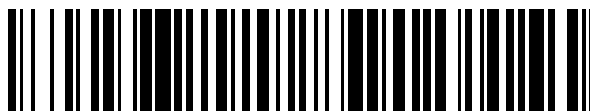


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 091**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2008 E 08831795 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2195439**

54 Título: **Uso de maquinaria de replicación de AAV para producción de proteína mejorada**

30 Prioridad:

19.09.2007 EP 07075817

19.09.2007 US 973517 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2013

73 Titular/es:

UNIQUE IP B.V. (100.0%)

Meibergdreef 61

1105 BA Amsterdam Zuidoost, NL

72 Inventor/es:

HERMENS, WILHELMUS THEODORUS

JOHANNES MARIA CHR.;

NOORDMAN, YVET y

BAKKER, ANDREW CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 426 091 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

Uso de maquinaria de replicación de AAV para producción de proteína mejorada.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al sector de las construcciones de ácido nucleico y de líneas celulares que permiten la expresión incrementada de proteína objetivo endógena o heteróloga.

10 **Antecedentes de la invención**

La producción industrial de proteínas recombinantes cubre un área amplia de desarrollos y aplicaciones. La producción de proteína recombinante por célula o por litro de medio de cultivo es una baza importante para el desarrollo de sistemas de producción mejorados.

15 Los métodos actuales de expresar genes en células de mamífero o de insecto para la producción industrial de proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales o vacunas incluyen el uso de líneas de células estables o la transfección de células productoras utilizando vectores, tal como los que se derivan de adenovirus, virus Sindbis, o baculovirus. Otros métodos para la introducción de un gen exógeno en una célula de mamífero o célula de insecto incluyen inyección directa de ADN, el uso de conjugados de ligando – ADN, el uso de conjugados de adenovirus – ligando – ADN, precipitación de fosfato de calcio, y métodos que utilizan un complejo de liposoma- o de polimerización – ADN.

25 En la naturaleza, los baculovirus son virus que contienen ADN de doble cadena, que infectan una diversidad de especies de insectos diferentes. La familia de los baculovirus puede ser dividida en dos géneros, uno de los cuales son los nucleopoliedrovirus. Los nucleopoliedrovirus inducen la formación de cuerpos de oclusión paracrystalinos en los núcleos de células anfitrión infectadas. Estos cuerpos de oclusión están compuestos principalmente por una proteína viral simple, la polihedrina, que se expresa a niveles muy altos. El gen de polihedrina ha sido clonado y secuenciado, y sus características únicas han proporcionado la base para el desarrollo de una serie de vectores de expresión de baculovirus (Summers, M.D. y Smith, G.E., TAES Bull. 1555 (1987); Luckow, V.A. y Summers, M.D., Biotechnology 6:47-55 (1988); Miller, L.K., Ann. Rev. Microbiol. 42:177-179 (1988); Patente U.S. núm. 4.745.051, G.E. Smith y M.D. Summers (depositada el 27 de Mayo de 1983; concedida el 17 de Mayo de 1988)).

35 El sistema de expresión de baculovirus usado junto con células de insecto ha resultado estar bien establecido para la producción de proteínas, debido a sus ventajas en cuanto a versatilidad y velocidad. En el sistema de expresión de baculovirus, se utiliza un vector baculoviral recombinante para introducir un gen de interés en células de insecto. La infección de las células de insecto da como resultado la replicación del genoma de vector de baculovirus recombinante, incrementando con ello el número de plantillas genéticas que codifican el gen de interés y que incrementan el nivel de expresión de proteína recombinante.

40 La expresión de proteína mediada por baculovirus proporciona un plegamiento correcto de las proteínas recombinantes, así como la formación de enlace disulfuro, la oligomerización y otras modificaciones post-traslacionales importantes que proporcionan actividad y función biológica apropiadas. De hecho, el plegamiento de proteína y el procesamiento post-traslacional de una proteína eucariótica en células de insecto es completamente comparable a líneas de células de mamífero. Además, las células de insecto pueden hacerse crecer en un medio libre de suero, lo que constituye una ventaja en términos de costes y también de bioseguridad. Otra ventaja de la expresión de proteína mediada por baculovirus es que los baculovirus solamente infectan insectos lepidópteros, por lo que no son infecciosos para los vertebrados y resultan ser agentes de manipulación genética relativamente seguros. Además, se sabe que el sistema de expresión de baculovirus es una plataforma tecnológica que da como resultado altos niveles de expresión de proteína en células de insectos. Una desventaja del sistema de expresión de baculovirus consiste en que la infección de la célula productora (célula de insecto) es letal para esa célula en unos pocos días, obstaculizando la producción continua de la proteína recombinante de interés.

55 Zeng et al. (2007, Stem Cells 25: 1055-1061) divulgan una construcción de expresión de baculovirus que comprende un gen de interés así como un gen de AAV rep78/68 y secuencias de ITR de AAV para la integración de la construcción en el sitio AAVS1 del genoma humano de células madre embrionarias humanas.

60 Sollerbrant et al. (2001, J. Gen. Virol. 82: 2051-2060) divulgan células HEK293 de mamífero, transfectadas con construcciones separadas de baculovirus que comprenden (i) un gen informador flanqueado por secuencias de ITR de AAV, (ii) un gen Rep de AAV, y (iii) un gen Cap de AAV, respectivamente, para la producción de vectores de rAAV.

Existe todavía, sin embargo, una necesidad en el estado de la técnica de niveles incrementados de producción de productos de gen de interés en células tales como las células de insectos.

65 **Descripción de la invención**

Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, el término “enlazado operativamente” se refiere a un enlace de elementos polinucleótidos (o polipéptidos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está “enlazado operativamente” cuando está dispuesto en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia reguladora de transcripción está enlazada operativamente con una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia de codificación. Enlazado operativamente significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son típicamente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en pauta de lectura.

“Secuencia de control de expresión” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una secuencia de nucleótido a la que está operativamente enlazada. Una secuencia de control de expresión está “enlazada operativamente” a una secuencia de nucleótido cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y/o la traducción de la secuencia de nucleótido. De ese modo, una secuencia de control de expresión puede incluir promotores, potenciadores, sitios de entrada de ribosoma interno (IRES), terminadores de transcripción, un codón de inicio frente a un gen de codificación de proteína, señal de empalme para intrones, y codones de interrupción. El término “secuencia de control de expresión” se entiende que incluye, como mínimo, una secuencia cuya presencia está diseñada para influir en la expresión, y que puede incluir también componentes ventajosos adicionales. Por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión son secuencias de control de expresión. El término puede incluir también el diseño de la secuencia de ácido nucleico de tal modo que los codones indeseables, de iniciación potencial dentro y fuera de la pauta, sean retirados de la secuencia. También puede incluir el diseño de la secuencia de ácido nucleico de tal modo que los sitios de empalme potencial indeseable sean eliminados. Esto incluye secuencias o secuencias de poliadenilación (pA) que dirigen la adición de una cola de poliA, es decir, una cadena de residuos de adenina en el extremo 3' de un mRNA, secuencias mencionadas como secuencias de poliA. También puede estar diseñada para potenciar la estabilidad del mRNA. Secuencias de control de expresión que afectan a la estabilidad de transcripción y de traducción, por ejemplo promotores, así como secuencias que afectan a la traducción, por ejemplo secuencias de Kozak, son bien conocidas en células de insectos. Las secuencias de control de expresión pueden ser de una naturaleza tal que modulen la secuencia de nucleótido a la que están operativamente enlazadas de tal modo que se consigan niveles de expresión más bajos o niveles de expresión más altos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “promotor” o “secuencia reguladora de transcripción” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que actúa para controlar la transcripción de una o más secuencias de codificación, y que está situado corriente arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción de la secuencia de codificación, y que está identificado estructuralmente por la presencia de un sitio de enlace para polimerasa de ARN dependiente del ADN, sitios de iniciación de transcripción y otras secuencias de ADN incluyendo, aunque sin limitación, los sitios de enlace del factor de transcripción, los sitios de enlace de proteína represora y activadora, y cualesquiera otras secuencias de nucleótidos que un experto en la materia sabe que actúan directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción desde el promotor. Un promotor “constitutivo” es un promotor que está activo en la mayor parte de los tejidos bajo las condiciones más fisiológicas y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que está regulado fisiológicamente o en desarrollo, por ejemplo mediante la aplicación de un inductor químico. Un promotor “específico del tejido” es solamente activo en tipos específicos de tejidos o de células.

Los términos “sustancialmente idéntico”, identidad sustancial” o “esencialmente similar” o “similitud esencial” significan que secuencias de dos péptidos o de nucleótidos, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan parámetros por defecto, comparten al menos un cierto porcentaje de identidad de secuencia según se define en alguna parte de la presente memoria. GAP usa el algoritmo de alineamiento global Needleman and Wunsch para alinear dos secuencias en la totalidad de su longitud, optimizando el número de emparejamiento y minimizando el número de espacios de separación. Generalmente, se utilizan los parámetros por defecto del GAP, con una penalización de creación de espacio de separación = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas), y una penalización de extensión de espacio de separación = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto utilizada es nwsgapdna y la matriz de puntuación por defecto para proteínas es Blosom62 (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 secuencias de ADN, la timina (T) de la secuencia de ADN se considera igual que el uracilo (U) de la secuencia de ARN. Los alineamientos y las puntuaciones de las secuencias para un porcentaje de identidad de secuencia pueden ser determinados utilizando programas de ordenador, tal como GCG Wisconsin Package, Versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA o en Emboss de código abierto para Windows (versión actual 2.7.1-07). Alternativamente, el porcentaje de similitud o de identidad puede ser determinado buscando en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

Las secuencias de nucleótido que codifican proteínas Rep de AAV de la presente invención, pueden estar definidas también por su capacidad de hibridizarse con la secuencia de nucleótido de SEQ ID Núm. 2, bajo condiciones de hibridación moderada o preferentemente bajo condiciones de hibridación rigurosa. Las condiciones de hibridación

rigurosa se definen en la presente memoria como condiciones que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos alrededor de 25, con preferencia aproximadamente 50 nucleótidos, 75 ó 100 y más preferentemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridicen a una temperatura de alrededor de 65 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, con preferencia 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una intensidad iónica comparable, y el lavado a 65 °C en una solución que comprenda aproximadamente 0,1 M de sal, o menos, con preferencia 0,2 x SSC o cualquier otra solución que tenga una intensidad iónica comparable. Con preferencia, la hibridación se realiza durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas y con preferencia 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 tengan alrededor de un 90% o más de identidad de secuencia.

