

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 133**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2006 E 06812721 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1945779**

54 Título: **Vectores de VAA mejorados producidos en células de insecto.**

30 Prioridad:

20.10.2005 WO PCT/NL2005/050018

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

01.07.2013

73 Titular/es:

**UNIQUIRE IP B.V. (100.0%)
MEIBERGDREEF 61
1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL**

72 Inventor/es:

**URABE, MASASHI;
OZAWA, KEIYA;
HAAST, SASKIA, JACOBA, PETRONELLA y
HERMENS, WILHELMUS, T.J.M.C.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 410 133 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores de VAA mejorados producidos en células de insecto.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción de virus adenoasociados en células de insecto y a virus adenoasociados con una proporción alterada de las proteínas de la cápsida vírica que proporciona una infecciosidad mejorada.

Antecedentes de la invención

10 El virus adenoasociado (VAA) se puede considerar como uno de los vectores víricos más prometedores para la terapia génica humana. El VAA tiene la capacidad de infectar eficazmente células humanas en división y que no se dividen, el genoma vírico de VAA se integra en un único sitio cromosómico en el genoma de la célula hospedadora y, lo más importante, aunque el VAA está presente en muchos seres humanos, nunca se ha asociado con ninguna enfermedad. De cara a estas ventajas, un virus adenoasociado recombinante (VAAr) está siendo evaluado en ensayos clínicos de terapia génica para la hemofilia B, el melanoma maligno, la fibrosis quística y otras enfermedades.

15 Las células hospedadoras que sustentan la replicación de VAA *in vitro* se obtienen todas ellas a partir de tipos celulares de mamíferos. Por lo tanto, VAAr para uso en la terapia génica ha sido producido hasta el momento principalmente en líneas celulares de mamífero, tales como por ejemplo, células 293, células COS, células HeLa, células KB y otras líneas celulares de mamífero (véanse, por ejemplo, los documentos de patentes 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 20 96/17947). Los vectores de VAAr se producen típicamente en tales sistemas de cultivos celulares de mamífero, proporcionando plásmidos de ADN que contienen el gen terapéutico flanqueado por el origen de replicación de VAA (repeticiones terminales invertidas o RTIs), genes para las proteínas de la replicación de VAA, Rep78, Rep68p Rep52 y Rep40, y genes para las proteínas del virión o estructurales VP1, VP2 y VP3. Además, se proporciona un plásmido que contiene genes tempranos procedentes de adenovirus (E2A, E4ORF6, VARNA) para mejorar la expresión de los genes de VAA y mejorar el rendimiento de los vectores (véase, por ejemplo, Grimm *et al.*, 1998, Hum. Gene Ther. 9: 25 2745-2760). Sin embargo, en la mayoría de estos sistemas de cultivo de células de mamíferos, el número de partículas de VAA generadas por célula es del orden de 10^4 partículas (revisado en Clark, 2002, Kidney Int. 61(Supl. 1): 9-15). Para un estudio clínico, se pueden requerir más de 10^{15} partículas de VAAr. Para producir este número de partículas de VAAr, serían necesarios la transfección y el cultivo de aproximadamente 10^{11} células 293 humanas cultivadas, el equivalente a 5000 frascos de 175 cm^2 de células, lo que significa la transfección de hasta 10^{11} células 293. Por lo tanto, la producción a gran escala de VAAr utilizando sistemas de cultivo de células de mamífero para obtener material para ensayos clínicos ya ha demostrado ser problemática, la producción a escala comercial puede ser incluso no factible. Además, existe siempre el riesgo de que un vector para uso clínico que se produce en un cultivo de células de mamífero se contamine con material no deseable, tal vez patógeno, presente en la célula 35 hospedadora de mamífero.

Para resolver estos problemas de los sistemas de producción de mamíferos, se ha desarrollado recientemente un sistema de producción de VAA, utilizando células de insecto (Urabe *et al.*, 2002, Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943; documentos WO 03042361; US 20030148506 y US 20040197895). Para la producción de VAA en células de insecto a partir del sistema de expresión de baculovirus, eran necesarias algunas modificaciones debido a que la expresión 40 en células de mamífero de las tres proteínas de la cápsida de VAA (VP1, VP2 y VP3) con la estequiometría correcta depende de una combinación de uso alterno de dos sitios aceptores de corte y empalme y de la utilización subóptima de un codón de iniciación ACG para VP2, que no se puede reproducir con precisión en las células de insecto. La estequiometría correcta de las tres proteínas de la cápsida es importante para la infecciosidad de las partículas de VAA. Se sabe que las partículas de VAA que contienen cantidades reducidas de VP1 son menos infecciosas y que VP1 contiene actividad fosfolipasa A2 que tiene una función en la infecciosidad (Girod *et al.*, 2002 45 J. Gen. Virol. 83: 973-8).

Por lo tanto, para la expresión de las tres proteínas de la cápsida, Urabe *et al.* (2002, *supra*) utilizan una estructura artificial que se transcribe en un único mensajero policistrónico que es capaz de expresar las tres proteínas VP sin necesidad de corte y empalme. Para conseguir la producción de las tres proteínas de la cápsida con la estequiometría correcta, el marco de lectura de VP1, el primer codón iniciador que se observa a través del ribosoma de exploración, ha sido dotado con el codón iniciador subóptimo ACG y las secuencias en torno a este codón se han optimizado. Urabe *et al.* (2002, *supra*) describen que la exploración con ribosomas en células de insecto conduce a una estequiometría de las tres proteínas de la cápsida vírica que se aproxima a la de VAA de origen natural. 50

Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que en los vectores de VAA producidos en el sistema de baculovirus, VP1 todavía se expresa a un nivel subóptimo en relación con VP2 y que esto da como resultado una reducción de la infecciosidad en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones, en comparación, por ejemplo, con vectores de VAA convencionales, producidos en células 293 de mamífero. Por lo tanto, todavía existe una necesidad de un sistema de producción basado en baculovirus para vectores de VAAr con infecciosidad mejorada. 55

Compendio de la invención

La invención, en su sentido más amplio, es como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de la invención

Definiciones

5 Tal y como se emplea en este documento, la expresión "ligado funcionalmente" se refiere a un ligamiento de elementos polinucleotídicos (o polipeptídicos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "ligado funcionalmente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia reguladora de la transcripción está ligada funcionalmente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia codificadora. Ligado funcionalmente significa que las secuencias de ADN que se ligan son típicamente contiguas y, cuando proceda, unir dos regiones que codifican proteínas, contiguas y en fase de lectura.

"Secuencia controladora de la expresión" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una secuencia de nucleótidos a la que está ligada funcionalmente. Una secuencia controladora de la expresión está "ligada funcionalmente" a una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia controladora de la expresión controla y regula la transcripción y/o la traducción de la secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, una secuencia controladora de la expresión puede incluir promotores, potenciadores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), terminadores de la transcripción, un codón de iniciación delante de un gen que codifica una proteína, señal de corte y empalme para intrones y codones de detención. La expresión "secuencia controladora de la expresión" incluye, como mínimo, una secuencia cuya presencia está diseñada para influir en la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales. Por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias de parejas de fusión son secuencias controladoras de la expresión. La expresión también puede incluir el diseño de la secuencia de ácido nucleico, de tal manera que codones potencialmente iniciadores, no deseables, en marco de lectura o fuera del marco, se eliminen de la secuencia. También puede incluir el diseño de la secuencia de ácido nucleico de tal manera que se eliminen sitios potenciales de corte y empalme no deseados. 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 denominadas secuencias poliA. También puede estar diseñada para mejorar la estabilidad del ARNm. Las secuencias controladoras de la expresión que afectan a la estabilidad de la transcripción y la traducción, por ejemplo, los promotores, así como secuencias que efectúan la traducción, por ejemplo, secuencias Kozak, son conocidas en las células de insecto. Las secuencias controladoras de la expresión pueden tener una naturaleza tal que modulen la secuencia de nucleótidos a la que están ligadas funcionalmente, de tal manera que se consiguen niveles de expresión más bajos o niveles de expresión más altos.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "promotor" o "secuencia reguladora de la transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que actúa para controlar la transcripción de una o varias secuencias codificadoras, y que está situado antes, en relación con la dirección de la transcripción, del sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia codificadora, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para una polimerasa de ARN dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluidos, sin carácter limitante, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la técnica por actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción desde el promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de los tejidos, en las condiciones más fisiológicas y durante el desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado fisiológicamente o durante el desarrollo, por ejemplo, mediante la aplicación de un inductor químico. Un promotor "específico de tejido" solo se activa en determinados tipos de células o tejidos.

Las expresiones "sustancialmente idénticas", "identidad sustancial" o "esencialmente similares" o "similitud esencial" significan que dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos, cuando se alinean óptimamente, como a través de los programas GAP o BESTFIT, usando parámetros por defecto, comparten al menos un cierto porcentaje de identidad de secuencia, tal y como se define en otra parte en esta memoria. GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch de alineamiento global para alinear dos secuencias en toda su longitud, lo que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Generalmente, se utilizan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización por creación de hueco = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y una penalización por extensión de hueco = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto empleada es nws gapdna y para las proteínas, la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff y 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 secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Las alineaciones de secuencia y las puntuaciones del porcentaje de identidad de secuencia se pueden determinar empleando programas informáticos, como GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE.UU. o el programa de código abierto Emboss para Windows (versión actual 2.7.1-07). Como alternativa, el porcentaje de similitud o de identidad se puede determinar mediante la búsqueda en bases de datos, tales como FASTA, BLAST, etc.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de parvovirus animales, en particular de dependovirus, tales como VAA infeccioso humano o de simio, y los componentes de los mismos (por ejemplo, un genoma de parvovirus animal) como vectores para la introducción y/o la expresión de ácidos nucleicos en células de mamífero. En particular, la invención se refiere a mejoras en la infecciosidad de tales vectores parvovíricos cuando se producen en células de insecto.

