

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 561**

21 Número de solicitud: 201430914

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.06.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.12.2015

Fecha de la concesión:

23.09.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (79.0%)
Avenida Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES y
ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.
(ALGENEX) (21.0%)**

72 Inventor/es:

**HERRERO SENDRA, Salvador;
JAKUBOWSKA, Agata Karolina;
MARTÍNEZ SOLÍS, María;
MARTÍNEZ ESCRIBANO, José Ángel;
GÓMEZ SEBASTIÁN, Silvia y
LÓPEZ VIDAL, Javier**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Nuevos promotores derivados de baculovirus con elevada actividad en sistemas de expresión basados en baculovirus**

57 Resumen:

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología y comprende secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo promotores capaces de incrementar la calidad y eficacia de la producción de proteínas recombinantes. Específicamente, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende:

- a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 ó su secuencia complementaria; o
- b. una variante de cualquiera de las secuencias del apartado a) que posee al menos un 70% de identidad con dicha secuencia.

ES 2 554 561 B1

DESCRIPCIÓN

Nuevos promotores derivados de baculovirus con elevada actividad en sistemas de expresión basados en baculovirus**Sector de la técnica**

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología y comprende secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo promotores capaces de incrementar la calidad y eficacia de la producción de proteínas recombinantes.

Antecedentes de la invención

El sistema de expresión basado en baculovirus es un método de producción de proteínas recombinantes que posee una elevada capacidad de expresión. Las proteínas recombinantes producidas pueden usarse por ejemplo como vacunas, moléculas terapéuticas o agentes diagnósticos. Los baculovirus son un tipo de virus que infectan artrópodos, especialmente insectos. Recientemente, basándose en la secuencia de ciertos genes conservados en todos los baculovirus, se ha propuesto una nueva división en cuanto a los géneros que componen la familia *Baculoviridae*. A diferencia de la clasificación anterior que se basaba en características morfológicas y con la cual no existía ninguna correlación entre el grupo de virus y el tipo de huésped donde se encontraban, en esta nueva clasificación existe una clara distinción en relación al orden al que pertenece el insecto huésped. Con la nueva clasificación la familia *Baculoviridae* constaría de 4 géneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granuloviruses específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovirus específicos de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovirus específicos de dípteros) (Jehle J.A., Lange M., Wang H., Hu Z., Wang Y. & Hauschild R. (2006), Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* 346, 180-193). El vector basado en baculovirus más empleado en la industria para la expresión de proteínas recombinantes procede del baculovirus *Nucleopoliedrovirus multicápside* de *Autographa californica* (AcMNPV). Las células de insecto de *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) o 21 (Sf21) son dos ejemplos de líneas celulares susceptibles de ser infectadas con baculovirus recombinantes ampliamente utilizadas (Nettleship, J. E. *et al*, *J. Struct. Biol.* 2010, 172, 55-56), y las larvas de insecto de *Trichoplusia ni* (*T. ni*) se emplean como biofactorías para la producción de proteínas recombinantes (Gomez-Casado, E. *et al.*, *Protein Exp. Purif.* 2011, 79, 35-43). Desde que el sistema de expresión basado en baculovirus se desarrolló en los años 80 (Smith, G. E. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 1983, 65(3),

2156-2165), cientos de proteínas recombinantes se han producido empleando este sistema, desde enzimas citosólicas hasta proteínas de membrana.

La síntesis de proteínas en un sistema de baculovirus posee numerosas ventajas frente a la síntesis en otros microorganismos tales como *E.coli*. Tras la producción y purificación, la proteína recombinante expresada por el sistema de baculovirus posee modificaciones post traduccionales tales como formación de enlaces disulfuro, glicosilaciones, miristilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, etc. Estos factores constituyen claramente un adelanto y una mejora en procedimientos para la obtención de proteínas recombinantes respecto a procedimientos anteriores.

Más recientemente se han desarrollado vectores de baculovirus con promotores y amplificadores que permiten la expresión de genes en células de eucariotas superiores, tales como hepatocitos humanos o células CHO (cáncer de ovario de hamster).

Los siguientes artículos científicos pueden resumir el estado de la técnica con respecto a estos sistemas de expresión de proteínas recombinantes:

1: Fernandes F, Teixeira AP, Carinhas N, Carrondo MJ, Alves PM. Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Feb;12(2):225-36.