Las condiciones moderadas se definen en la presente memoria como condiciones que permiten que secuencias de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos, con preferencia de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridicen a una temperatura de alrededor de 45 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, con preferencia 6 x SSC, o cualquier otra solución que tenga una intensidad iónica comparable, y lavado a temperatura ambiente en una solución que comprende alrededor de 1 M de sal, con preferencia 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una intensidad iónica comparable. Con preferencia, la hibridación se realiza durante la noche, es decir al menos durante 10 horas, y con preferencia 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 tengan hasta un 50% de identidad de secuencia. El experto en la materia estará capacitado para modificar estas condiciones de hibridación con el fin de identificar específicamente secuencias que varíen de identidad entre un 50% y un 90%.

Los términos "transformado" o "transfectado" se utilizan intercambiamente y se refieren al proceso mediante el que el ADN o el ARN exógeno es transferido a, o introducido en, una célula anfitrión apropiada. Adicionalmente, los ácidos nucleicos que codifican otras proteínas heterólogas pueden ser introducidos en la célula anfitrión. Tales células transfectadas incluyen células transfectadas de forma estable en las que el ADN insertado resulta ser capaz de replicación en la célula anfitrión. Típicamente, la transfección estable requiere que el ADN exógeno sea transferido junto con una secuencia de ácido nucleico marcador seleccionable, tal como por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que confiera resistencia antibiótica, lo que permite la selección de los transfectantes estables. Esta secuencia de ácido nucleico marcador puede ser ligada al ADN exógeno o ser proporcionada independientemente mediante co-transfección simultánea junto con el ADN exógeno. Las células transfectadas incluyen también células de expresión transitoria que estén capacitadas para expresar el ARN o el ADN durante períodos de tiempo limitados. El procedimiento de transfección depende de la célula anfitrión que está siendo transfectada. Esto puede incluir el empaquetamiento del polinucleótido en un virus, así como la captación directa del polinucleótido. La transformación puede dar como resultado la incorporación del ADN insertado en el genoma de la célula anfitrión o el mantenimiento del ADN insertado dentro de la célula anfitrión en forma de plásmido. Se conocen bien en el estado de la técnica métodos de transformación/transfección, e incluyen, aunque sin limitación, inyección directa, tal como microinyección, infección viral, infección por adenovirus de replicación particularmente deficiente, electroporación, lipofección, absorción directa mediada por fosfato de calcio y similares.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de utilización de la maquinaria de replicación de AAV para la producción incrementada de una secuencia de proteína y/o de ácido nucleico, de interés en una célula. La co-expresión de una o más proteínas Rep de AAV y una secuencia de ácido nucleico flanqueada por ITRs de AAV, incrementa tanto la expresión de la proteína de interés como el número de copias transcritas de la secuencia de ácido nucleico de interés.

Los virus de la familia Parvoviridae son pequeños virus animales de ADN. La familia Parvoviridae puede ser dividida en dos subfamilias: la Parvovirinae, que infecta vertebrados, y la Densovirinae, que infecta insectos. Miembros de la subfamilia Parvovirinae son mencionados en la presente memoria como parvovirus e incluyen el género Dependovirus. Como puede deducirse a partir del nombre de su género, los miembros de los Dependovirus son únicos en el sentido de que requieren habitualmente co-infección con un virus auxiliar tal como adenovirus o virus del herpes para una infección productiva en cultivo de células. El género Dependovirus incluye AAV, que normalmente infecta a 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 otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adeno-asociados de bovino, canino, equino y ovino). Información adicional sobre parvovirus y otros miembros de los Parvoviridae, ha sido descrita por Kenneth I. Berns, "Parvoviridae": Los Virus y su Replicación", Capítulo 69 en Campos Viroológicos (3ª Ed., 1996). La presente invención está además ejemplificada y descrita en la presente memoria por referencia a AAV.

La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal, de cadena simple, que es menor de aproximadamente 5.000 nucleótidos (nt) de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (ITRs) flanquean las secuencias de nucleótido de codificación única para las proteínas de replicación (Rep) no estructural y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP (VP1, -2, y -3)

forman el cápside. Los 145 nt terminales son auto-complementarios y están organizados de modo que se puede formar un dúplex intramolecular energéticamente estable conformados a modo de horquilla en forma de T. Estas estructuras de horquilla funcionan como origen para replicación de ADN viral, sirviendo como iniciadores para el complejo de polimerasa de ADN celular. A continuación de la infección de wtAAV en células de mamífero, los genes Rep (es decir, el Rep78 y el Rep52) son expresados a partir del promotor P5 y del promotor P19 respectivamente, y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma viral. Un evento de empalme en la ORF de Rep da como resultado la expresión de realmente cuatro proteínas Rep (es decir, la Rep78, la Rep68, la Rep52 y la Rep40). Sin embargo, se ha mostrado que el mRNA sin empalmar, que codifica proteínas Rep78 y Rep52, en células de mamífero es suficiente para la producción de vector de AAV. También en células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 son suficientes para la producción de vector de AAV.

Un "vector recombinante parvoviral o de AAV" (o "vector de rAAV") se refiere en la presente memoria a un vector que comprende una o más secuencias de polinucleótido de interés, genes de interés o "transgenes" que están flanqueados por secuencias de repetición terminales invertidas (ITRs) de AAV. Tales vectores de rAAV pueden ser replicados y empaquetados en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula anfitrión de insecto que está expresando productos de gen Rep y Cap de AAV (es decir proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando se incorpora un vector de rAAV en una construcción de ácido nucleico más grande (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o un baculovirus usado para clonación o transfección), entonces el vector de rAAV se menciona típicamente como "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y de funciones auxiliares necesarias.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de un producto de gen de interés, comprendiendo el método las etapas de:

a) proporcionar una célula de insecto que comprende:

i) una primera casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el producto de gen de interés que está operativamente enlazado a un promotor capacitado para inducir expresión del producto de gen en la célula de insecto, y en donde la primera casete de expresión está flanqueada por cualquiera de los lados por secuencias de nucleótido de repetición de terminal invertido (ITR) de virus adeno-asociados (AAV),

ii) al menos una segunda casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína Rep de AAV que está operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula de insecto;

2. b) cultivar la célula de insecto definida en a) bajo una condición que conduce a la expresión de la primera y la segunda casetes de expresión; y,

3. c) recuperar opcionalmente el producto de gen de interés, en donde la célula de insecto no comprende una proteína Cap parvoviral ni una secuencia de nucleótido que codifica una proteína Cap parvoviral, y en donde la primera y la segunda casetes de expresión están comprendidas en el (los) mismo(s) uno o dos vectores baculovirales separados.

Un producto de de gen de interés de la invención puede ser un polipéptido de interés o una secuencia de nucleótido (ácido nucleico) de interés. Un polipéptido puede ser de cualquier longitud incluyendo un dipéptido, un tripéptido, un (oligo) péptido, un polipéptido o una proteína. Se comprende que los términos péptido, polipéptido y proteína pueden ser usados intercambiabilmente en la presente memoria. El polipéptido puede ser un polipéptido homólogo, pero en una realización preferida de la invención el polipéptido es un polipéptido heterólogo para la célula anfitrión.

Una secuencia de nucleótido (ácido nucleico) puede estar presente en forma de ARN o en forma de ADN incluyendo el ADN genómico, es decir, el ADN que incluye los intrones, secuencias de ADN o de ADN sintético, y de ADN-ARN mezclados.

El término "homólogo", cuando se utiliza para indicar la relación entre un ácido nucleico (recombinante) dado o una molécula de polipéptido y un organismo anfitrión dado o célula anfitrión, se entiende que significa que la molécula de ácido nucleico o de polipéptido se producen en la naturaleza por medio de una célula anfitrión o de organismos de la misma especie, con preferencia de la misma variedad o cadena. Si es homólogo a una célula anfitrión, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido podrá estar típicamente enlazada operativamente a otra secuencia promotora o, en caso de que sea aplicable, a otra secuencia de señal secretora y/o secuencia terminadora distinta en su entorno natural.