Los virus de la familia *Parvoviridae* son pequeños virus animales de ADN. La familia *Parvoviridae* puede dividirse en dos subfamilias: la *Parvovirinae*, que infecta a vertebrados, y la *Densovirinae*, que infecta a insectos. Los miembros de la subfamilia *Parvovirinae* se denominan en esta memoria parvovirus e incluyen el género *Dependovirus*. Como se puede deducir a partir del nombre de su género, los miembros de *Dependovirus* son únicos en que por lo general requieren la coinfección con un virus auxiliar, tal como adenovirus o virus del herpes, para una infección productiva en el cultivo celular. El género *Dependovirus* incluye VAA, que normalmente infecta a los seres humanos (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o primates (por ejemplo, los serotipos 1 y 4), y los virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adenoasociados caninos, equinos, ovinos y bovinos). Más información sobre los parvovirus y otros miembros de los *Parvoviridae* se describe en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", capítulo 69 en Fields Virology (3.^a ed. 1996). La presente invención se ejemplifica y se describe en este documento haciendo referencia a VAA.

La organización genómica de todos los serotipos conocidos de VAA es muy similar. El genoma de VAA es una molécula de ADN lineal, monocatenaria que tiene menos de aproximadamente 5000 nucleótidos (nt) de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (RTIs) flanquean la única secuencia de nucleótidos codificadora para las proteínas de replicación no estructurales (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP forman la cápsida. Los 145 nt terminales son autocomplementarios y se organizan de manera que se puede formar un dúplex intramolecular energéticamente estable, que forma una horquilla en forma de T. Estas estructuras de horquilla actúan como un origen para la replicación del ADN vírico, sirviendo como cebadores para el complejo de la polimerasa de ADN celular. Los genes Rep codifican las proteínas Rep: Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Rep78 y Rep68 se transcriben a partir del promotor p5, y Rep52 y Rep40 se transcriben a partir del promotor p19. Los genes cap codifican las proteínas VP: VP1, VP2 y VP3. Los genes cap se transcriben a partir del promotor p40.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la cápsida de VAA, VP1, VP2 y VP3, en donde el codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida de VAA VP1 es un codón de iniciación subóptimo, seleccionado entre CTG, TTG y CGT, que no es ATG y que no es ACG, y en donde la secuencia de nucleótidos está ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto. En esta memoria, subóptimo significa que el codón es menos eficaz en la iniciación de la traducción en un contexto de otro modo idéntico, en comparación con el codón normal ATG. El codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida de VAA VP1 se selecciona entre TTG, GTG y CTG, lo más preferiblemente, el codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida de VAA VP1 es CTG. El parvovirus animal es un virus adenoasociado (VAA) humano o de simio.

En una secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 de parvovirus animales, en donde el codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida VP1 de VAA es un codón de iniciación TTG o GTG, la proporción entre las cantidades de proteínas VP1: VP2 en el virión es aproximadamente igual, es decir, equimolar, mientras que si el codón de iniciación es CTG, la cantidad de proteína VP1 en el virión es mayor que la cantidad de VP2. Si el codón de iniciación es ACG, la cantidad de proteína VP1 en el virión es menor que la cantidad de VP2. La infecciosidad de los viriones aumenta con la proporción de VP1 sobre VP2 en los viriones.

Una secuencia de nucleótidos preferida de la invención para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA es una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia controladora de la expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEQ. ID NO: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a SEQ. ID NO: 7, situada antes del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA. Una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 7 y que ayudará a incrementar la expresión de VP1 es, por ejemplo, una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80% o 90% de identidad con la secuencia de nueve nucleótidos de SEQ. ID NO: 7.

Una secuencia de nucleótidos adicionalmente preferida de la invención para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA es una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia controladora de la expresión que comprende una secuencia de consenso Kozak alrededor del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA. La secuencia de consenso Kozak se define en esta memoria como GCCRCC(NNN)G (SEQ. ID NO: 8), en la que R es una purina (es decir, A o G) y en donde (NNN) representa cualquiera de los codones de iniciación subóptimos, tal y como se han definido anteriormente en este documento. Preferiblemente, en la secuencia de consenso Kozak en la secuencia de nucleótidos de la invención, la R es una G. La secuencia de nucleótidos de la invención para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA que comprende una secuencia de consenso Kozak, se selecciona por lo tanto preferiblemente entre GCCACC(TTG)G,

GCCGCC(TTG)G, GCCACC(GTG)G, GCCGCC(GTG)G, GCCACC(CTG)G y GCCGCC(CTG)G, más preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de consenso Kozak se selecciona entre GCCACC(CTG)G y GCCGCC(CTG)G, lo más preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de consenso Kozak es GCCGCC(CTG)G. Los nucleótidos entre paréntesis en este documento indican la posición del codón de iniciación de la proteína VP1.

La secuencia de nucleótidos de la invención para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA comprende además preferiblemente al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA, seleccionada entre una G en la posición del nucleótido 12, una A en la posición del nucleótido 21 y una C en la posición del nucleótido 24. Un experto en la técnica comprenderá la eliminación de posibles sitios falsos de inicio de la traducción de VP1 de otros serotipos, ya que esta supondrá la eliminación de posibles sitios de corte y empalme que pueden ser reconocidos en células de insecto. Las diversas modificaciones de las secuencias de VAA de origen natural para una expresión apropiada en células de insecto se logran mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética bien conocidas, tales como las descritas, p. ej., en Sambrook y Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3.^a edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Diversas modificaciones adicionales de las regiones codificadoras de VP son conocidas por el experto en la técnica, las cuales podrían aumentar el rendimiento de VP y del virión, o 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.

La secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas de la cápsida de VAA está ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto. Estas secuencias controladoras de la expresión incluirán, al menos, un promotor que es activo en las células de insecto. Se pueden utilizar técnicas conocidas por un experto en la técnica para expresar genes extraños en células hospedadoras de insecto, para poner en práctica la invención. La metodología para la ingeniería molecular y la expresión de polipéptidos en células de insecto se describe, por ejemplo, en Summers y Smith. 1986. "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station Bull. n.º 7555, College Station, Texas; 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. y R. D. Possee, 1992. "The baculovirus expression system", Chapman y 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 y Richardson, C. D., 1995, "Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology", volumen 39; documentos US 4.745.051; US2003148506; y WO 03/074714. Un promotor particularmente adecuado para la transcripción de la secuencia de nucleótidos de la invención que codifica las proteínas de la cápsida de VAA es, por ejemplo, el promotor poliedron. Sin embargo, otros promotores que son activos en células de insecto son conocidos en la técnica, por ejemplo, los promotores p10, p35 o IE-1 y otros promotores descritos en las referencias anteriores.

Preferiblemente, la estructura artificial de ácido nucleico para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA en las células de insecto es un vector compatible con las células de insecto. Por "vector compatible con las células de insecto" o "vector" se entiende una molécula de ácido nucleico capaz de realizar una transformación o transfección productiva de un insecto o de una célula de insecto. Los vectores biológicos ejemplares incluyen plásmidos, moléculas de ácido nucleico lineales y virus recombinantes. Se puede emplear cualquier vector mientras 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 tiene que ser permanente y también se pueden incluir vectores episomales temporales. Los vectores se pueden introducir a través de cualquier medio conocido, por ejemplo, mediante tratamiento químico de las células, electroporación o infección. En una realización preferida, el vector es un baculovirus, un vector vírico o un plásmido. En una realización más preferida, el vector es un baculovirus, es decir, la estructura artificial es un vector de baculovirus. Los vectores de baculovirus y los métodos para su uso se describen en las referencias citadas anteriormente sobre ingeniería molecular de células de insecto.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula de insecto que comprende una estructura artificial de ácido nucleico de la invención, tal y como se ha definido anteriormente. Cualquier célula de insecto que permita la replicación de VAA y que se pueda mantener en cultivo, se podrá utilizar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la línea celular utilizada puede ser de *Spodoptera frugiperda*, líneas celulares de *Drosophila* o líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares obtenidas a partir de *Aedes albopictus*. Las células de insecto o las líneas de células de insecto preferidas son células procedentes de especies de insectos que son susceptibles a la infección con baculovirus, que incluyen, por ejemplo, Se301, Se1ZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5 y High Five de Invitrogen.

Una célula de insecto preferida de acuerdo con la invención comprende además: (a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de una repetición terminal invertida (RTI) de VAA; (b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificadora de Rep52 o Rep40 ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto; y (c) una cuarta secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificadora de Rep78 o Rep68 ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto.