2: Cox MM. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*. 2012 Feb 27;30(10):1759-66. 3: Hitchman RB, Locanto E, Possee RD, King LA. Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods*. 2011 Sep;55(1):52-7. 4: van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*. 2011 Jul;107 Suppl:S3-15.

Existen numerosas tecnologías disponibles comercialmente para la expresión de proteínas recombinantes empleando el sistema de expresión basado en baculovirus. A modo de ejemplo se citan a continuación algunas de ellas: “Bac-to-Bac[®]” (Invitrogen[™]), “BacPAK[™]” (Clontech[™]), “FlashBAC[™]” (Oxford Expression Technologies[™]), “BacuVance[™]” (GenScript[™]), “Bac-N-Blue DNA[™]” (Invitrogen[™]), “BaculoDirect[™]” (Invitrogen[™]), “BacVector[®]” 1000, 2000, 3000 (Novagen[®]), “DiamondBac[™]” (Sigma-Aldrich[®]), “BaculoGold[™]” (BD Biosciences[™]) o “MultiBack” (ETH Zurich/Redbiotec AG).

La mayoría de los sistemas de expresión basados en baculovirus emplean el promotor *polh* para la expresión de proteínas recombinantes. El gen *polh* no es un gen esencial para la

replicación del virus en células de insecto, por lo que puede ser retirado del genoma sin afectar la producción de virus. En su lugar, se expresa la proteína de interés.

5 Existe una necesidad imperiosa de desarrollar nuevos promotores que permitan una producción más eficaz de proteínas recombinantes en sistemas de expresión basados en baculovirus.

Breve descripción de la invención

La presente invención está basada en las excelentes propiedades de los promotores que a continuación se describen.

10 En particular, los inventores descubrieron que la secuencia de ácido nucleico que comprende:

- a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o
- b. una variante de cualquiera de las secuencias del apartado a) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias

15 es adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus. Por lo tanto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria, adecuada para funcionar como un promotor en un sistema de expresión basado en baculovirus.

20 La presente invención se refiere a la secuencia de ácido nucleico mencionada anteriormente, donde dicha secuencia comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de la lista que consiste en:

- a. la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 19, SEQ ID NO.: 20, SEQ ID NO.: 22, SEQ ID NO.: 23, SEQ ID NO.: 24, SEQ ID NO.: 25, SEQ ID NO.: 27, SEQ ID NO.: 28, SEQ ID NO.: 29, o SEQ ID NO.: 30, SEQ ID NO.: 44 o sus secuencias complementarias; o

- b. una variante de cualquiera de las secuencias del apartado a) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

5 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 2 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

10 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 4 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

15 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 5 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 6 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

20 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 18 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

25 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 23 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

30 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 28 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 29 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

- 5 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 30 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

- 10 La presente invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico según lo descrito anteriormente, donde dicha secuencia es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 44 o una variante de la misma que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia.

- 15 Además, dicho promotor puede formar parte de un casete de expresión. Por lo tanto, la presente invención proporciona además un casete de expresión que comprende, al menos, una secuencia de ácido nucleico tal y como se define anteriormente operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína.

- 20 En ocasiones el casete de expresión comprende adicionalmente una (o varias) región(es) de recombinación homóloga (*hr*), como amplificadores (enhancers), operativamente unida(s) al promotor que controla la expresión de la proteína.

La presente invención también se refiere a vectores de clonación, de transferencia y/o bácmidos recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico o casetes de expresión descritos anteriormente.

- 25 Además es objeto de la presente invención un baculovirus que comprende una una secuencia de ácido nucleico o un casete de expresión según lo descrito anteriormente.

También se hace referencia en la presente invención a una célula, un insecto o una larva de insecto que comprende un baculovirus según lo descrito anteriormente, y/o una célula, un insecto o larva de insecto que comprende una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión y/o un vector según cualquiera de los mencionados anteriormente.

- 30 Las células pueden ser eucariotas o procariotas.

Los inventores describen además un medio de cultivo que comprende una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un bÁcrido, un baculovirus recombinante, una cÉlula, un insecto o una larva de insecto segÚn lo mencionado anteriormente.

5 Es objeto de la presente invenci3n un mÉtodo para producir una proteÍna que comprende los pasos de:

a. infectar cÉlulas de insecto con un baculovirus segÚn descrito anteriormente, o transfectarlas o transducirlas con el bÁcrido o con el vector de clonaci3n o de transferencia, o con un casete de expresi3n mencionados anteriormente;

10 b. expresar la proteÍna;

c. obtener dicha proteÍna.