El término "heterólogo", cuando se utiliza con respecto a un ácido nucleico o a una molécula de polipéptido, se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido procedente de una célula extraña que no se produce de forma natural como parte del organismo, la célula, el genoma o la secuencia de ADN o de ARN en la que esté presente, o que se encuentra en una célula o una localización o en localizaciones del genoma o de la secuencia de ADN o de ARN que difieren de aquella en la que se encuentra de forma natural. Los ácidos nucleicos o las proteínas heterólogas no son

endógenos respecto a la célula en la que se introducen, sino que han sido obtenidos a partir de otra célula o producidos de forma sintética o recombinante. En general, aunque no necesariamente, tales ácidos nucleicos codifican proteínas que no son producidas normalmente por la célula en que se transcribe o expresa el ADN, de manera similar códigos de ARN exógeno para proteínas no expresadas normalmente en la célula en la que está presente el ARN exógeno. Además, se sabe que la proteína o el polipéptido heterólogos pueden estar compuestos por elementos homólogos dispuestos en un orden y/o una orientación no encontrados normalmente en el organismo, tejido o célula anfitrión del mismo a donde han sido transferidos, es decir, la secuencia de nucleótido que codifica dicha proteína o polipéptido se origina a partir de la misma especie, pero se modifica sustancialmente a partir de su forma natural en cuanto a composición y/o locus genómico por intervención humana deliberada. Los ácidos nucleicos y las proteínas de tipo heterólogo pueden ser mencionadas también como ácidos nucleicos o proteínas extraños. Cualquier ácido nucleico o proteína que un experto en la materia pueda reconocer como heterólogo o extraño respecto a la célula en la que se expresa, está abarcado en la presente memoria por el término ácido nucleico o proteína de tipo heterólogo. El término heterólogo se aplica también a combinaciones no naturales de secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, es decir, combinaciones en las que al menos dos de las secuencias combinadas son extrañas cada una respecto a la otra.

El polipéptido de interés puede tener aplicaciones industriales o medicinales (farmacéuticas). Ejemplos de proteínas o de polipéptidos con aplicaciones industriales incluyen enzimas tales como, por ejemplo, lipasas (por ejemplo, usadas en la industria de los detergentes), proteasas (usadas *inter alia* en la industria de los detergentes, en la elaboración de cerveza y similares), enzimas que degradan la pared celular (tal como celulasas, pectinasas, beta-1,3/4- y beta-1,6-glucanasas, ramnogalacturonasas, mannasas, xilanasas, pululanases, galactanasas, esterases y similares, usadas en la fabricación de vino por procesamiento de frutas y similares o en alimentación), fitasas, fosfolipasas, glicosidasas (tales como amilasas, beta-glucosidasas, arabinofuranosidasas, ramnosidasas, apiosidasas y similares), enzimas lácteas (por ejemplo, quimosina). Los polipéptidos de mamífero, y con preferencia de humano, con aplicaciones terapéuticas, cosméticas o de diagnóstico incluyen, aunque sin limitación, enzimas (para terapia de sustitución enzimática), hormonas, quimosinas, interleuquinas, anticuerpo monoclonales (humanizados), y similares. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, insulina, apolipoproteína A (con preferencia, apolipoproteína A1) o E, albúmina de suero (HSA), CFTR, Factor IX, lactoferrina, lipoproteína lipasa (LPL, con preferencia LPL S447X; véase 01/00220), hemoglobina α y β , activador de plasminógeno del tejido (tPA), eritropoyetina (EPO), factores de necrosis tumoral (TNF), BMP (Proteína Morfogénica Ósea), factores del crecimiento (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, PDGF, EGF, IGF, y similares), hormonas de péptido (por ejemplo, calcitonina, somatomedina, somatotropina, hormonas de crecimiento, hormona estimuladora del folículo (FSH), citocinas o interleuquinas (IL-x), interferones (IFN-y), receptor de insulina, receptor de EGF, tirosina hidroxilasa, glucocerebrosidasa, Uridina Difosfato Glucuronosiltransferasa (UGT), Proteína de Interacción Reguladora de GTPasa Pigmentosa de Retinitis (RP-GRIP), porfobilinógeno desaminasa (PBGD) y alanina; glicoxilato aminotransferasa. Están además incluidos los fragmentos de anticuerpo variables de cadena simple (scFv). También están incluidos los antígenos protozoicos, bacterianos y virales, por ejemplo para su uso como vacunas, incluyendo por ejemplo la sub-unidad B de toxina termolábil, la sub-unidad B de toxina de cólera, el virus de Hepatitis B de proteína de superficie envolvente, el virus Norwalk de proteína de cápside, el citomegalovirus Humano de glicoproteína B, la glicoproteína S, y los receptores de corona virus de gastroenteritis transmisible, los virus linfotrópicos T humanos (HTLV-1) p40^x, HTLV-1 env, virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) gag, pol, sor, gp41 y gp120, adenovirus E1a, virus de encefalitis japonesa env (N), virus de papiloma bovino 1 (BPV1) E2, HPV6b E2, BPV1 E6, antígeno superficial de hepatitis B, VIH-1 env, VIH-1 gag, HTLV-1 p40.sup.x, producto de gen D. melanogaster, virus de lengua azul VP2 y VP3, hemaglutinina de virus de parainfluenza humana (HA), polimerasas de influenza PA, OB1 y PB2, virus de influenza HA, virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) GPC y N proteínas, proteína activadora Neurospora crassa, antígeno de poliomavirus T, antígeno t pequeño de virus de simio 40 (SV40), antígeno T grande de SV40, flebovirus N de Punta Toro y proteínas Ns, rotavirus de simio VP6, CD4 (T4), proteína estructural de virus Hantaan, proteína 130-kd de virus linfotrófico humano B, virus de hepatitis A, VP1, VP1 y VP2 de parvovirus-B19 humano, proteínas Cap no parvovirales, proteína E2 de Virus de la Fiebre Porcina Clásica, y similares. Además están incluidos los mutantes o análogos de los citados polipéptidos.

Una secuencia de nucleótido que codifica una proteína heteróloga puede ser derivada en su totalidad o en parte de cualquier fuente conocida en el estado de la técnica, incluyendo un genoma o episoma bacteriano o viral, ADN eucariótico nuclear o de plásmido, cADN o ADN sintetizado químicamente. La secuencia de nucleótido que codifica una proteína de interés puede constituir una región de codificación ininterrumpida o puede incluir uno o más intrones enlazados mediante uniones de empalme apropiadas, pudiendo estar además compuesto por segmentos derivados de diferentes fuentes, que se producen de forma natural o sintética. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés conforme al método de la invención es con preferencia una secuencia de nucleótido de longitud completa, pero puede ser también una parte funcionalmente activa u otra parte de dicha secuencia de nucleótido de longitud completa.

En una realización preferida, las secuencias de nucleótido de interés pueden codificar cualquier polipéptido, pero preferentemente un polipéptido que tenga aplicaciones industriales o medicinales (farmacéuticas). En lo que antecede se han proporcionado ejemplos de polipéptidos que tienen aplicaciones industriales o medicinales.

En una realización preferida adicional, una célula para su uso en el método de la invención puede ser una célula de

insecto. En una realización preferida, se puede usar cualquier célula de insecto que permita la expresión del producto de gen de acuerdo con el método de la invención y que pueda ser mantenida en cultivo, de acuerdo con la presente invención. En otra realización preferida, la célula de insecto es una célula susceptible de infección por baculovirus o una célula que permita la replicación del baculovirus. Por ejemplo, la línea de células usada puede ser

5 Spodoptera frugiperda, líneas de célula drosófila, o líneas de célula de mosquito, por ejemplo líneas de célula derivadas de Aedes albopictus.

Las células o líneas de células de insecto preferidas para su uso en la presente invención, incluyen por ejemplo S3302, SelZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, S2, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HaAm1, Ha2302, Hz2E5, High Five (Invitrogen, CA, USA) y *expressSF+*® (US 6, 103, 526; Protein Sciences Corp., CT, USA).

10

El término “primera casete de expresión” se define en la presente memoria como una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el producto de gen de interés, el cual está operativamente enlazado a un promotor capacitado para activar expresión del producto de gen en la célula, y en donde la primera

15 casete de expresión está flanqueada por al menos una secuencia de nucleótido de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. La primera casete de expresión comprende opcionalmente otras secuencias de control de expresión enlazadas operativamente al producto de gen de interés.

La primera casete de expresión está flanqueada por cada lado, es decir, tanto por el extremo 3' como por el extremo 5', por secuencias de nucleótido de ITR de AAV. El término “flanqueado” se entiende en la presente memoria como que las ITRs están suficientemente cerca de la primera casete de expresión como para permitir la replicación, es decir, incrementar el número de copia, de la primera casete de expresión por la al menos una proteína Rep de AAV. Con preferencia, la distancia entre una secuencia de ITR flanqueadora y el elemento regulador más corriente arriba o corriente abajo (es decir, terminal) en la casete de expresión, es menor de 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 ó 0,1 kb,

20 más preferiblemente la distancia es menor de 50, 20 ó 10 nucleótidos, y más preferiblemente la ITR flanqueadora está enlazada directamente a la casete de expresión.

El término “segunda casete de expresión” se define en la presente memoria como una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína de replicación (Rep) de AAV que está operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de la proteína Rep en la célula. La segunda casete de expresión comprende opcionalmente otras secuencias de control de expresión enlazadas operativamente a la al menos una proteína Rep de AAV.

30

En el método de la invención, la al menos una proteína Rep de AAV codificada en la segunda casete de expresión, preferentemente al menos es una proteína Rep 78 y/o una Rep 68 de AAV. La segunda casete de expresión puede comprender una trama de lectura abierta que comprenda secuencias de nucleótido que codifican proteínas Rep de AAV, en donde el codón de iniciación para traducción de la proteína Rep78 de AAV es un codón de iniciación que efectúa salto de exón parcial tras la expresión en la célula. Sin embargo, puesto que las proteínas Rep 52 y Rep 40 no son necesarias para la replicación mediada por ITR, no se requiere su expresión ni su presencia. Con ello,

40 realizaciones en las que la célula comprende una segunda casete de expresión para una proteína Rep78 o Rep68 de AAV y una tercera casete de expresión para una proteína Rep52 o Rep40 de AAV, no están excluidas en la invención pero no se requiere la presencia de dicha tercera casete de expresión, y se prefiere su ausencia.