En el contexto de la invención, por "al menos una secuencia de nucleótidos de RTI de VAA" se entiende una secuencia palindrómica, que comprende secuencias sobre todo complementarias, dispuestas simétricamente, también conocidas como regiones "A", "B" y "C". La RTI actúa como un origen de replicación, un sitio que tiene un papel "cis" en la replicación, es decir, que es un sitio de reconocimiento para proteínas de la replicación que actúan en trans (por ejemplo, Rep78 o Rep68) que reconocen el palíndromo y las secuencias específicas internas del palíndromo. Una excepción de la simetría de la secuencia RTI es la región "D" de la RTI. Es única (no tiene un complemento dentro de una RTI). El corte del ADN monocatenario se produce en la unión entre las regiones A y D. Es la región en la que se inicia la síntesis del nuevo ADN. La región D se encuentra normalmente a un lado del palíndromo y proporciona direccionalidad a la etapa de replicación del ácido nucleico. Un VAA que se replica en una célula de mamífero tiene típicamente dos secuencias RTI. Sin embargo, es posible diseñar una RTI de manera que los sitios de unión estén en ambas hebras de las regiones A y las regiones D estén situadas simétricamente, una a cada lado del palíndromo. En un molde de ADN circular bicatenario (por ejemplo, un plásmido), la replicación del ácido nucleico asistida por Rep78 o Rep68 tiene lugar luego en ambas direcciones y basta con una sola RTI para la replicación en VAA de un vector circular. Por lo tanto, se puede utilizar una secuencia de nucleótidos RTI en el contexto de la presente invención. Sin embargo, preferiblemente, se utilizan dos u otro número par de RTI regulares. Lo más preferiblemente, se utilizan dos secuencias RTI. Teniendo en cuenta la seguridad de los vectores víricos, puede ser deseable construir un vector vírico 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, se puede proporcionar empleando VAAr con una RTI quimérica, tal y como se describe en el documento US2003148506.

El número de vectores o de estructuras artificiales de ácido nucleico empleado no es limitante. Por ejemplo, se pueden emplear uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más vectores para producir VAA en células de insecto. Si se emplean seis vectores, un vector codifica VP1 de VAA, otro vector codifica VP2 de VAA, aún otro vector codifica VP3 de VAA, todavía otro vector codifica Rep52 o Rep40, mientras que Rep78 o Rep68 están codificadas por otro vector y un vector final comprende al menos una RTI de VAA. Se pueden emplear vectores adicionales para expresar, por ejemplo, Rep52 y Rep40, y Rep78 y Rep68. Si se utilizan menos de seis vectores, los vectores pueden comprender varias combinaciones de al menos una RTI de VAA y las secuencias codificadoras de VP1, VP2, VP3, Rep52/Rep40 y Rep78/Rep68. Preferiblemente, se utilizan dos vectores o tres vectores, siendo más preferido dos vectores más preferido, tal y como se ha descrito anteriormente. Si se utilizan dos vectores, la célula de insecto comprende preferiblemente: (a) una primera estructura artificial de ácido nucleico para la expresión de las proteínas de la cápsida de VAA, tal y como se ha definido anteriormente, comprendiendo además dicha estructura artificial la tercera y la cuarta secuencias de nucleótidos, tal y como se definen en (b) y (c) anteriores, comprendiendo la tercera secuencia de nucleótidos una secuencia que codifica Rep52 o Rep40 ligada funcionalmente a al menos una secuencia controladora de la expresión, para la expresión en una célula de insecto, y comprendiendo la cuarta secuencia de nucleótidos una secuencia codificadora de Rep78 o Rep68 ligada funcionalmente a al menos una secuencia controladora de la expresión, para la expresión en una célula de insecto; y (b) una segunda estructura artificial de ácido nucleico que comprende la segunda secuencia de nucleótidos tal y como se ha definido en (a) anterior, que comprende al menos una secuencia de nucleótidos RTI de VAA. Si se utilizan tres vectores, se emplea preferiblemente la misma configuración que la que se utiliza para dos vectores, con la excepción de que se utilizan vectores separados para la expresión de las proteínas de la cápsida y para la expresión de las proteínas Rep52, Rep40, Rep78 y Rep68. Las secuencias en cada vector pueden estar en cualquier orden entre sí. Por ejemplo, si un vector comprende RTI y un ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas VP de la cápsida, el ORF de VP puede estar ubicado en el vector de modo que, tras la replicación del ADN entre las secuencias RTI, el ORF de VP se replique o no se replique. En otro ejemplo, las secuencias codificadoras de Rep y/o el ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas VP de la cápsida, pueden estar en cualquier orden en un vector. Se entiende que también la segunda, la tercera y otras estructuras artificiales de ácido nucleico son preferiblemente vectores compatibles con células de insecto, preferiblemente los vectores de baculovirus tal y como se han descrito anteriormente. Como alternativa, en la célula de insecto de la invención, una o varias de la primera secuencia de nucleótidos, segunda secuencia de nucleótidos, tercera secuencia de nucleótidos y cuarta secuencia de nucleótidos y, opcionalmente, otras secuencias de nucleótidos, pueden estar integradas de manera estable en el genoma de la célula de insecto. Un experto en la técnica sabe cómo introducir de manera estable una secuencia de nucleótidos en el genoma de insectos y cómo identificar una célula que tiene una secuencia de nucleótidos tal en el genoma. La incorporación en el genoma puede estar propiciada, por ejemplo, por el uso de un vector que comprende secuencias de nucleótidos muy homólogas a las regiones del genoma de un insecto. El uso de secuencias específicas, tales como transposones, es otra manera de introducir una secuencia de nucleótidos en un genoma.

En una realización preferida de la invención, la segunda secuencia de nucleótidos presente en las células de insecto de la invención, es decir, la secuencia que comprende al menos una RTI de VAA, comprende además al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, por lo que preferiblemente la secuencia de nucleótidos, al menos una, que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un VAA producido en la célula de insecto. Preferiblemente, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés es una secuencia para la expresión en una célula de mamífero. Preferiblemente, la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos RTI de VAA y en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, que codifica un producto génico de interés se encuentra entre las dos secuencias de

nucleótidos RTI de VAA. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés (para la expresión en la célula de mamífero) se incorporará en el genoma de VAA producido en la célula de insecto si se encuentra entre dos RTI regulares o si está situada en cualquiera de los lados de una RTI modificada genéticamente con dos regiones D.

5 La segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en este documento, puede comprender por lo tanto una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un "producto génico de interés" para la expresión en una célula de mamífero, situada de tal manera que se incorporará en un genoma de VAA replicado en la célula de insecto. Cualquier secuencia de nucleótidos se puede incorporar para una expresión posterior en una célula de mamífero transfectada con el VAA, producido de acuerdo con la presente invención. La secuencia de nucleótidos puede, p. ej.,
 10 codificar una proteína, expresar un agente ARNi, es decir, una molécula de ARN capaz de provocar interferencia por ARN, tal como por ejemplo, un ARNh_c (ARN horquillado corto) o un ARNi_p (ARN interferente pequeño). "ARNi_p" significa un ARN interferente pequeño 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. USA 98: 9742-47). En una realización preferida, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender dos secuencias de nucleótidos y
 15 cada una codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero. Cada una de las dos secuencias de nucleótidos que codifican un producto de interés está situada de tal manera que se incorporará en un genoma de VAA replicado en la célula de insecto.

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 (ARNi_p), u otro producto génico que,
 20 cuando se expresa en una célula diana, proporciona un efecto terapéutico deseado, tal como, p. ej., la ablación de una actividad no deseada, p. ej., la ablación de una célula infectada, o la complementación de un defecto genético causando, p. ej., una deficiencia en una actividad enzimática. Los ejemplos de productos génicos de polipéptidos terapéuticos incluyen CFTR, Factor IX, lipoproteína lipasa (LPL, preferiblemente LPL S447X; véase el documento WO 01/00220), apolipoproteína A1, glucuronosiltransferasa de uridina difosfato (UGT), proteína que interacciona con el regulador de la GTPasa de la Retinitis Pigmentosa (RP-GRIP), y citocinas o interleucinas, como por ejemplo, IL-
 25 10.

Como alternativa o además, como segundo producto génico, la segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en este documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que sirve como proteína marcadora, para determinar la transformación y la expresión celular. Algunas proteínas marcadoras adecuadas para este propósito son, p. ej., la proteína fluorescente GFP y genes marcadores seleccionables de la cinasa de timidina de HSV (para la selección en medio HAT), la fosfotransferasa B de higromicina bacteriana (para la selección sobre higromicina B), la fosfotransferasa Tn5 de aminoglucósido (para la selección sobre G418) y la reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para la selección sobre metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Las fuentes para la obtención de estos genes marcadores y los métodos para su uso se proporcionan en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Además, la segunda secuencia de nucleótidos definida anteriormente en este documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que puede servir como un mecanismo de seguridad que permite curar a un sujeto con células transducidas con el VAAr de la invención, si se considera necesario. Una secuencia de
 30 nucleótidos tal, denominada frecuentemente gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que es capaz de destruir las células transgénicas en las que se expresa la proteína. Los ejemplos adecuados de tales genes suicidas incluyen, p. ej., el gen de la desaminasa de citosina de *E. coli* o uno de los genes de la cinasa de timidina del virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de la varicela-zoster, en cuyo caso se puede utilizar ganciclovir como profármaco para destruir las células transgénicas en el sujeto (véase, por ejemplo, Clair *et al.*, 1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31: 844-849).
 35
 40
 45