La presente invenci3n proporciona tambiÉn un mÉtodo para producir una proteÍna que comprende los pasos de:

15 a. infectar insectos o larvas de insecto con baculovirus segÚn lo descrito anteriormente; o transfectarlas o transducirlas con el bÁcrido o con el vector de clonaci3n o de transferencia, o con un casete de expresi3n mencionados anteriormente;

b. expresar la proteÍna;

c. obtener dicha proteÍna.

20 La presente invenci3n tambiÉn se refiere a una proteÍna recombinante obtenible mediante cualquiera de los mÉtodos mencionados anteriormente.

En un aspecto adicional, la invenci3n se refiere al uso de la proteÍna descrita anteriormente en terapia o diagn3stico.

25 La invenci3n tambiÉn describe el uso de una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresi3n, un vector de clonaci3n, un vector de transferencia, un bÁcrido, un baculovirus recombinante, una cÉlula, un insecto o una larva de insecto segÚn lo descrito anteriormente en un mÉtodo para la producci3n de una proteÍna.

Breve descripci3n de las figuras

Figura 1. Producción de GFP (de sus siglas en inglés, “*green fluorescent protein*”, proteína verde fluorescente) en tres líneas celulares de insecto (**Sf21** (J.L. Vaughn, R.H. Goodwin, G.J. Tompkins, P. McCawley. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13 (1977), pp. 213–217), **Se301** (K. Hara, M. Funakoshi, K. Tsuda, T. Kawarabata. New *Spodoptera exigua* cell lines susceptible to *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 29A (1993), pp. 904–907) y **Hi5** (Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood HA (1992). "Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system". *Biotechnol Prog.* 8 (5): 391–396.)) del promotor inicial (pSeL, L = largo, SEQ ID NO.: 2), su versión truncada en 3' (pSeS, S = corto, SEQ ID NO.:3). Se empleó el promotor de polihedrina (pph, SEQ ID NO.: 11) como “*gold standard*” (modelo de referencia estándar).

Figura 2. Producción de GFP (de sus siglas en inglés, “*green fluorescent protein*”, proteína verde fluorescente) en tres líneas celulares de insecto (**Sf21** (A), **Se301** (B) y **Hi5** (C)). Deleciones en serie de la región 5' del promotor pSeL (pSeL-140, SEQ ID NO.: 4 y pSeL-120, SEQ ID NO.: 5) pueden aumentar la producción de proteínas en diferentes tipos de células (**Sf21** (A), **Se301** (B) y **Hi5** (C)). Se empleó el promotor de polihedrina (pph, SEQ ID NO.: 11) como “*gold standard*” (modelo de referencia estándar).

Figura 3. Representación esquemática de las diferentes variantes de algunos de los promotores mencionados en la presente descripción (pSeL, SEQ ID NO.: 2, pSeL-140, SEQ ID NO.: 4, pSeL-120, SEQ ID NO.:5, pSeS, SEQ ID NO.: 3 y pph, SEQ ID NO.:11).

Figura 4. Producción de GFP (de sus siglas en inglés, “*green fluorescent protein*”, proteína verde fluorescente) en tres líneas celulares de insecto (**Sf21**, **Se301** y **Hi5**). La combinación de los promotores (pph/pSeL-120 en la figura, SEQ ID NO.: 18) aumenta considerablemente los niveles de producción de proteína en estas células de insecto, en comparación con el promotor pSeL (SEQ ID NO.:2), pSeL-120 (SEQ ID NO.:5) y promotor de polihedrina (pph, SEQ ID NO.: 11).

Figura 5. Producción de GFP (de sus siglas en inglés, “*green fluorescent protein*”, proteína verde fluorescente) en larvas de *T. ni*. pSeL, (SEQ ID NO.: 2) y pSeL-120, (SEQ ID NO.: 5). Se empleó el promotor de polihedrina (pph, SEQ ID NO.: 11) como “*gold standard*” (modelo de referencia estándar).

Figura 6. Representación de la posición del promotor pSeL-120 en una alineación de su secuencia con las secuencias homólogas en diferentes especies de baculovirus (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeMNPV), *Spodoptera litoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV), *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SpfrMNPV), *Agrotis ipsilon* nucleopolyhedrovirus (AgipMNPV), *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus (AgseMNPV), *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), and *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)) (panel superior). El panel inferior muestra la identidad de secuencias entre los diferentes virus de la región representada en la alineación (promotor pSeL-120, SEQ ID NO.:5).