En el método de la invención, las secuencias de ITR parvovirales y la proteína Rep parvoviral proceden de un virus adeno-asociado (AAV). Una secuencia de “AAV-ITR” o una “proteína Rep de AAV” usadas en el contexto de la presente invención, son “sustancialmente idénticas” a una AAV-ITR o a una proteína Rep de AAV. Tales secuencias “sustancialmente idénticas” incluyen, por ejemplo, secuencias que tienen al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o más de identidad de secuencia de nucleótido y/o de aminoácido (por ejemplo, una secuencia que tenga aproximadamente un 75-99% de identidad de secuencia de nucleótido) respecto a una secuencia de ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína Rep. De manera más preferible, la AAV-ITR comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a SEQ ID Núm. 1. Incluso más preferiblemente, la AAV-ITR comprende una secuencia que es idéntica a SEQ ID Núm. 1.

50

En una realización preferida, la secuencia de nucleótido codifica al menos una proteína Rep de AAV que es sustancialmente idéntica a SEQ ID Núm. 3. Incluso de forma más preferible, la proteína Rep de AAV codificada por la secuencia de aminoácido de la segunda casete de expresión es idéntica a SEQ ID Núm. 3.

55

Una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína Rep de AAV, se entiende en la presente memoria como una secuencia de nucleótido que codifica una o más proteínas Rep no estructurales. Con preferencia, la secuencia de nucleótido codifica al menos las proteínas Rep78, o las Rep78 y Rep 68, de AAV, que se requieren y que son suficientes para replicación de la primera casete de expresión flanqueada por ITRs, y la expresión del producto de gen de interés en la célula. La secuencia de ácido nucleico procede con preferencia de un AAV que normalmente infecta 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 ácido nucleico que codifica proteínas Rep de AAV se proporciona en SEQ ID

60

65

Núm. 2, la cual representa una parte del genoma de secuencia de serotipo 2 de AAV que codifica las proteínas Rep. La secuencia de codificación de Rep 78 comprende los nucleótidos 11 – 1876 y la secuencia de codificación de Rep52 comprende los nucleótidos 683 – 1876. Se comprende que los pesos moleculares exactos de las proteínas Rep78 y Rep52, así como las posiciones exactas de los codones de iniciación de traducción, pueden diferir entre parvovirus diferentes. Sin embargo, el experto en la materia podrá conocer cómo identificar la posición correspondiente en la secuencia de nucleótido procedente de parvovirus diferentes del AAV-2.

Alternativamente o en combinación con las realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional, una o más de las casetes de expresión de la invención forman parte de un vector de expresión. En otra realización preferida, la primera casete de expresión y la segunda casete de expresión son parte de un único vector de expresión y con preferencia están flanqueadas por al menos una secuencia de nucleótido de ITR de AAV. Incluso en otra realización preferida más, la primera casete de expresión y la segunda casete de expresión son parte de dos vectores de expresión separados. El término “vector” según se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto de ácido nucleico utilizado para introducir ADN exógeno en células anfitrión. El vector puede ser un vector para integración en el genoma de la célula anfitrión (usada en el método de la invención) o el vector puede ser un vector que no se integre en el genoma de la célula anfitrión tal como por ejemplo un vector episómico. Un ejemplo de vector episómico consiste, por ejemplo, en un vector de plásmido tal que comprende al menos un replicón y un segmento de ADN que puede ser usado para la inserción del ADN exógeno en el vector mediante técnicas recombinantes, con preferencia sin interferir con la capacidad de los plásmidos para replicar. El replicón es, con preferencia, un replicón para replicación en la célula usada en el método de la invención. Los vectores comprenden normalmente otros elementos genéticos para facilitar su uso en clonación molecular, tal como por ejemplo, marcadores seleccionables, múltiples sitios de clonación y similares (véase lo que sigue). Un “vector de expresión” según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier vector de clonación basado en plásmido, en el que están presentes un promotor y otros elementos reguladores para facilitar la transcripción de ADN exógeno insertado cuando el vector de expresión está presente en una célula anfitrión adecuada. Un “vector lanzadera” se refiere a un vector de plásmido que está capacitado para replicación y para mantenimiento estable en al menos dos organismos anfitriones diferentes, por ejemplo dos organismos de especies diferentes o de géneros diferentes. Para esta capacidad, el vector lanzadera puede apoyarse en un único replicón de amplio rango de anfitrión, pero normalmente un vector lanzadera comprenderá diferentes replicones para diferentes organismos anfitriones o para diferentes grupos de organismos anfitriones.

En una realización de la invención, la primera casete de expresión, que comprende el gen de interés y al menos una ITR, no se integra en el genoma de la célula (anfitrión). Con preferencia, al menos la primera casete de expresión está presente en un vector que no se integra en el genoma de la célula (anfitrión), por ejemplo un vector episómico. La segunda casete de expresión puede estar presente en el mismo vector no integrante que la primera casete, en un vector episómico diferente o la segunda casete de expresión puede integrarse en el genoma de la célula anfitrión.

En una realización preferida, un vector de expresión comprende un sitio de clonación múltiple según se conoce en el estado de la técnica. Tal sitio de clonación múltiple contiene varios sitios únicos de restricción diferentes que pueden ser usados convenientemente para inserción de fragmentos en los vectores.

En una realización preferida, la primera casete de expresión y/o la segunda casete de expresión comprenden al menos un promotor que está activo en la célula. Se pueden usar técnicas conocidas por un experto en la materia para expresión de genes extraños en células anfitrión de insecto, para poner en práctica la invención. La metodología para ingeniería molecular y expresión de polipéptidos en células de insecto ha sido descrita, por ejemplo, por Summers y Smith, 1986, Un manual de Métodos para Vectores de Baculovirus y Procedimientos de Cultivo de Insectos, Texas Agricultural Experimental Station Bull Núm. 7555, College Station, Tx.; Luckow 1991; In Prokop et al., Clonación y Expresión de Genes Heterólogos en Células de Insectos con ADN Recombinante del Vector de Baculovirus. Technology and Applications, 97-152; King, L.A. y R.D. Possee, 1992, El sistema de expresión de baculovirus, Chapman y Hall, Reino Unido; O'Reilly, D.R., L.K. Miller, V.A. Luckow, 1992, Vectores de Expresión de Baculovirus: Un Manual de Laboratorio, Nueva York; W.H. Freeman y Richardson, C.D., 1995, Protocolos de Expresión de Baculovirus, Métodos en Biología Molecular, volumen 39; documentos US 4.745.051; US 2003148506, y WO 03/074714. En una realización preferida, al menos una de las casetes de expresión está comprendida en un vector baculoviral. En otra realización, un promotor particularmente adecuado para transcripción de la secuencia de nucleótido de la invención que codifica las proteínas Rep de AAV es, por ejemplo, el promotor poliedro. Sin embargo, se conocen en el estado de la técnica otros promotores que están activos en células de insectos, por ejemplo los promotores p10, p35, IE-1 o Δ IE-1 y otros promotores descritos en las referencias citadas anteriormente.

El vector de expresión es compatible con la célula en la que se lleva a cabo la presente invención. El experto en la materia sabrá cómo seleccionar un vector de expresión apropiado.

Un “vector de expresión compatible con la célula del insecto” se entiende que es una molécula de ácido nucleico capaz de transformación o transfección productiva de un insecto o una célula de insecto. Ejemplos de vectores biológicos incluyen los plásmidos, las moléculas lineales de ácido nucleico, y los virus recombinantes. Se puede emplear cualquier vector siempre que sea compatible con la célula del insecto. El vector puede integrarse en el

genoma de la célula de insecto, pero la presencia del vector en la célula de insecto no necesita ser permanente y se incluyen también los vectores transitorios y/o episómicos. Los vectores pueden ser introducidos con 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 viral, o un plásmido. En una realización más preferida, el vector es un baculovirus, es decir, la construcción es un vector baculoviral. Los vectores baculovirales y los métodos para su uso, han sido descritos en las referencias citadas en lo que antecede sobre ingeniería molecular de células de insecto.

Alternativamente a, o en combinación con, las realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional, la primera casete de expresión y/o la segunda casete de expresión y/o el vector de expresión se introducen en la célula mediante transfección (o transformación). En una realización más preferida, la transfección es una transfección viral, una transfección química o una electroporación. En una realización más preferida se usa la transfección para generar una línea celular estable. En una realización incluso más preferida, la transfección para la generación de una línea celular estable es la transfección de CaPO_4 , la lipofección o la electroporación. La transfección (o transformación) de la construcción de vector de expresión y de ácido nucleico puede ser llevada a cabo ya sea uno detrás de otro o ya sea como co-transfección. En una realización preferida, la segunda casete de expresión es transfectada para generar una línea celular estable capacitada para expresión de al menos una proteína Rep parvoviral.

Alternativamente a, o en combinación con, realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional, la producción del producto de gen de interés se incrementa cuando se compara con la producción bajo las mismas condiciones, pero sin que esté presente la al menos una secuencia de nucleótido de ITR Parvoviral y/o la al menos una proteína Rep Parvoviral. Esto puede ser medido mediante ensayo RT-QPCR y/o mediante ensayos cuantitativos de proteína (por ejemplo, ELISA, etc.). El experto en la materia sabrá cómo determinar la producción del producto de gen de interés usando estos u otros métodos conocidos en el estado de la técnica.