En otra realización, el producto génico de interés puede ser una proteína de VAA. En particular, una proteína Rep, tal como Rep78 o Rep68, o un fragmento funcional de la misma. Una secuencia de nucleótidos que codifica Rep78 y/o Rep68, si está presente en el genoma de VAAr de la invención y se expresa en una célula de mamífero transducida con el VAAr de la invención, permite la integración del VAAr en el genoma de la célula de mamífero transducida. La expresión de Rep78 y/o Rep68 en una célula de mamífero transducida o infectada con VAAr puede proporcionar una ventaja para ciertos usos de VAAr, permitiendo una expresión a largo plazo o permanente de cualquier otro producto génico de interés introducido en la célula a través del VAAr.
 50

En los vectores de VAAr de la invención, la secuencia de nucleótidos, al menos una, que codifica un producto génico de interés para la expresión en una célula de mamífero preferiblemente está ligada funcionalmente a al menos una secuencia controladora de la expresión compatible con células de mamífero, por ejemplo, un promotor. Muchos de estos promotores son conocidos en la técnica (véase Sambrook y Russel, 2001, *supra*). Se pueden utilizar los promotores constitutivos que se expresan ampliamente en muchos tipos de células, tales como el promotor CMV. Sin embargo, serán más preferidos los promotores que son inducibles, específicos de tejido, específicos de tipos celulares o específicos del ciclo celular. Por ejemplo, para una expresión específica en el hígado, se puede seleccionar un promotor entre un promotor α 1-antitripsina, un promotor de globulina que se une a la hormona tiroidea, un promotor de la albúmina, un promotor LPS (globina que se une a tiroxina), un promotor híbrido HCR-
 55
 60

ApoCII, un promotor híbrido HCR-hAAT y un promotor de apolipoproteína E. Otros ejemplos incluyen el promotor E2F para la expresión selectiva en tumores y, en particular, para la expresión selectiva en tumores de células neurológicas (Parr *et al.*, 1997, Nat. Med. 3:1145-9) o el promotor de IL-2 para uso en células sanguíneas mononucleares (Hagenbaugh *et al.*, 1997, J. Exp. Med., 185: 2101-10).

5 El VAA es capaz de infectar una variedad de células de mamíferos. Véase, por ejemplo, Tratschin *et al.*, Mol. Cell Biol., 5(11):3251-3260 (1985) y Grimm *et al.*, Hum. Gene Ther., 10(15):2445-2450 (1999). Sin embargo, la transducción con VAA de fibroblastos sinoviales humanos es significativamente más eficaz que en células murinas similares, Jennings *et al.*, Arthritis Res., 3:1 (2001), y el tropismo celular de VAA difiere entre los serotipos. Véase, por ejemplo, Davidson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(7):3428-3432 (2000) (que describen diferencias entre
10 VAA2, VAA4 y VAA5 con respecto al tropismo celular del SNC de mamíferos y la eficacia de la transducción).

Las secuencias de VAA que se pueden utilizar en la presente invención para la producción de VAA en células de insecto se pueden obtener a partir del genoma de cualquier serotipo de VAA. En general, los serotipos de VAA tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de aminoácidos y de ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son física y funcionalmente esencialmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los diversos serotipos de VAA y una visión general de las similitudes genómicas, véase por ejemplo, GenBank número de entrada U89790; GenBank número de entrada J01901; GenBank número de entrada AF043303; GenBank número de entrada 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 virus adenoasociados (VAA) humanos o de simio son fuentes preferidas de secuencias de nucleótidos de VAA para uso en el contexto de la presente invención, más preferiblemente, los serotipos de VAA que infectan normalmente a seres humanos (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o a primates (por ejemplo, los serotipos 1 y 4).
15

Preferiblemente, las secuencias RTI de VAA para uso en el contexto de la presente invención se obtienen a partir de VAA1, VAA2 y/o VAA4. Del mismo modo, las secuencias que codifican Rep52, Rep40, Rep78 y/o Rep68 se obtienen preferiblemente a partir de VAA1, VAA2 y/o VAA4. Las secuencias que codifican las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 para uso en el contexto de la presente invención se pueden tomar, sin embargo, a partir de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente a partir de VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8 o VAA9 o las partículas similares a VAA desarrolladas recientemente obtenidas, por ejemplo, a través de técnicas de ordenamiento aleatorio de la cápsida y colecciones de la cápsida de VAA.
20
25
30

Las secuencias Rep y RTI de VAA están particularmente conservadas en la mayoría de los serotipos. Las proteínas Rep78 de diversos serotipos de VAA tienen, por ejemplo, una identidad superior al 89% y la identidad total de la secuencia de nucleótidos a nivel de genoma entre VAA2, VAA3A, VAA3B y VAA6 es de aproximadamente el 82% (Bantel-Schaal *et al.*, 1999, J. Virol., 73(2):939-947). Por otra parte, existe constancia de que las secuencias de Rep y las RTI de muchos serotipos de VAA se complementan de manera cruzada eficazmente (es decir, sustituyen funcionalmente) con secuencias correspondientes procedentes de otros serotipos, en la producción de partículas de VAA en células de mamífero. El documento US2003148506 describe que las secuencias Rep y RTI de VAA también se complementan de forma cruzada eficazmente con otras secuencias de Rep y RTI de VAA en células de insecto.
35

Existe constancia de que las proteínas VP de VAA determinan el tropismo celular del virión de VAA. Las secuencias que codifican las proteínas VP están significativamente menos conservadas que las proteínas y los genes Rep en diferentes serotipos de VAA. La capacidad de las secuencias Rep y RTI para complementarse de forma cruzada con secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas de VAA seudotipificadas que comprenden las proteínas de la cápsida de un serotipo (por ejemplo, VAA3) y las secuencias Rep y/o RTI de otro serotipo de VAA (por ejemplo, VAA2). Tales partículas de VAA seudotipificadas son una parte de la presente invención.
40
45

Las secuencias de "VAA" modificadas también se pueden utilizar en el contexto de la presente invención, por ejemplo, para la producción de vectores de VAAr en células de insecto. Tales secuencias modificadas incluyen, p. ej., secuencias que tienen al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o más de identidad en la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (por ejemplo, una secuencia que tiene aproximadamente 75-99% de identidad en la secuencia de nucleótidos) con una RTI, Rep o VP de VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8 o VAA9, las cuales se pueden utilizar en lugar de secuencias de RTI, Rep o VP de VAA de origen natural.
50

Aunque es similar a otros serotipos de VAA en muchos aspectos, VAA5 difiere de otros serotipos de VAA humanos y de simio más que otros serotipos conocidos humanos y de simio. Teniendo esto en cuenta, la producción de VAA5 puede diferir de la producción de otros serotipos en células de insecto. Cuando se emplean métodos de la invención para producir VAA5, se prefiere que uno o varios vectores, de manera colectiva en el caso de más de un vector, comprendan una secuencia de nucleótidos que comprenda una RTI de VAA5, una secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de VAA5 que codifica Rep52 y/o Rep40, y una secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de VAA5 que codifica Rep78 y/o Rep68. Tales secuencias de RTI y Rep se pueden modificar como se
55
60

deseo para obtener una producción eficaz de vectores de VAA5 o de VAA5 seudotipificados en células de insecto. Por ejemplo, el codón de iniciación de las secuencias Rep se puede modificar, los sitios de corte y empalme de VP se pueden modificar o eliminar, y/o el codón de iniciación de VP1 y los nucleótidos cercanos se pueden modificar para mejorar la producción de VAA5r en la célula de insecto.

- 5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un virión de VAA, tal y como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, el virión de VAA comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, no es una secuencia de nucleótidos de VAA natural, y en donde en la estequiometría de las proteínas de la cápsida de VAA, VP1, VP2 y VP3, la cantidad de VP1: (a) es al menos 100, 105, 110, 120, 150, 200 o 400% de la cantidad de VP2; o (b) es al menos 8, 10, 10,5, 11, 12, 15, 20 o 40% de la cantidad de VP3; o (c) es al menos tal como se define en (a) y (b).
 10 Preferiblemente, la cantidad de VP1, VP2 y VP3 se determina utilizando un anticuerpo que reconoce un epítipo que es común en cada una de VP1, VP2 y VP3. Están disponibles en la técnica diversos inmunoensayos que permiten cuantificar las cantidades relativas de VP1, VP2 y/o VP3 (véase, por ejemplo, "Using Antibodies", E. Harlow y D. Lane, 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Un anticuerpo adecuado que reconoce un epítipo que es común en cada una de las tres proteínas de la cápsida es, por ejemplo, el anticuerpo de ratón anti-Cap B1 (tal y como está disponible comercialmente en Progen, Alemania).

Un VAA de acuerdo con la invención es un virión que comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, no es una secuencia de nucleótidos de VAA natural, y en donde el virión de VAA comprende una proteína VP1 de la cápsida que comprende una leucina o una valina en la posición del aminoácido 1. Un virión de VAA de acuerdo con la invención tiene la proporción de proteínas de la cápsida tal y como se ha definido anteriormente, y comprende una proteína VP1 de la cápsida que comprende una leucina o una valina en la posición del aminoácido 1. Incluso más preferido es un virión de VAA según se reivindica, que es obtenible a partir de una célula de insecto tal y como se ha definido anteriormente, por ejemplo, en un método tal y como se define en la presente memoria a continuación.

Una ventaja de los viriones de VAA de la invención que tienen la proporción definida anteriormente de proteínas de la cápsida es la mejora de su infecciosidad. En particular, la capacidad de infección aumenta con un incremento de la cantidad de proteína VP1 en la cápsida, en relación con las cantidades de VP2 y/o VP3 en la cápsida. La infecciosidad de un virión de VAA se entiende en esta memoria en el sentido de la eficacia de la transducción del transgén integrado en el virión, como se puede deducir a partir de la tasa de expresión del transgén y la cantidad de producto o la actividad del mismo, expresada a partir del transgén.

