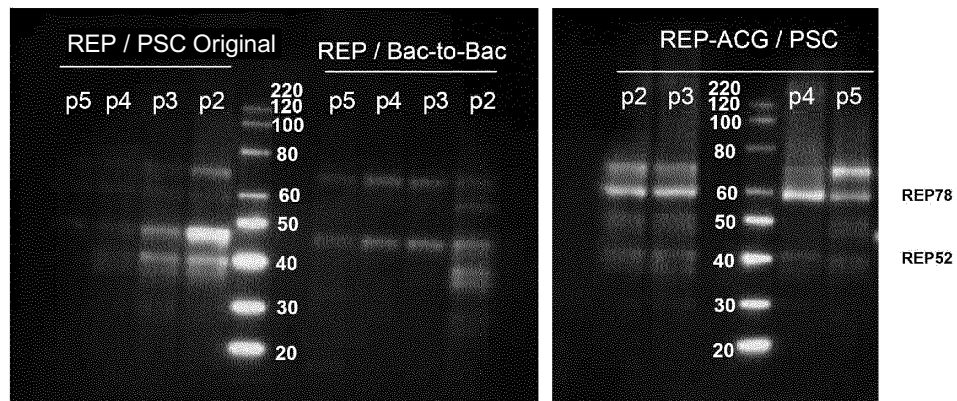


Fig 3

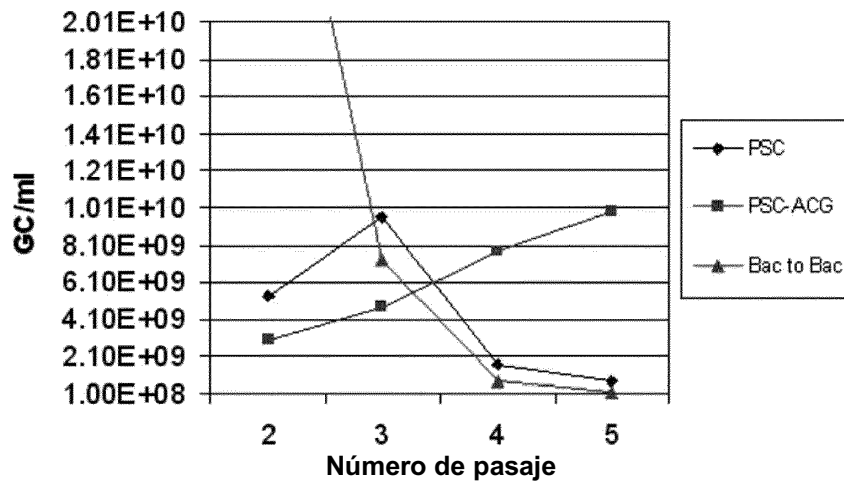


Fig 4

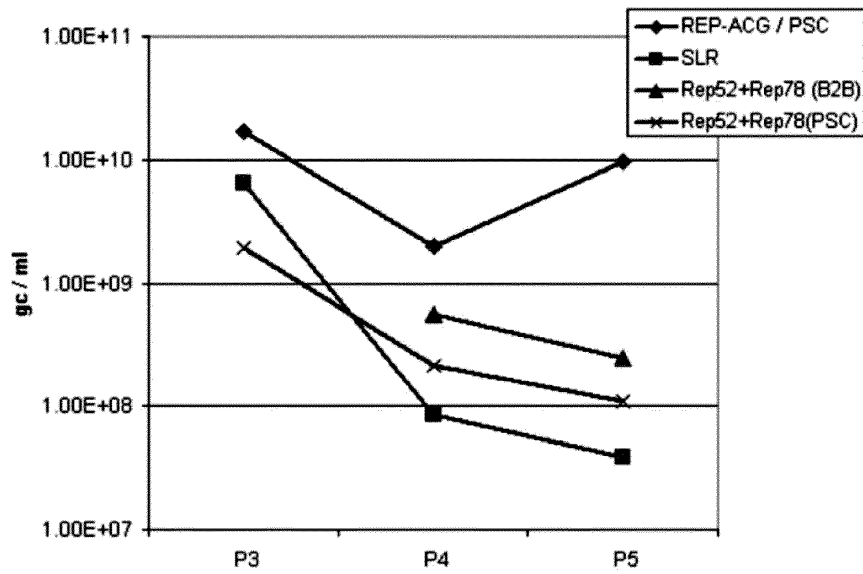


Fig 5

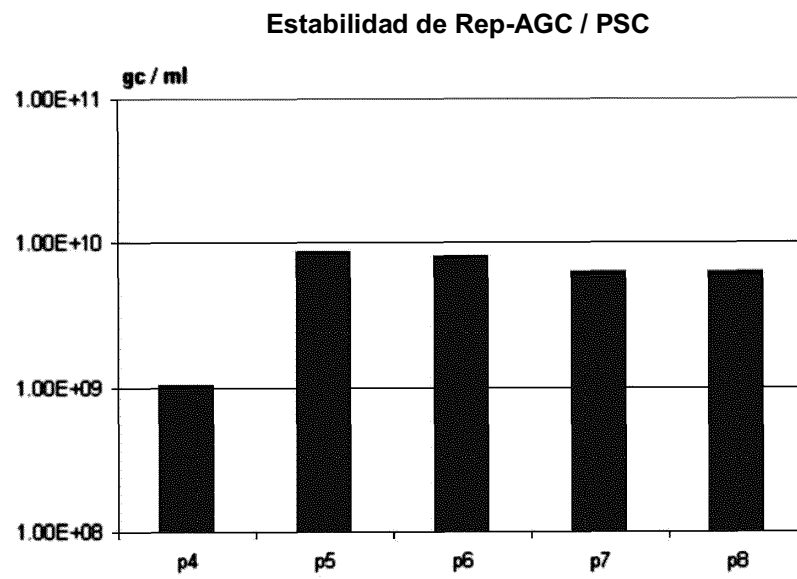


Fig 6