Opcionalmente, el método de la invención puede comprender recuperación, o aislamiento y/o purificación, del polipéptido. El polipéptido puede ser recuperado, por ejemplo, desde el medio de cultivo mediante técnicas estándar de purificación de proteína, incluyendo una diversidad de métodos cromatográficos conocidos en la técnica en sí mismos. La recogida del polipéptido de interés depende del polipéptido expresado y de las células anfitrión usadas, pero puede comprender recuperar el polipéptido mediante aislamiento. Cuando se aplica a un polipéptido, el término "aislamiento" indica que la proteína se encuentra en una condición distinta de su entorno natural. En una forma preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos/proteínas, en particular otros polipéptidos homólogos. Se prefiere proporcionar el polipéptido en una forma pura mayor de un 40%, más preferiblemente una forma pura mayor del 60%. Incluso más preferiblemente, se prefiere proporcionar el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, mayor del 80% de pureza, más preferiblemente mayor del 95% de pureza, e incluso más preferiblemente mayor del 99% de pureza, según ha sido determinado por SDS-PAGE. Puede resultar muy útil expresar el polipéptido de interés como un polipéptido de fusión para facilitar la purificación del polipéptido y la detección del polipéptido sobre, por ejemplo, mancha Western y en un ELISA. Las secuencias de fusión adecuadas incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de proteínas tales como por ejemplo, la glutatióna-S-transferasa, la proteína de enlace de maltosa, la polihistidina de enlace de metal, la proteína fluorescente verde, la luciferasa y la β -galactosidasa. El polipéptido puede estar también acoplado a portadores no péptidos, rótulos o etiquetas que faciliten el rastreo del polipéptido, tanto *in vivo* como *in vitro*, y permitan la identificación y la cuantificación de enlace del polipéptido a substratos. Tales etiquetas, rótulos o portadores son bien conocidos en el estado de la técnica e incluyen, aunque sin limitación, biotina, etiquetas radiactivas y etiquetas fluorescentes.

Alternativamente a, o en combinación con, las realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional, la célula no comprende al menos una de entre una proteína Cap Parvoviral y una secuencia de nucleótido que codifique una proteína Cap Parvoviral.

Alternativamente a, o en combinación con, realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional del método de la invención, el número de copias del genoma de vector de AAV se incrementa al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 150 veces, más preferiblemente al menos 200 veces, en comparación con el método en el que la célula no está dotada de una secuencia de nucleótido que codifique al menos una proteína Rep de AAV que esté operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula. El experto en la materia sabe cómo determinar un número de copias, por ejemplo un número de copias de genoma de vector de AAV, por ejemplo mediante Q-PCR.

Alternativamente a, o en combinación con, realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional del método de la invención, la cantidad de expresión de proteína del producto de gen de interés se incrementa al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 25 veces, más preferiblemente al menos 30 veces, en comparación con el método en el que la célula no está provista de una secuencia de nucleótido que codifique al menos una proteína Rep

parvoviral que esté operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula. El experto en la materia sabrá cómo determinar la cantidad de expresión de proteína del producto de gen de interés, por ejemplo mediante ELISA o mancha Western.

5 Alternativamente a, o en combinación con, realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional del método de la invención, la actividad de la proteína codificada por el producto de gen de interés se incrementa al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 25 veces, más preferiblemente al menos 30 veces, en comparación con el
10 método en el que la célula no está dotada de una secuencia de nucleótido que codifique al menos una proteína Rep parvoviral que esté operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula.

15 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una célula según se ha descrito en lo que antecede, en donde la célula no comprende al menos una de entre una proteína Cap Parvoviral y una secuencia de nucleótido que codifique una proteína Cap Parvoviral.

20 Alternativamente a, o en combinación con, realizaciones preferidas anteriores, en una realización preferida adicional, la célula no expresa al menos una de entre una proteína Rep 52 Parvoviral y una proteína Rep 40, por ejemplo una proteína Rep 52 y una Rep 40 de AAV, o una proteína de replicación Parvoviral correspondiente.

25 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una célula según se ha descrito en lo que antecede, en donde la célula no expresa al menos una de entre una proteína Rep 52 y una proteína Rep 40 Parvovirales, por ejemplo una proteína Rep 52 y una Rep 40 de AAV, o una proteína de replicación Parvoviral correspondiente.

En una realización preferida, la célula puede ser una línea celular. En una realización más preferida, la célula puede ser una línea celular estable.

30 Aunque la metodología descrita en la presente memoria se considera que contiene suficiente detalle como para permitir a un experto en la materia poner en práctica la presente invención, los plásmidos pueden ser construidos y purificados usando técnicas de ADN recombinante estándar descritas en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory (1962) bajo las regulaciones actuales descritas por United States Dept. de HEW, Instituto Nacional de Sanidad (NIH) Directrices para Búsqueda de ADN Recombinante. Estas referencias incluyen procedimientos para los métodos estándar siguientes:
35 procedimientos de clonación con plásmidos de E. coli, transformación de células de E. coli, purificación de ADN de plásmido, extracción de ADN de fenol, precipitación de ADN de etanol, electroforesis de gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN procedentes de geles de agarosa, y endonucleasa de restricción y otras reacciones enzimáticas de modificación de ADN.

40 El ejemplo 3 de la presente memoria demuestra una ventaja inesperada de la presente invención: la co-infección de una célula de insecto con (1) un baculovirus que alberga un transgén de interés con (2) un baculovirus que expresa una proteína Rep parvoviral (es decir, AAV), reduce la muerte celular e incrementa la vida útil viable de la célula de insecto co-infectada. Con ello, la fase de producción del transgén de interés se prolonga y en consecuencia se incrementa el rendimiento de producción específica. Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a métodos
45 para reducir la muerte celular y/o incrementar la vida útil viable de la célula de insecto infectada con baculovirus y/o vectores baculovirales, en donde el método comprende la etapa de (co-)expresar una proteína Rep parvoviral según se ha definido en lo que antecede de la presente memoria, en la célula del insecto. Con preferencia, la proteína de replicación parvoviral es al menos una de entre una proteína Rep78 y una Rep68. Con preferencia, la célula de insecto no expresa al menos una de entre una proteína Rep 52 y una proteína Rep 40 de AAV o una proteína de replicación parvoviral correspondiente.
50

55 En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo “comprender” y sus conjugaciones, se utilizan en sentido no limitativo para indicar que los elementos que siguen a la palabra, están incluidos, pero elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Adicionalmente, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido “uno” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que exista uno y solamente uno de los elementos. El artículo indefinido “uno” o “una” significa por tanto normalmente “al menos uno”.

60 Los ejemplos que siguen se proporcionan con fines ilustrativos únicamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Descripción de las Figuras

65 Figura 1: Fluorescencia de GFP en medio SF900II tres días después de la infección de células SF+ con Bac. VD142 p0 o Bac. VD143 p0. La fluorescencia de fondo de la misma cantidad de células SF+ no infectadas en el medio ha sido restada de los datos.

Figura 2: Fluorescencia de GFP en células vivas re-suspendidas en PBS y medida en diferentes instantes de tiempo post infección (pi) de células SF+ con Bac. VD142 p3 o Bac. VD143 p3. La fluorescencia de fondo de la misma cantidad de células SF+ no infectadas en PBS fue restada de los datos.

Figura 3: Incremento del número de copias de genoma de vector mediante replicación inducida por Rep de AAV de una unidad de transgén de CMV-LPL flanqueada por ITRs de AAV (Barra 1), en comparación con replicación inducida por baculovirus del genoma de vector albergado sólo en baculovirus recombinante (Barra 2).

Figura 4: Actividad SEAP potenciada en células HeLa que co-expresan la proteína Rep. Dos y tres días después de la transfección se midió la actividad SEAP en el medio de cultivo de células HeLa transfectadas con pVD179(-) o con una combinación de pVD179 y pVD203 (pVD203). El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Expresión potenciada de proteína en células SF+ por co-expresión de la proteína Rep de AAV

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 Generación de baculovirus

Se utilizaron los plásmidos pVD142 y pVD143 para formar baculovirus recombinantes. El pVD142 contiene el casete de expresión pCMV-p10-GFP entre ITRs, y el pVD143 contiene la casete de expresión pPo1H-AAV2 Rep78/ACG y la pCMV-p10-GFP entre ITRs. El Bac. VD142 y el Bac. VD143 (p0) recombinantes fueron generados con el sistema *flashBAC*. Posteriormente, los baculovirus de p0 fueron amplificados diluyéndolos a 1:100 en células SF+ crecidas en fase log a una densidad de 2E+6 células/ml. Los baculovirus amplificados de p1 fueron cultivados durante tres días después de la infección. La amplificación de las siguientes fases se realizó de la misma manera.

1.1.2 Medición fluorométrica en células SF+

Células SF+ crecidas en fase log y a una densidad de 2E+6 células/ml fueron infectadas con baculovirus Bac. VD142 o Bac. VD143 (a partir de la etapa p0 o p3) a una dilución de 1:100. Se midió la fluorescencia GFP en varios instantes de tiempo diferentes a continuación de la infección. Se determinó la primera cantidad de células viables en cada muestra usando el Nucleocontador. A continuación, las células infectadas fueron diluidas a una densidad de 0,5E+6 células viables/ml con medio SF900II. De cada muestra, 100 µl (-50.000 células) fueron transferidas a 96 pocillos negros y se midió la fluorescencia usando el Fluoroskan Ascent (excitación a 485 nm y extinción a 520 nm). Cuando se midió la fluorescencia en células re-suspendidas en PBS (Figura 2), 800 µl de células (a una densidad de 0,5E+6 células viables/ml) fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rcf. El sedimento celular fue re-suspendido en 800 µl de PBS y se midió la fluorescencia según se ha descrito con anterioridad).