En otro aspecto, la invención se refiere por tanto a un método para producir un VAA en una célula de insecto. Preferiblemente, el método comprende las etapas de: (a) cultivar una célula de insecto tal y como se ha definido anteriormente en esta memoria, en condiciones tales que se produzca VAA; y (b) recuperar el VAA. Las condiciones de crecimiento para las células de insecto en cultivo y la producción de productos heterólogos en células de insecto en cultivo son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en las referencias citadas anteriormente sobre ingeniería molecular de células de insecto.

Preferiblemente, el método comprende adicionalmente la etapa de purificación por afinidad del VAA, utilizando un anticuerpo anti-VAA, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo anti-VAA es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo particularmente adecuado es un anticuerpo de camélido monocatenario o un fragmento del mismo, obtenible, por ejemplo, a partir de camellos o llamas (véase, p. ej., Muyldermans, 2001, Biotechnol. 74: 277-302). El anticuerpo para la purificación por afinidad de VAA es preferiblemente un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en una proteína de la cápsida de VAA, por lo que el epítipo es preferiblemente un epítipo que está presente en la proteína de la cápsida de más de un serotipo de VAA. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir o seleccionar basándose en la unión específica a la cápsida de AAV2, pero al mismo tiempo también se puede unir específicamente a las cápsidas de VAA1, VAA3 y VAA5.

En este documento y en las reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitante, para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa, por lo tanto, generalmente "al menos uno/a".

Descripción de las figuras

Figura 1: Análisis por transferencia Western de VAAr producido con un baculovirus recombinante que contiene un codón de iniciación TTG o un ACG para la proteína VP1 de la cápsida.

Figura 2: Ensayo de la masa de LPL: las células HEK293 en una placa de microtitulación fueron infectadas con VAAr producido con el sistema de producción de baculovirus y el sistema de producción de plásmidos con una mdi entre 100 y 25.000. Dos días después de la infección, se midió la proteína LPL^{S447X} mediante ELISA de masa para

LPL^{S447X}. "DKFZ/Llama" (A-079-024 y A-093-130/137) representan lotes de VAAr-LPL^{S447X} generados con el sistema de producción de plásmidos.

"Testigo" representa un lote de virus VAAr-LacZ que no expresa LPL^{S447X}, sino que expresa la proteína LacZ bacteriana. Baculo/Llama representa un lote de VAAr- LPL^{S447X} generado con el sistema de producción de baculovirus, empleando el virus rBac-Cap con el codón de iniciación TTG.

Figura 3: El nivel de triglicéridos (TG) en plasma sanguíneo se determinó después de la inyección de lotes de vectores de VAA. Los ratones (n= 2) fueron inyectados con VAAr producido con el sistema de producción de baculovirus (DJ17jun05) y (n= 2) el sistema de producción de mamífero (Clin). A los 3, 7 y 14 días después de la administración del vector, se tomaron muestras de sangre y se sometieron a ensayo para estudiar TG en ayunas.

Figura 4: La actividad de LPL^{S447X} se midió en muestras de plasma: los ratones fueron inyectados con VAAr producido con el sistema de producción de baculovirus (DJ17jun05) y el sistema de producción de mamíferos (C-0045). Catorce días después de la administración del vector, se tomaron muestras de sangre y se determinó la actividad de LPL^{S447X}.

Figura 5 Fig. 1: Cuatro lotes de VAA1 producidos en células de insecto con el sistema de expresión de baculovirus se cargaron en un gel NuPAGE para evaluar la estequiometría de VP1, 2, 3. Carriles: lote de VAA1 preparado con una estructura artificial de baculovirus-Cap que contiene el codón de iniciación de VP1 CTG (carril 1), GTG (carril 2), ACG (carril 3), TTG (carril 4). Como testigo se cargó un lote de VAA1 producido con plásmido (FSB-02) (carril 5).

La estequiometría de VAA1 utilizando un codón de iniciación CTG es comparable a la del lote FSB-02.

Figura 6: Los lotes de VAA1-LPL fueron inyectados en el músculo de ratones sin LPL (-/-) con 3x10¹² gc/kg. El lote VAA1-LPL, preparado con la estructura artificial rBac-Cap que contiene el codón de iniciación CTG, se comporta significativamente mejor en términos de reducción de triglicéridos (TG), en comparación con los otros lotes.

Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1 Estructura artificial de plásmido de baculovirus

Con el fin de expresar VP1, 2, 3 a partir de un único ARN mensajero policistrónico, la estructura artificial de baculovirus-VAA-Cap se diseñó tal y como se ha descrito (Urabe *et al.*, 2002, *supra*). Resumiendo, el codón de iniciación ATG de VP1 se mutó a ACG. Un codón de iniciación potencial ATG en la posición 11 se cambió a ACG. El sitio aceptor de corte y empalme situado después del codón de iniciación de VP1 fue destruido (mutación en la posición 21 y 24). El casete de expresión de Cap mutado se clonó en una estructura artificial de expresión de baculovirus; pFastBacDual (pFBDAAVIVPm11) con sitios de restricción para BamHI/StuI. Este plásmido (pFBDAAVIVPm11) fue el material de partida para la introducción de codones de iniciación alternativos para VP1. El cebador directo utilizado por Urabe *et al.* (2002, *supra*) con el fin de introducir las mutaciones mencionadas fue:

BamHI 1 11 21 24

5' -cgcggatcctgttaag**ACGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC**-3'

(SEQ ID NO. 1)

Los siguientes cebadores directos se utilizaron para preparar las estructuras artificiales de expresión, empleando pFBDAAVIVPm11 (Urabe *et al.*, 2002, *supra*.) como material de partida:

5' -cgcggatcctgttaag**TTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC**-3'

(SEQ ID NO. 2)

5' -cgcggatcctgttaag**ATTGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC**-3'

(SEQ ID NO. 3)

5' -cgcggatcctgttaag**GTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC**-3'

(SEQ ID NO. 4)

5' -cgcggatcctgttaag**CTGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTC**-3'

(SEQ ID NO. 5)

Además, se utilizaron dos cebadores directos para preparar estructuras artificiales en donde los codones ACG y CTG, respectivamente, están precedidos por una forma preferida de la secuencia Kozak "GCCGCC(NNN)G" (véase

SEQ ID NO: 8; y en donde (NNN) representa el codón de iniciación subóptimo).

5' -ccatcggg'gcgaggatcctggcccACGGCTGCCGACGGTTATCTAC-3'

(SEQ ID NO. 9)

5' -ccatcggg'gcgaggatcctggcccCTGGCTGCCGACGGTTATCTAC-3'

(SEQ ID NO. 10)

5 El cebador inverso que se utilizó en las reacciones de PCR con los cebadores directos anteriores se dirigió a la posición -230 pb después del codón de iniciación de VP1 y contiene un único sitio *StuI* (AGGCCT).

5' -GTCGTAGGCCTTGTCGTGCTCGAGGGCCGC-3'

(SEQ ID NO. 6)

10 Los fragmentos fueron amplificados con los conjuntos mencionados anteriormente de parejas de cebadores directo e inverso, mediante 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 diversas estructuras artificiales de baculovirus-VAA-Cap que se sometieron a ensayo. Las estructuras artificiales de ADN se verificaron mediante análisis de la secuencia en BaseClear, Leiden, Países Bajos.

1.2 Producción de baculovirus recombinantes

15 Los baculovirus recombinantes obtenidos a partir del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se produjeron utilizando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). rBac-Cap se amplificó infectando 2×10^6 células de Sf9 por ml con una mdi de 0,1. Tres días después de la infección, las células se centrifugaron y se recuperó el material sobrenadante que contenía el virus.

20 Se produjeron lotes de VAAr usando tres baculovirus recombinantes de acuerdo con Urabe *et al.*, 2002. Sin embargo, para este estudio, un baculovirus albergaba una estructura artificial de expresión para el transgén LPL^{S447X}. El agente terapéuticamente activo expresado a partir del transgén es una variante de origen natural de la lipoproteína lipasa humana, un polipéptido monocatenario de 448 aminoácidos. La variante LPL^{S447X} tiene una delección de dos aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína. El segundo baculovirus albergaba una estructura artificial de expresión para los genes de replicación de VAA, Rep 78 y Rep 52. El tercer baculovirus albergaba la secuencia de la cápsida de VAA1 con un codón de iniciación ACG o un codón de iniciación TTG, CTG, GTG para VP1.

25 Los lotes de VAAr de mamífero producidos con el sistema de transfección de plásmidos se produjeron de acuerdo con Grimm *et al.*, 1998 ("Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors". Hum Gene Ther. 10 de diciembre de 1998, 9(18):2745-60).

1.3 Análisis por transferencia Western

30 Las células de insecto se infectaron con baculovirus-Cap. Tres días después de la infección, las células se centrifugaron (3.000 g; 15 min). El material sobrenadante se filtró a través de un filtro Millex de 0,22 µm. El tampón para la muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) se añadió a una muestra del material sobrenadante y se cargó sobre un gel de Bis-Tris al 4-12%. El gel migró a 100 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante 1 h, 100 V, 350 mA. La inmunoquímica Western se llevó a cabo bloqueando la membrana con 1% de marvel, leche desnatada en polvo y la incubación posterior con anti-Cap de ratón (B1 de Progen, Alemania; dilución 1:50) y anti-ratón de conejo - HRP (DAKO, dilución 1:100). VP1, 2 y 3 se visualizaron por tinción con quimioluminiscencia con Lumi-light más sustrato de transferencia Western (Roche).