Figura 7. Secuencias pSeL (SEQ ID NO.:2) y pSeS (SEQ ID NO.: 3) y su alineamiento, siendo la diferencia entre ambos la SEQ ID NO.:1 (“secuencia diferencial”).

Descripción detallada de la invención

Promotor

La presente invención describe el uso de nuevos promotores de baculovirus para la expresión de proteínas heterólogas en células de insecto o en insectos (incluyendo larvas de insecto) empleando el sistema de expresión basado en baculovirus. La secuencia de ácido nucleico del promotor deriva preferiblemente del genoma del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV). La secuencia de ácido nucleico del promotor puede también derivar del genoma de otros virus tales como *Spodoptera litoralis* nucleopoliedrovirus (SpliMNPV), *Spodoptera frugiperda* nucleopoliedrovirus (SpfrMNPV), *Agrotis ipsilon* nucleopoliedrovirus (AgipMNPV), *Agrotis segetum* nucleopoliedrovirus (AgseMNPV), *Bombyx mori* nucleopoliedrovirus (BmNPV), y *Autographa californica* nucleopoliedrovirus (AcMNPV). En particular, la secuencia de ácido nucleico del promotor (o promotores) que deriva(n) del genoma del nucleopolyhedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), se encuentra en en la región 5’ de la *orf46*, controlando la expresión de dicho gen. En el transcriptoma de *Spodoptera exigua* infectado con SeMNPV hay una elevada presencia de transcritos correspondientes al gen *orf46*. Además, la proteína ORF46 es una proteína estructural. Los nuevos promotores presentan una actividad fuerte en el sistema de expresión basado en baculovirus, alcanzándose niveles de expresión superiores a los alcanzados bajo otros promotores de uso convencional como el promotor de polihedrina, *polh* o *pph*. El reducido tamaño de su secuencia promotora hace posible su utilización conjunta con otros promotores.

En un aspecto, la invención se relaciona con una secuencia de ácido nucleico, en adelante secuencia de ácido nucleico de la invención, adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende:

- a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o
- 5 b. una variante de cualquiera de las secuencia del apartado a) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

Ejemplos de promotores de baculovirus de la invención, que comprenden

- a) la SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria;
- 10 b) o una variante de cualquiera de las secuencia del apartado a) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias

son la SEQ ID NO.: 2, la SEQ ID NO.: 4, la SEQ ID NO.: 5, la SEQ ID NO.: 6, la SEQ ID NO.: 7, la SEQ ID NO.: 8, la SEQ ID NO.: 10, la SEQ ID NO.: 12, la SEQ ID NO.: 13, la SEQ ID NO.: 14, la SEQ ID NO.: 15, la SEQ ID NO.: 17, la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20, la SEQ ID NO.: 22, la SEQ ID NO.: 23, la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25, la SEQ ID NO.: 27, la SEQ ID NO.: 28, la SEQ ID NO.: 29, la SEQ ID NO.: 30, la SEQ ID NO.: 44, o sus secuencias complementarias, o sus secuencias complementarias, o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores (SEQ ID NOs.: 2, SEQ ID NOs.: 4-8, 15 20 SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30 y SEQ ID NO.: 44) que poseen al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

En una realización del primer aspecto de la invención, la invención comprende una secuencia de ácido nucleico, en adelante secuencia de ácido nucleico de la invención, adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende:

- a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias; y

- b. la secuencia SEQ ID NO.: 11, o su secuencia complementaria, o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 11, o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

5 Ejemplos de promotores de baculovirus de la invención, que comprenden

- a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias; y

- 10 b. la secuencia SEQ ID NO.: 11, o su secuencia complementaria, o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 11, o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias

son la SEQ ID NO.: 6, la SEQ ID NO.: 7, la SEQ ID NO.: 8, la SEQ ID NO.: 10, la SEQ ID
15 NO.: 14, la SEQ ID NO.: 15, la SEQ ID NO.: 17, la SEQ ID NO.: 18 y la SEQ ID NO.: 44.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la invención comprende una secuencia de ácido nucleico, en adelante secuencia de ácido nucleico de la invención, adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende:

- 20 a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias; y

- 25 b. la secuencia SEQ ID NO.: 31, o su secuencia complementaria, o una variante de las mismas (SEQ ID NO.: 31, o su secuencia complementaria) que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

Ejemplos de promotores de baculovirus de la invención, que comprenden estas secuencias (a y b) son la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20, la SEQ ID NO.: 22, la SEQ ID NO.: 23, la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25, la SEQ ID NO.: 27 y la SEQ ID NO.: 28.