1.2 Resultados

La Figura 1 muestra fluorescencia en células vivas diluidas en medio SF900II tres días después de la infección de células SF+ con Bac. VD142 p0 o Bac. VD143 p0, según se midió usando el Fluoroskan Ascent. La fluorescencia de fondo de la misma cantidad de células SF+ no infectadas en el medio fue restada de los datos. La Figura 2 muestra fluorescencia en células vivas re-suspendidas en PBS medida por duplicado en diferentes instantes de tiempo post infección (pi) de células SF+ con Bac. VD142 p3 o Bac. VD143 p3. La expresión potenciada de GFP en células SF+ infectadas con Bac. VD143 resulta evidente. Después de tres días, las células infectadas con Bac. VD143 mostraron que tenían una fluorescencia GFP 5 veces más alta (2,5 u.a.) en comparación con la misma cantidad de células infectadas con Bac. VD142 (0,5 u.a.).

Ejemplo 2 – Expresión potenciada de transgén en células SF+ por co-expresión de proteína Rep de AAV

2.1 Materiales y métodos

2.1.1. Generación de baculovirus

Los plásmidos pVD43 y pVD88 fueron usados para preparar poblaciones de baculovirus recombinante (respect. Bac. VD43 y Bac. VD88). La construcción de VD43 contiene la unidad de expresión CMV-LPL-WPRE-poliA entre las dos ITRs de AAV. La construcción de VD88 contiene la ORF de Rep78/52 de AAV (modificada en el codón de iniciación de Rep78 ATG a ACG) bajo el control del promotor de célula de insecto PolH.

2.1.2 Amplificación del genoma de vector de AAV

Se utilizó virus preseleccionado de trabajo de Fase 4 para generar inóculo de baculovirus de fase 5 de Bac. VD43 y Bac. VD88. El inóculo fue usado para infectar en fase log células de insecto SF+ en crecimiento a una densidad

celular de 2E+6 células/ml ya sea con Bac. VD43 solo o ya sea con una mezcla de Bac. VD43 y Bac. VD88. Tres días después de la infección, los cultivos celulares fueron recogidos con tampón de lisis y el lisato crudo aclarado fue sometido inmediatamente a ensayo Q-PCR con el fin de determinar el número de copias de CMV.

5 2.1.3 Determinación del número de copias de genoma de vector de AAV

A continuación de la producción del genoma de vector de AAV, los cultivos lisados fueron sometidos inmediatamente a un ensayo Q-PCR usando iniciadores dirigidos al promotor CMV. Con el fin de evitar la degradación de las muestras de ADN de vector producidas de los cultivos lisados, no fueron tratadas con Benzonasa y durante el procedimiento Q-PCR se eliminó la etapa DNasa.

10 2.2 Resultados

La Figura 3 muestra los números de copias de vector en células de insectos infectadas con Bac. VD43 + Bac. VD88 (Barra 1) o bien con VD43 solamente (Barra 2). Las células fueron recolectadas tres días después de la infección y se midieron los números de copias de vector mediante Q-PCR. La replicación inducida por Rep de AAV (Bac. VD88) de la unidad de transgén de CMV-LPL flanqueada por ITRs de AAV (Bac. VD43) dio como resultado un incremento de más de 200 veces del número de copias del genoma de vector (CMV-LPL-WPRE-plyA) en comparación con la replicación inducida por baculovirus del genoma de vector albergado en baculovirus recombinante (Bac. VD43) solamente.

Ejemplo 3 – Viabilidad incrementada de las células SF+ por co-expresión de la proteína Rep de AAV

25 3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Determinación de densidad celular

La densidad celular viable a continuación de la infección con baculovirus se determinó con un Nucleocontador.

30 3.1.2 Virus

En el experimento se compararon dos baculovirus recombinantes. Un baculovirus que alberga una casete de expresión para el transgén LPL y un baculovirus que alberga una casete de expresión para la ORF Rep de AAV2.

35 Virus WSV banco Bac. VD88 PA Lote# P.536.C0102.01 (Baculovirus que alberga la casete de expresión Rep de AAV).

Virus WSV banco Bac. VD43 P4 Lote# P.536.C0100.01 (Baculovirus que alberga una casete de expresión para un gen de interés, es decir, LPL).

40 3.1.3 Células

Se cultivaron células ExpresSF+® a razón de 1E6 células/ml en frascos Shaker de 500 ml y se incubaron durante 17 horas a 28 °C, 135 rpm en una incubadora agitadora New Brunswick Innova 44R (MF-SIN-2002-s00). Estos cultivos fueron sembrados usando el medio SF900II (Invitrogen).

3.1.4 Infección

En el experimento, se infectaron Bac. VD43 o Bac. VD88, ya sea por sí solos o bien en combinación, sobre células SF+. La infección se produjo usando un volumen de virus respecto a un volumen de cultivo de 1:333.

3.2 Resultados

Con anterioridad a la adición de las poblaciones de baculovirus recombinantes (Bac. VD43, Bac. VD88 o Bac. VD43 + Bac. VD88) se realizó un conteo de células y se determinaron las viabilidades usando un NucleoContador (ENS: RD-SNC-0001-s00) conforme a GEN-SOP-SNC-8000 (versión 03). El medio de cultivo contenía 2,14E6 células viables/ml con una viabilidad del 99,7%. Aproximadamente 70 horas después de la infección de las células SF+ con construcciones de Baculovirus, se realizaron conteos celulares y se determinaron de nuevo las viabilidades.

60 La Tabla 1 muestra que la infección de Bac. VD43 que alberga una casete de expresión de interés (es decir, LPL bajo el control de un promotor CMV) da como resultado un incremento de muerte celular durante un período de 70 horas. Después de 70 horas no hay virtualmente células aún viables. Sin embargo, si las células son infectadas con Bac. VD88 que albergan una casete de expresión para la Rep de AAV, la muerte celular se reduce y da como resultado una densidad celular viable de un 86% a las 70 horas posteriores a la infección. Esto sugiere que la proteína Rep de AAV a continuación de la expresión en células de insecto tiene una función anti-apoptótica. Adicionalmente, los resultados muestran que la infección de células con ambas Bac. VD43 y Bac. VD88 puede

ralentizar la muerte celular (viabilidad de un 61% frente a un 0%), lo que ocurre normalmente si las células son infectadas solamente mediante Bac. VD43. Esto demuestra que la co-infección de un baculovirus que alberga un transgén de interés con un baculovirus que expresa una proteína Rep parvoviral (Bac. VD88) prolonga la fase de producción para el transgén de interés e incrementa consiguientemente el rendimiento de producción.

5 Esta observación es digna de mención puesto que la expresión de la proteína Rep de AAV en células de mamífero ha sido hasta ahora siempre asociada con la inducción de apoptosis de las células. Para células de insectos, este fenómeno no ha sido aún descrito.

10 Tabla 1: Bac. VD43, Bac. VD88 o Bac. VD43 y Bac. VD 88 fueron infectadas sobre células SF+ y se monitorizaron las densidades celulares viables a las 70 horas post-infección

Construcción	Densidad celular viable (células/ml)	Densidad celular total (células/ml)	Viabilidad (%)
Bac. VD43	0	1,47E+06	0
Bac. VD43 + Bac. VD88	2,30E+06	3,35E+06	61,7
Bac. VD88	2,94E+06	3,45E+06	86,5

15 Ejemplo 4 – Expresión potenciada de proteína en células de mamífero mediante co-expresión de la proteína Rep de AAV

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Generación de plásmidos

El plásmido pVD179 contiene la casete de expresión de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) bajo control del promotor CMV y está flanqueado por ITRs virales. Este plásmido fue construido por clonación de la casete de expresión SEAP a partir de pSEAP2-Control (Clontech Laboratories Inc.) en pVD43. Brevemente, el pSEAP2-Control fue digerido con EcoRI y HpaI y el fragmento de 1694 bp fue despuntado, purificado y ligado en plásmido pVD43 despuntado, a partir del cual se borró la casete LPL-WPRE con una digestión de RsrII. El plásmido pVD203 contiene la casete de expresión Rep de AAV2 bajo control del promotor p5 de AAV2 y fue construido borrando la casete de expresión de cápside de AAV8 del p5E18-VD2/8 con una digestión EcoNI y PmeI, despuntando los salientes 5' y religando el plásmido.

4.1.2 Transfección de células de mamífero

Se cultivaron células HeLa en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y se cultivaron a 37 °C con un 5% de CO₂. Las células fueron sembradas a una densidad de 2E5 células/pocillo de una placa de 24 pocillos un día antes de ser transfectadas usando polietileno-imina (PEI, PM - 25000, Polysciences Inc.). Por cada pocillo, se añadieron 3,0 µl de PEI (1 µg/µl) a 50 µl 150 mM de NaCl que contenía 0,5 µg de pVD179 y 0,5 µg de ADN de relleno o 0,5 µg de pVD203, e inmediatamente después de agitar la mezcla de transfección fue incubada durante 10 minutos a TA. El medio de los pocillos fue sustituido por 450 µl de medio de cultivo fresco con anterioridad a la adición de la mezcla de transfección a las células y su incubación a 37 °C con un 5% de CO₂.

4.1.3 Ensayo de actividad SEAP

45 Dos y tres días después de la transfección, se extrajeron 75 µl de medio de cultivo de las células HeLa, se centrifugaron durante 10 segundos a 12000 g para sedimentar las células desprendidas, y se almacenaron 60 µl del sobrenadante a -20 °C. La expresión SEAP se midió con el kit Great Escape Chemiluminescence 2.0 (Clontech Laboratories Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, 25 µl de cada muestra fueron diluidos en 75 µl de solución tampón 1xDilution, se incubaron a 65 °C durante 30 minutos y se enfriaron sobre hielo durante 2-3 minutos. Tras el equilibrado de las muestras a TA, se añadieron 100 µl de solución de sustrato de SEAP a cada muestra y se incubaron durante 20 minutos. La señal de quimioluminiscencia fue detectada con un luminómetro a 470 nm durante 1 segundo.