1.4 Mediciones bioquímicas

40 La actividad de LPL^{S447X} humano se sometió a ensayo tal y como se ha descrito anteriormente, utilizando un sustrato radiactivo de emulsión con trioleoilglicerol (Nilsson-Ehle y Scholtz, 1976). La masa inmunoreactiva de LPL^{S447X} humano se sometió a ensayo usando un ELISA de tipo sándwich con IgY de pollo y anticuerpos de ratón 5D2 anti-hLPL (Liu *et al.*, 2000). Los niveles de triglicéridos en plasma se midieron empleando kits comerciales, siguiendo los protocolos del fabricante (Boehringer Mannheim, nº 450 032).

2. Resultados

2.1 Construcción de baculovirus recombinante

45 Con el fin de introducir diferentes codones de iniciación alternativos para la expresión de VP1 en el plásmido de baculovirus diseñado por Urabe *et al.* (2002, *supra*), se diseñó una serie de cebadores situados en una posición anterior que contenían un sitio de restricción *BamHI* y un codón TTG, ATT, GTG o CTG en lugar del codón de iniciación ACG de VP1. La PCR que empleaba estos cebadores en combinación con un cebador situado en una

posición posterior que contenía un sitio *StuI* dio como resultado fragmentos amplificados que se subclonaron en el sitio *Bam*HI/*StuI* de pFBDVPm11 (Bac-Cap). Los plásmidos de baculovirus resultantes se utilizaron para la preparación de baculovirus recombinantes utilizando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac. Los baculovirus recombinantes preparados infectaron células de insecto con el fin de producir cápsidas de VAA. Tres días después de la infección vírica, se determinó la expresión proteica de los diferentes lotes de baculovirus sobre transferencias Western. A partir de las transferencias Western se hizo evidente que la estructura artificial de baculovirus que contenía el codón de iniciación TTT para VP1 expresaba esta proteína a un nivel más elevado, en comparación con el codón de iniciación ACG utilizado anteriormente. Se determinó que la proporción entre VP1 y VP2 utilizando el codón TTT era de 1:1, que es similar a la que se describe para el VAA de origen natural (Figura 1).

2.2 Infección de lotes de VAAr en células en cultivo

Con el fin de investigar la infecciosidad de las cápsidas de VAA obtenidas a partir de baculovirus recombinantes con el codón de iniciación TTT, se generó VAAr. También se generó un lote de VAAr mediante transfección plasmídica en células de mamífero HEK293. Se determinó un título del genoma del vector de ambos lotes de VAAr mediante qPCR. Este título se utilizó para infectar células HEK 293 en una placa de microtitulación, con una mdí cada vez mayor. Dos días después de la infección, se realizó un ensayo cuantitativo (ensayo de masa de LPL^{S447X}) para el producto del transgén (LPL^{S447X}) en el medio de las células infectadas. El ensayo mostró que la cantidad de LPL^{S447X} producida mediante el VAAr producido con baculovirus fue similar a la LPL producida mediante el VAAr producido con plásmido (Figura 2).

2.3 Inyección de lotes de VAAr en ratones

Los lotes de VAAr producidos con el sistema de producción de baculovirus y con el sistema de producción de plásmido de mamífero convencional se inyectaron por vía intramuscular en ratones para seguir la actividad de la proteína LPL^{S447X} y de triglicéridos en ayunas *in vivo*. Tres días, 7 días y 2 semanas después de la inyección, se tomaron y se evaluaron muestras de sangre. Entre 3 y 7 días después de la administración del virus, las muestras de plasma sanguíneo procedentes de ambos ratones inyectados con VAAr de mamífero y de un ratón inyectado con baculo-VAAr se volvieron de lechosas a completamente claras. El plasma sanguíneo obtenido a partir de un ratón inyectado con baculo-VAAr se conservó relativamente lechoso, sin embargo el nivel de grasa se redujo claramente. Los niveles de triglicéridos se redujeron, respectivamente, en todos los ratones tratados (Figura 3). El día 14, los niveles de TG en ratones tratados tanto con VAA de mamífero como con baculovirus-(TTT)-VAA se redujeron el 96%. Las muestras de plasma tomadas dos semanas después de la administración del virus mostraban que la actividad de LPL^{S447X} de los ratones tratados con VAA de baculovirus y VAA de mamífero era similar (Figura 4).

2.4 Producción de lotes de VAA recombinante con diferentes codones de iniciación de VP1

Los baculovirus recombinantes que contenían una unidad de expresión de VAA-Cap de tipo 1 con diferentes codones de iniciación de VP1 (CTG, GTG, TTT, ACG) se utilizaron para preparar lotes de VAA1r-LPL en células de insecto. Los lotes de virus se purificaron y se cargaron en un gel NuPage para su evaluación (Figura 5). El gel muestra la estequiometría entre las proteínas VP1, VP2 y VP3 de los diferentes virus. En primer lugar, mencionamos el VAA1r-LPL producido previamente usando un sistema de transfección de plásmido convencional (pPD1, DKFZ, Heidelberg, Alemania) en células HEK293. En nuestros ensayos, este sistema produce una estequiometría inusual entre las proteínas VP1, VP2 y VP3, en la que VP1 está presente en una cantidad superior que VP2. Esta estequiometría es significativamente diferente de la estequiometría 1:1:10 descrita para las proteínas VP1, VP2 y VP3, tal y como se observa en VAAwt o en otras plataformas de producción de vectores de VAA de mamífero.

En el sistema de baculovirus, la estructura artificial VAAr con el codón CTG produce un virus que tiene una cantidad significativamente mayor de VP1, en comparación con la cantidad de VP2 en la cápsida. En este experimento en particular (Figura 5) la estequiometría de las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 producidas con las estructuras artificiales BAC-Cap GTG o ACG muestra una proporción similar de VP1 a VP2 en gel y la estructura artificial TTT parece expresar un poco menos de VP1 que VP2. Sin embargo, hemos observado repetidamente que las estructuras artificiales TTT y GTG muestran una estequiometría similar, en la que las proteínas VP1 y VP2 están presentes en cantidades aproximadamente iguales, mientras que la estructura artificial ACG produce por lo general una estequiometría en la que hay menos proteína VP1 que proteína VP2. Las estructuras artificiales CTG producen de forma constante una estequiometría en la que hay más proteína VP1 que proteína VP2.

Para mejorar adicionalmente las tasas de producción de VAAr, hemos preparado estructuras artificiales en donde los codones ACG y CTG, respectivamente, están presentes en una secuencia de consenso Kozak "GCCGCC(NNN)G" (véase SEQ ID NO: 8), en donde "(NNN)" identifica el posición de los codones ACG y CTG, respectivamente. La producción de VAA en células de insecto a partir de la estructura artificial en la que el codón CTG está precedido por la secuencia Kozak dio como resultado una producción significativamente mayor de VAA que la estructura artificial sin la secuencia Kozak (datos no mostrados). Por el contrario, la producción de VAA en células de insecto a partir de la estructura artificial en la que un codón ACG está precedido por la secuencia Kozak no dio lugar a una mayor producción de VAA (datos no mostrados).

2.5 Inyección de lotes de VAAr en ratones

- 5 Con el fin de verificar que el contenido de VP1 en la cápsida vírica está ligado a la infecciosidad del vector, los lotes de VAA1 producidos con baculovirus y el lote de VAA1 producido con plásmido se inyectaron en el músculo de ratones homocigotos LPL (-/-) y se monitorizó la reducción en triglicéridos (TG) como resultado de una expresión activa de LPL a lo largo del tiempo (Figura 6). Los resultados muestran que el lote de VAA1-LPL producido con el codón de iniciación CTG reduce, tal y como se esperaba, los niveles de TG más rápida y más profundamente en comparación con los otros lotes de VAA1. Sin embargo, es notable que, a pesar de que la estequiometría es similar, la disminución de TG con el mutante baculovirus-CTG es incluso mayor, en comparación con el VAA1 producido con plásmido (producido con pDP1).
- 10 Hemos observado repetidamente que el VAA producido con baculovirus, preparado con la estructura artificial CTG, obtenía mejores resultados, es decir, mostraba una infecciosidad más alta, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con un VAA preparado con las otras estructuras artificiales con codones de iniciación subóptimos, especialmente cuando se comparaba con la estructura artificial con el codón ACG. También hemos observado en repetidas ocasiones que el contenido de VP1 en viriones de VAA preparados con la estructura artificial CTG tiene
- 15 más VP1 en comparación con VP2 y que este no es el caso para las otras estructuras artificiales, especialmente para ACG.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amsterdam Molecular Therapeutics B.V.