4.2 Resultados

55 La Figura 4 muestra la actividad SEAP en células HeLa infectadas ya sea con pVD179 (-) o ya sea con pVD179 + pVD203 (pVD203), 2 y 3 días después de la transfección. La co-expresión de pVD203 (la proteína Rep) dio como resultado un incremento de una 1,8 veces y 1,5 veces de la actividad SEAP en el medio, respectivamente, en comparación con las células transfectadas solamente con pVD179.

Listado de secuencias

5 <110> Amsterdam Molecular Therapeutics B.V.
 <120> Uso de maquinaria de replicación de AAV para la producción mejorada de proteína
 <130> P6016625
 10 <160> 3
 <170> Patentin versión 3.3
 <210> 1
 15 <211> 146
 <212> ADN
 20 <213> virus adeno-asociado 2
 <400> 1
 gggggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccggc aaagcccggg 60
 25 cgtcggcgca cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agaggggagtg 120
 gccaaactcca tcactagggg ttctc 146
 30 <210> 2
 <211> 1876
 <212> ADN
 35 <213> virus adeno-asociado 2
 <220>
 40 <221> CDS
 <222> (11) .. (1876)
 <223> Rep 78
 45 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (683) .. (1876)
 <223> secuencia de codificación Rep 52
 <400> 2
 55

ES 2 426 091 T3

cg	cag	cc	gcc	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						

ES 2 426 091 T3

agt Ser 110	cag Gln	att Ile	cgc Arg	gaa Glu	aaa Lys 115	ctg Leu	att Ile	cag Gln	aga Arg	att Ile 120	tac Tyr	cgc Arg	ggg Gly	atc Ile 125	gag Glu	385
ccg Pro	act Thr	ttg Leu	cca Pro	aac Asn 130	tgg Trp	ttc Phe	gcg Ala	gtc Val 135	aca Thr	aag Lys	acc Thr	aga Arg	aat Asn	ggc Gly 140	gcc Ala	433
gga Gly	ggc Gly	ggg Gly	aac Asn 145	aag Lys	gtg Val	gtg Val	gat Asp	gag Glu 150	tgc Cys	tac Tyr	atc Ile	ccc Pro	aat Asn 155	tac Tyr	ttg Leu	481
ctc Leu	ccc Pro	aaa Lys 160	acc Thr	cag Gln	cct Pro	gag Glu 165	ctc Gln	cag Gln	tgg Trp	gcg Ala	tgg Trp	act Thr 170	aat Asn	atg Met	gaa Glu	529
cag Gln	tat Tyr 175	tta Leu	agc Ser	gcc Ala	tgt Cys	ttg Leu 180	aat Asn	ctc Leu	acg Thr	gag Glu	cgt Arg 185	aaa Lys	cgg Arg	ttg Leu	gtg Val	577
gcg Ala 190	cag Gln	cat His	ctg Leu	acg Thr	cac His 195	gtg Val	tcg Ser	cag Gln	acg Thr	cag Gln 200	gag Glu	cag Gln	aac Asn	aaa Lys	gag Glu 205	625
aat Asn	cag Gln	aat Asn	ccc Pro	aat Asn 210	tct Ser	gat Asp	gcg Ala	ccg Pro	gtg Val 215	atc Ile	aga Arg	tca Ser	aaa Lys	act Thr 220	tca Ser	673
gcc Ala	agg Arg	tac Tyr	atg Met 225	gag Glu	ctg Leu	gtc Val	ggg Gly	tgg Trp 230	ctc Leu	gtg Val	gac Asp	aag Lys	ggg Gly 235	att Ile	acc Thr	721
tcg Ser	gag Glu	aag Lys 240	cag Gln	tgg Trp	atc Ile	cag Gln	gag Glu 245	gac Asp	cag Gln	gcc Ala	tca Ser	tac Tyr 250	atc Ile	tcc Ser	ttc Phe	769
aat Asn 255	gcg Ala	gcc Ala	tcc Ser	aac Asn	tcg Ser	cgg Arg 260	tcc Ser	caa Gln	atc Ile	aag Lys	gct Ala 265	gcc Ala	ttg Leu	gac Asp	aat Asn	817
gcg Ala 270	gga Gly	aag Lys	att Ile	atg Met	agc Ser 275	ctg Leu	act Thr	aaa Lys	acc Thr	gcc Ala 280	ccc Pro	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu	gtg Val 285	865
ggc Gly	cag Gln	cag Gln	ccc Pro	gtg Val 290	gag Glu	gac Asp	att Ile	tcc Ser 295	agc Ser	aat Asn	cgg Arg	att Ile	tat Tyr	aaa Lys 300	att Ile	913
ttg Leu	gaa Glu	cta Leu	aac Asn 305	ggg Gly	tac Tyr	gat Asp	ccc Pro	caa Gln 310	tat Tyr	gcg Ala	gct Ala	tcc Ser	gtc Val 315	ttt Phe	ctg Leu	961
gga Gly	tgg Trp	gcc Ala 320	acg Thr	aaa Lys	aag Lys	ttc Phe	ggc Gly 325	aag Lys	agg Arg	aac Asn	acc Thr	atc Ile 330	tgg Trp	ctg Leu	ttt Phe	1009
ggg Gly 335	cct Pro	gca Ala	act Thr	acc Thr	ggg Gly	aag Lys 340	acc Thr	aac Asn	atc Ile	gcg Ala 345	gag Glu	gcc Ala	ata Ile	gcc Ala	cac His	1057
act Thr 350	gtg Val	ccc Pro	ttc Phe	tac Tyr	ggg Gly 355	tgc Cys	gta Val	aac Asn	tgg Trp	acc Thr 360	aat Asn	gag Glu	aac Asn	ttt Phe	ccc Pro 365	1105
ttc Phe	aac Asn	gac Asp	tgt Cys	gtc Val 370	gac Asp	aag Lys	atg Met	gtg Val	atc Ile 375	tgg Trp	tgg Trp	gag Glu	gag Glu	ggg Gly 380	aag Lys	1153

ES 2 426 091 T3

agt Ser 110	cag Gln	att Ile	cgc Arg	gaa Glu	aaa Lys 115	ctg Leu	att Ile	cag Gln	aga Arg	att Ile 120	tac Tyr	cgc Arg	ggg Gly	atc Ile 125	gag Glu	385
ccg Pro	act Thr	ttg Leu	cca Pro	aac Asn 130	tgg Trp	ttc Phe	gcg Ala	gtc Val 135	aca Thr	aag Lys	acc Thr	aga Arg	aat Asn	ggc Gly 140	gcc Ala	433
gga Gly	ggc Gly	ggg Gly	aac Asn 145	aag Lys	gtg Val	gtg Val	gat Asp	gag Glu 150	tgc Cys	tac Tyr	atc Ile	ccc Pro	aat Asn 155	tac Tyr	ttg Leu	481
ctc Leu	ccc Pro	aaa Lys 160	acc Thr	cag Gln	cct Pro	gag Glu	ctc Leu 165	cag Gln	tgg Trp	gcg Ala	tgg Trp	act Thr 170	aat Asn	atg Met	gaa Glu	529
cag Gln	tat Tyr 175	tta Leu	agc Ser	gcc Ala	tgt Cys	ttg Leu 180	aat Asn	ctc Leu	acg Thr	gag Glu	cgt Arg 185	aaa Lys	cgg Arg	ttg Leu	gtg Val	577
gcg Ala 190	cag Gln	cat His	ctg Leu	acg Thr	cac His 195	gtg Val	tcg Ser	cag Gln	acg Thr	cag Gln 200	gag Glu	cag Gln	aac Asn	aaa Lys	gag Glu 205	625
aat Asn	cag Gln	aat Asn	ccc Pro	aat Asn 210	tct Ser	gat Asp	gcg Ala	ccg Pro	gtg Val 215	atc Ile	aga Arg	tca Ser	aaa Lys	act Thr 220	tca Ser	673
gcc Ala	agg Arg	tac Tyr	atg Met 225	gag Glu	ctg Leu	gtc Val	ggg Gly	tgg Trp 230	ctc Leu	gtg Val	gac Asp	aag Lys	ggg Gly 235	att Ile	acc Thr	721
tcg Ser	gag Glu	aag Lys 240	cag Gln	tgg Trp	atc Ile	cag Gln	gag Glu 245	gac Asp	cag Gln	gcc Ala	tca Ser	tac Tyr 250	atc Ile	tcc Ser	ttc Phe	769
aat Asn 255	gcg Ala	gcc Ala	tcc Ser	aac Asn	tcg Ser	cgg Arg 260	tcc Ser	caa Gln	atc Ile	aag Lys	gct Ala 265	gcc Ala	ttg Leu	gac Asp	aat Asn	817
gcg Ala 270	gga Gly	aag Lys	att Ile	atg Met	agc Ser 275	ctg Leu	act Thr	aaa Lys	acc Thr	gcc Ala 280	ccc Pro	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu	gtg Val 285	865
ggc Gly	cag Gln	cag Gln	ccc Pro	gtg Val 290	gag Glu	gac Asp	att Ile	tcc Ser 295	agc Ser	aat Asn	cgg Arg	att Ile	tat Tyr	aaa Lys 300	att Ile	913
ttg Leu	gaa Glu	cta Leu	aac Asn 305	ggg Gly	tac Tyr	gat Asp	ccc Pro	caa Gln 310	tat Tyr	gcg Ala	gct Ala	tcc Ser	gtc Val 315	ttt Phe	ctg Leu	961
gga Gly	tgg Trp	gcc Ala 320	acg Thr	aaa Lys	aag Lys	ttc Phe	ggc Gly 325	aag Lys	agg Arg	aac Asn	acc Thr	atc Ile 330	tgg Trp	ctg Leu	ttt Phe	1009
ggg Gly 335	cct Pro	gca Ala	act Thr	acc Thr	ggg Gly	aag Lys 340	acc Thr	aac Asn	atc Ile	gcg Ala 345	gag Glu	gcc Ala	ata Ile	gcc Ala	cac His	1057
act Thr 350	gtg Val	ccc Pro	ttc Phe	tac Tyr	ggg Gly 355	tgc Cys	gta Val	aac Asn	tgg Trp	acc Thr 360	aat Asn	gag Glu	aac Asn	ttt Phe	ccc Pro 365	1105
ttc Phe	aac Asn	gac Asp	tgt Cys	gtc Val 370	gac Asp	aag Lys	atg Met	gtg Val	atc Ile 375	tgg Trp	tgg Trp	gag Glu	gag Glu	ggg Gly 380	aag Lys	1153