<120> Vectores de VAA mejorados producidos en células de insecto

20 <130> P6004974PCT1

<140> P6004974PCT1

<141> 2006-10-20

<150> PCT/NL2005/050018

<151> 2005-10-20

25 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 49

<212> ADN

30 <213> secuencia sintética artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

cgcggtacct gttaagacgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc

49

35 <210> 2

<211> 49

<212> ADN

<213> secuencia sintética artificial

<220>

40 <223> cebador

<400> 2

cgcggtacct gttaagttgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc

49

ES 2 410 133 T3

<210> 3
<211> 49
<212> ADN
<213> secuencia sintética artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 3
cgcggtatcct gttaagattg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc
49

10 <210> 4
<211> 49
<212> ADN
<213> secuencia sintética artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 4
cgcggtatcct gttaaggtgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc
49

<210> 5
<211> 49
<212> ADN
20 <213> secuencia sintética artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
cgcggtatcct gttaagctgg ctgccgacgg ttatctaccc gattggctc
49

25 <210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> secuencia sintética artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 6
gtcgtaggcc ttgtcgtgct cgagggccgc
30

35 <210> 7
<211> 9
<212> ADN
<213> virus adenoasociado 2

<400> 7
cctgttaag
9

40 <210> 8
<211> 10
<212> ADN
<213> secuencia sintética artificial

ES 2 410 133 T3

<220>
<223> secuencia sintética artificial

<220>
<221> mist_feature
5 <222> (4)..(4)
<223> r = purina = A o G

<220>
<221> misc_feature

<222> (7)..(9)
10 <223> nnn representa un codón de iniciación subóptimo

<400> 8
gccrccnng
i0

<210> 9
<211> 47
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo

<400> 9
ccatcgggcg cggatcctgg ccgccacggc tgccgacggg tatctac
20 47

<210> 10
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
25 <223> cebador directo

<400> 10
ccatcgggcg cggatcctgc cggcctggct gccgacgggt atctac
46

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una estructura artificial de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 de un virus adenoasociado (VAA), en donde el codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida VP1 de VAA se selecciona entre CTG, TTG y GTG y en donde la secuencia de nucleótidos está ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión para la expresión en una célula de insecto.
2. Una estructura artificial de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde el codón de iniciación para la traducción de la proteína de la cápsida VP1 de VAA es CTG.
- 10 3. Una estructura artificial de ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia controladora de la expresión que comprende una secuencia de nueve nucleótidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a SEQ. ID NO: 7, antes del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA.
- 15 4. Una estructura artificial de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia controladora de la expresión que comprende una secuencia de consenso Kozak alrededor del codón de iniciación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA, en donde la secuencia de consenso Kozak es GCCRCC NNN G (SEQ. ID NO: 8), en donde R es una purina y en donde NNN representa un codón de iniciación subóptimo seleccionado entre CTG, TTG y GTG.
- 20 5. Una estructura artificial de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de nucleótidos comprende al menos una modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápsida VP1 de VAA seleccionada entre una G en la posición del nucleótido 12, una A en la posición del nucleótido 21 y una C en la posición del nucleótido 24.
- 25 6. Una estructura artificial de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de nucleótidos está ligada funcionalmente a un promotor poliédrico.
7. Una estructura artificial de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la estructura artificial es un vector compatible con una célula de insecto, preferiblemente un vector de baculovirus.
8. Una célula de insecto que comprende una estructura artificial de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Una célula de insecto según la reivindicación 8, en donde la célula de insecto comprende adicionalmente:
 - 30 (a) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de una repetición terminal invertida (RTI) de VAA;
 - (b) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificadora de Rep52 o Rep40 ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto; y
 - (c) una cuarta secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificadora de Rep78 o Rep68 ligada funcionalmente a secuencias controladoras de la expresión, para la expresión en una célula de insecto.
- 35 10. Una célula de insecto según la reivindicación 9, en donde la célula de insecto comprende:
 - (a) una primera estructura artificial de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la primera estructura artificial de ácido nucleico comprende, además, las secuencias de nucleótidos tercera y cuarta tal y como se han definido en (b) y (c) de la reivindicación 9; y
 - 40 (b) una segunda estructura artificial de ácido nucleico que comprende la segunda secuencia de nucleótidos tal y como se ha definido en (a) de la reivindicación 9.
11. Una célula de insecto según la reivindicación 10, en donde la segunda estructura artificial de ácido nucleico es un vector compatible con células de insecto, preferiblemente un vector de baculovirus.
- 45 12. Una célula de insecto según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende adicionalmente al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés preferentemente para la expresión en una célula de mamífero y en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, que codifica un producto génico de interés se incorpora en el genoma de un VAA producido en la célula de insecto.
- 50 13. Una célula de insecto según la reivindicación 12, en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende dos secuencias de nucleótidos de RTI de VAA y en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, que codifica un producto génico de interés se encuentra entre las dos secuencias de nucleótidos de RTI de VAA.

14. La célula de insecto según la reivindicación 9, en donde la primera secuencia de nucleótidos, la segunda secuencia de nucleótidos, la tercera secuencia de nucleótidos y la cuarta secuencia de nucleótidos se integran de forma estable en el genoma de la célula de insecto.
- 5 15. Un virión de VAA que comprende en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés, en donde la secuencia de nucleótidos, al menos una, no es una secuencia de nucleótidos de VAA natural, y en donde el virión de VAA comprende una proteína de la cápsida VP1 que comprende una leucina o una valina en la posición del aminoácido 1.
- 10 16. Un método para producir un VAA en una célula de insecto, que comprende las etapas de: (a) cultivar una célula de insecto tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 en condiciones tales que se produzca VAA; y (b) recuperar el VAA.
17. Un método según la reivindicación 16, que comprende además la etapa de purificación por afinidad del VAA utilizando un anticuerpo anti-VAA, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado.
18. Un método según la reivindicación 17, en el que el anticuerpo anti-VAA es un anticuerpo de camélido monocatenario o un fragmento del mismo.

Fig 1

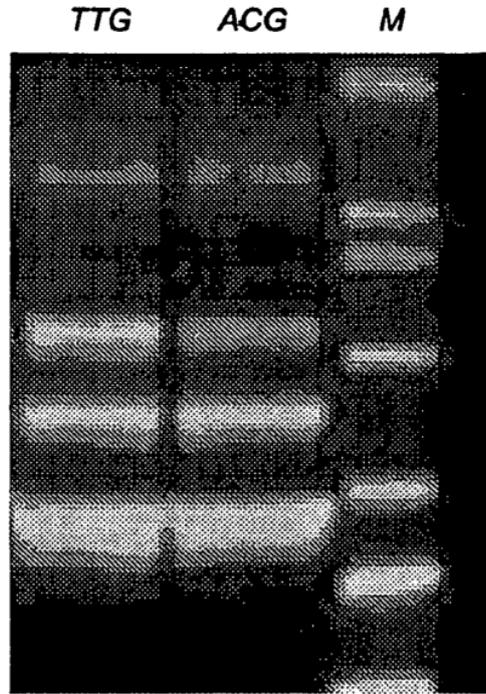


Fig 2

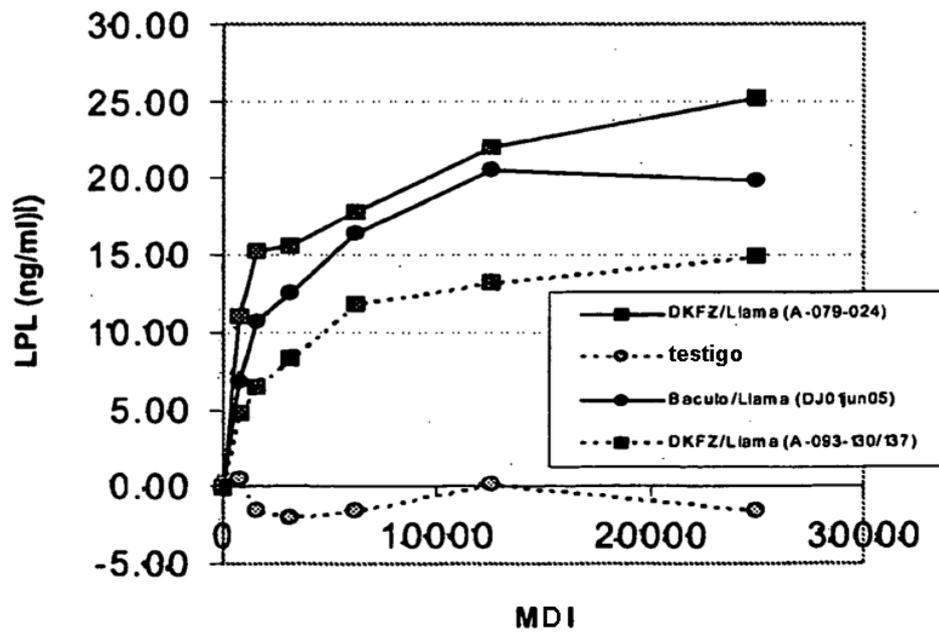


Fig 3

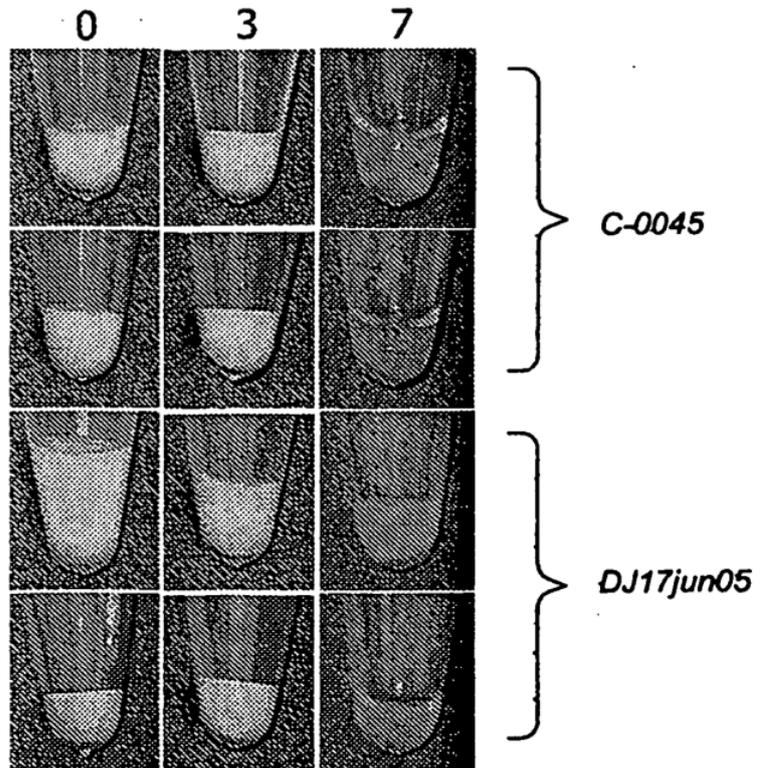
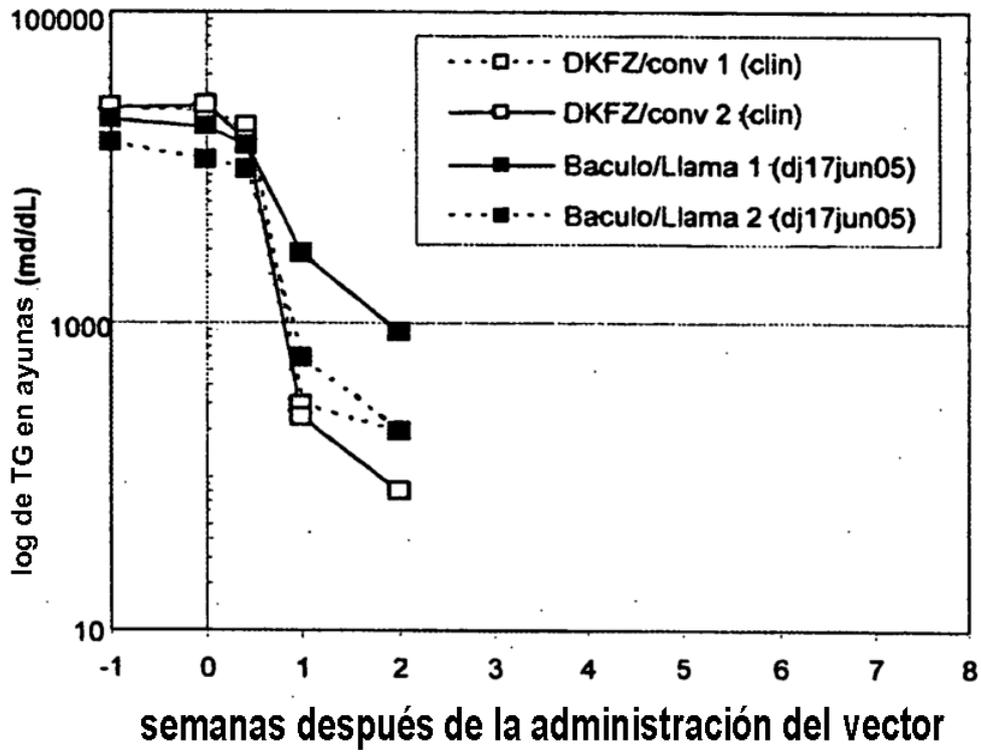


Fig 4

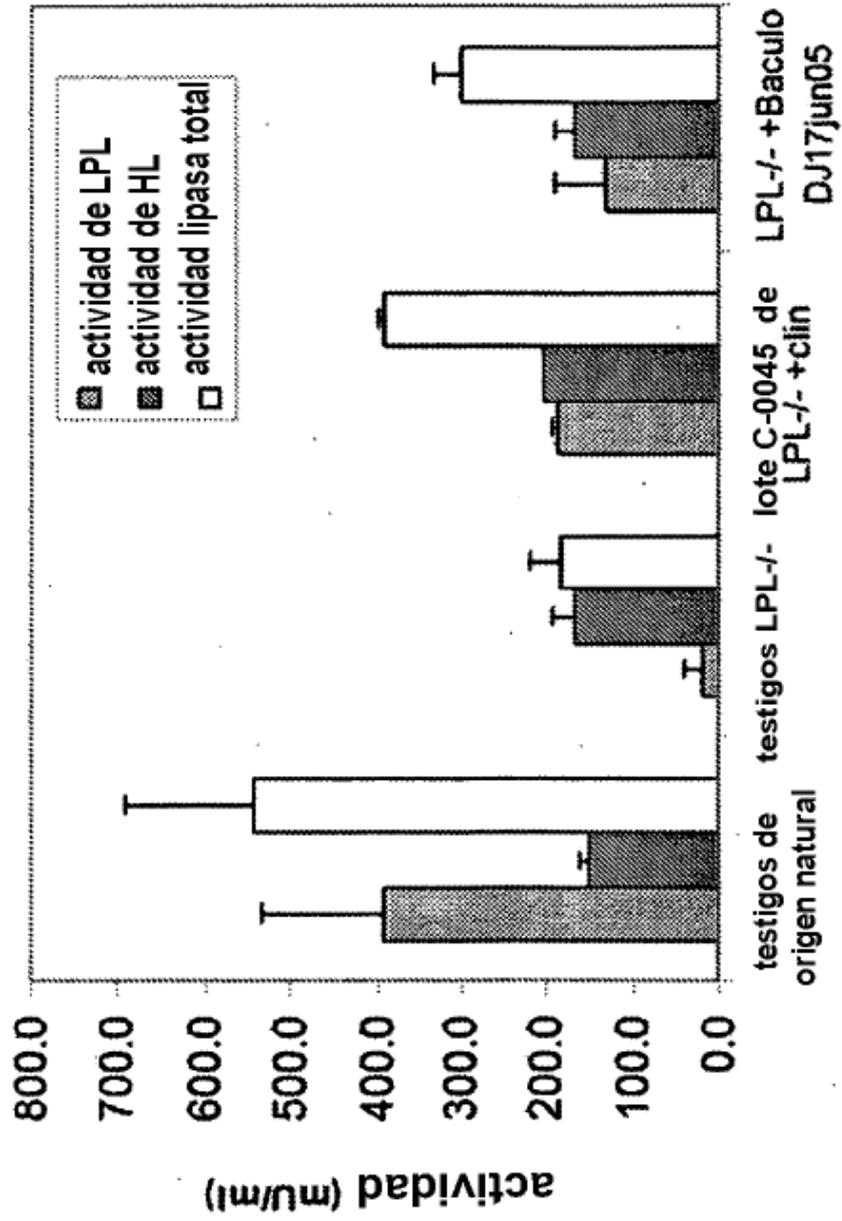


Fig 5

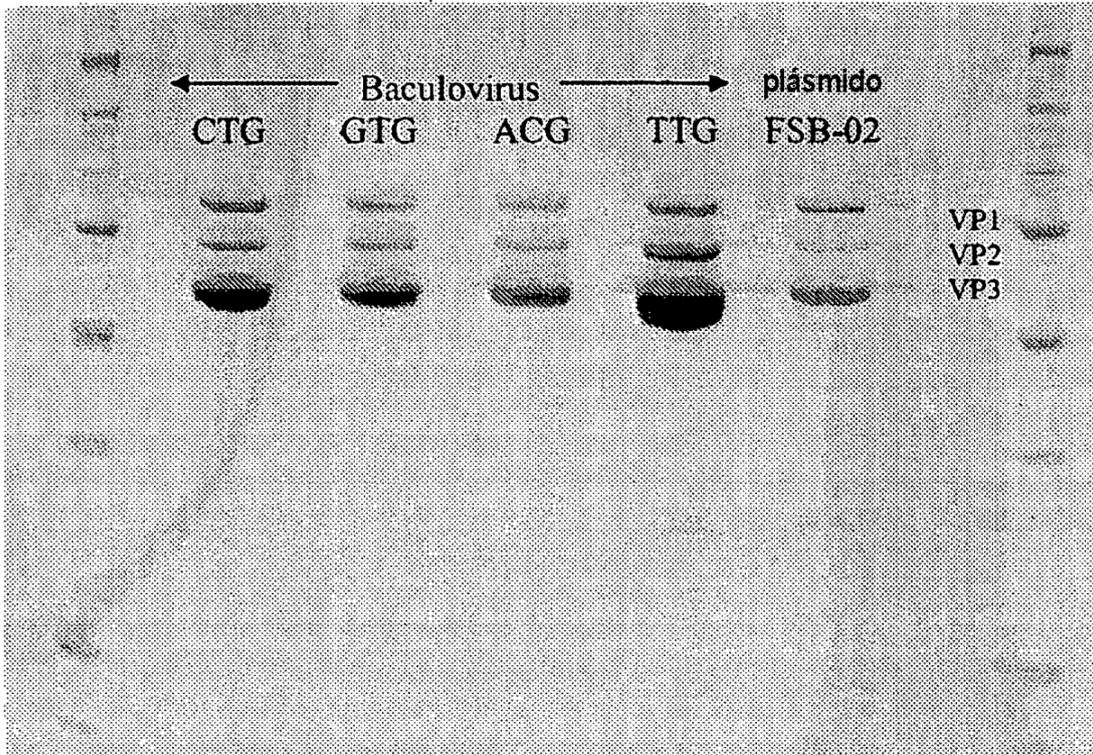


Fig 6