ES 2 426 091 T3

atg acc gcc aag gtc gtg gag tcg gcc aaa gcc att ctc gga gga agc	1201
Met Thr Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser	
385	
aag gtg cgc gtg gac cag aaa tgc aag tcc tcg gcc cag ata gac ccg	1249
Lys Val Arg Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro	
400	
405	
410	
act ccc gtg atc gtc acc tcc aac acc aac atg tgc gcc gtg att gac	1297
Thr Pro Val Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp	
415	
420	
425	
ggg aac tca acg acc ttc gaa cac cag cag ccg ttg caa gac cgg atg	1345
Gly Asn Ser Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met	
430	
435	
440	
445	
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 tcg 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 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> 3

5 <211> 621

<212> PRT

<213> virus adeno-asociado 2

10

<400> 3

ES 2 426 091 T3

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp
 1 5 10 15
 Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu
 20 25 30
 Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile
 35 40 45
 Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu
 50 55 60
 Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val
 65 70 75 80
 Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu
 85 90 95
 Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile
 100 105 110
 Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu
 115 120 125
 Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly
 130 135 140
 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

ES 2 426 091 T3

Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln
 275 280 285
 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
 Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys

ES 2 426 091 T3

545		550		555		560
Phe Thr His Gly Gln	Lys Asp Cys Leu Glu	Cys Phe Pro Val Ser Glu				
	565		570			575
Ser Gln Pro Val	Ser Val Val Lys Lys	Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr				
	580	585	590			
Ile His His Ile Met Gly Lys Val	Pro Asp Ala Cys Thr	Ala Cys Asp				
	595	600	605			
Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln						
610	615	620				

REIVINDICACIONES

1.- Método para la producción de un producto de gen de interés, comprendiendo el método las etapas de:

5 a) proporcionar una célula de insecto que comprende:

i) una primera casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el producto de gen de interés que está operativamente enlazado a un promotor capacitado para activar expresión del producto de gen en la célula de insecto, y en el que la primera casete de expresión está flanqueada por cualquiera de los lados por secuencias de nucleótido de repetición terminal invertida (ITR) de virus adeno-asociado (AAV);

ii) al menos una segunda casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína Rep de AAV que está operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula de insecto;

b) cultivar la célula de insecto definida en a) bajo una condición que conduce a la expresión de la primera y la segunda casetes de expresión, y

c) opcionalmente, recuperar el producto de gen de interés, en el que la célula de insecto no comprende una proteína Cap parvoviral ni una secuencia de nucleótido que codifique una proteína Cap parvoviral, y en el que la primera y la segunda casetes de expresión están comprendidas en los mismos uno o dos vectores baculovirales separados.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda casete de expresión comprende una pauta de lectura abierta que comprende secuencias de nucleótido que codifican al menos una de las proteínas Rep78 y Rep68.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la primera y la segunda casetes de expresión están presentes en una sola construcción, y en el que la construcción está flanqueada por al menos una secuencia de ITR de AAV.

4.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de gen es un polipéptido o un ácido nucleico.

5.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera casete de expresión no está integrada en el genoma de la célula.

6.- Una célula de insecto que comprende:

i) una primera casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica un producto de gen de interés que está operativamente enlazado a un promotor capacitado para activar expresión del producto de gen en la célula de insecto, y en el que la primera casete de expresión está flanqueada por cualquiera de los lados por secuencias de nucleótido de ITR de AAV;

ii) al menos una segunda casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica al menos una proteína Rep de AAV que está operativamente enlazada a un promotor capacitado para activar expresión de las proteínas Rep en la célula de insecto,

en el que la célula no comprende una proteína Cap parvoviral ni una secuencia de nucleótido que codifique una proteína Cap parvoviral, en el que la primera y la segunda casetes de expresión están comprendidas en los mismos uno o dos vectores baculovirales separados, y en el que la célula no expresa al menos una de entre una proteína Rep 52 y una proteína Rep 40 parvovirales.

7.- Una célula de insecto de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la segunda casete de expresión comprende una pauta de lectura abierta que comprende secuencias de nucleótido que codifican al menos una de las proteínas Rep78 y Rep68.

8.- Una célula de insecto de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la primera y la segunda casetes de expresión están presentes en una construcción única, y en la que la construcción está flanqueada por al menos una secuencia de ITR de AAV.

9.- Una célula de insecto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 – 8, en la que el producto de gen es un polipéptido o un ácido nucleico.

10.- Una célula de insecto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 – 9, en la que la primera casete de expresión no está integrada en el genoma de la célula.

Fig 1

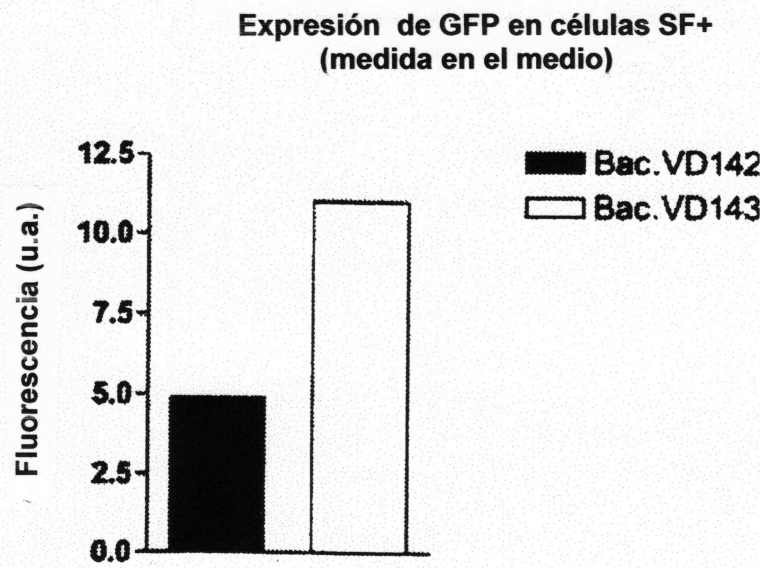


Fig 2

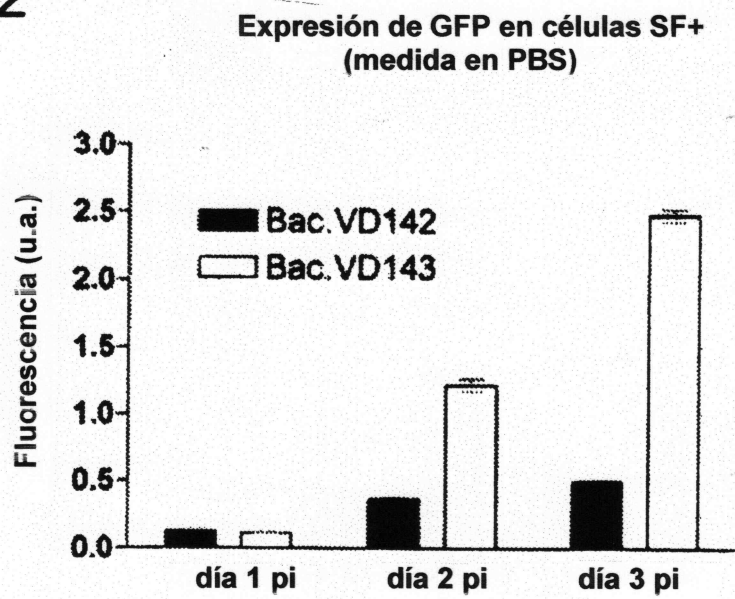


Fig 3

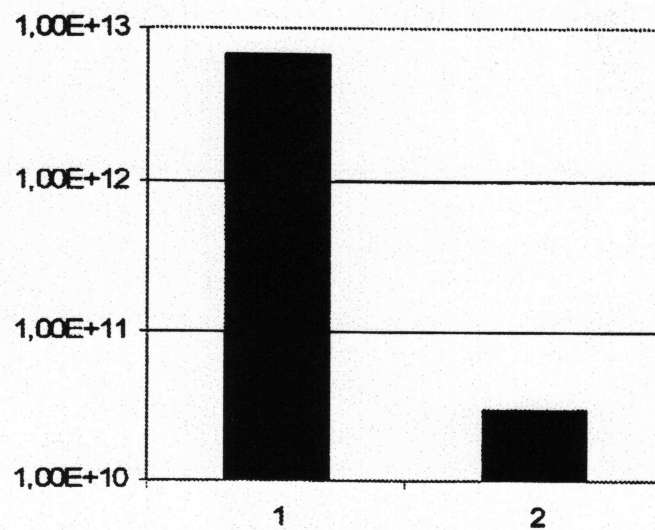


Fig 4