En el contexto de la presente invención, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico a la que la ARN polimerasa puede unirse para iniciar la transcripción. Esta secuencia de ácido nucleico puede además comprender sitios de unión para varias proteínas que regulan la transcripción, como por ejemplo factores de transcripción.

5 Los términos "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polidesoxirribonucleótido o polirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

10 Se dice que las moléculas o secuencias de ácido nucleico son "complementarias" si se pueden hibridar una con la otra con suficiente estabilidad para permitirles permanecer alineadas una con la otra en condiciones convencionales de "alta restrictividad". Las condiciones de restrictividad convencionales se describen por ejemplo por Sambrock y col., 1989 (Molecular cloning. Vol. 2. New York: Cold spring harbor laboratory press), y por
15 Hames y col., en: Nucleic Acid Hybridation, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985).

En el contexto de la presente invención, la comparación de identidad entre secuencias se puede obtener usando el algoritmo *ClustalW* (Larkin M.A. et al., Bioinformatics 2007, 23(21):2947-2948).

20 En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de la lista que consiste en: SEQ ID NO.: 1, SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 19, SEQ ID NO.: 20, SEQ ID NO.: 22, SEQ ID
25 NO.: 23, SEQ ID NO.: 24, SEQ ID NO.: 25, SEQ ID NO.: 27, SEQ ID NO.: 28, SEQ ID NO.: 29, SEQ ID NO.: 30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico de la invención consiste en la SEQ ID
30 NO.: 1, o en la SEQ ID NO.: 2, o en la SEQ ID NO.: 4, o en la SEQ ID NO.: 5, o en la SEQ ID NO.: 6, o en la SEQ ID NO.: 7, o en la SEQ ID NO.: 8, o en la SEQ ID NO.: 10, o en la SEQ ID NO.: 12, o en la SEQ ID NO.: 13, o en la SEQ ID NO.: 14, o en la SEQ ID NO.: 15, o

5 en la SEQ ID NO.: 17, o en la SEQ ID NO.: 18, o en la SEQ ID NO.: 19, o en la SEQ ID NO.: 20, o en la SEQ ID NO.: 22, o en la SEQ ID NO.: 23, o en la SEQ ID NO.: 24, o en la SEQ ID NO.: 25, o en la SEQ ID NO.: 27, o en la SEQ ID NO.: 28, o en la SEQ ID NO.: 29, o en la SEQ ID NO.: 30, en la SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

10 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico según la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 2 o una variante de la SEQ ID NO.: 2 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico según la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 5 o una variante de la SEQ ID NO.: 5 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

15 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 6 o una variante de la SEQ ID NO.: 6 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

20 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 18 o una variante de la SEQ ID NO.: 18 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

25 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 23 o una variante de la SEQ ID NO.: 23 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

30 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 28 o una variante de la SEQ ID NO.: 28 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 29 o una variante de la SEQ ID NO.: 29 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 5 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 30 o una variante de la SEQ ID NO.: 30 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 10 Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO.: 44 o una variante de la SEQ ID NO.: 45 que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 15 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 2, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 20 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 5, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 6, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 25 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 18, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

- 30 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 23, o una variante de la misma que que posee al menos un

70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

5 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 28, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

10 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 29, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 30, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

15 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO.: 44, o una variante de la misma que que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dicha secuencia, o la secuencia complementaria de alguna de ellas.

20 En el contexto de la presente invención, el término “ADN recombinante” se refiere a una forma de ADN artificial que ha sido diseñado combinando o insertando una o más hebras de ADN, de tal manera que ADN que normalmente no aparecería combinado, lo hace.

25 En general, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden derivar del genoma del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera litoralis* (SpliMNPV), o del genoma del nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SpfrMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus *Agrotis segetum* de (AgseMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV).

30 Preferiblemente, las secuencias de ácido nucleico de la invención derivan del genoma del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV).

En una realización particular de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico incluye 301 nucleótidos aguas arriba (upstream) del codón de inicio del marco abierto de lectura (ORF) correspondiente al gen: "ORF46calyx / polyhedron envelope protein" o „polyhedron envelope protein calyx/pep" (Genbank acc n AF169823.1). del genoma del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera littoralis* (SpliMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SpfrMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Agrotis segetum* (AgseMNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV), o del genoma del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV).

Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico incluye 301 nucleótidos aguas arriba (upstream) del codón de inicio del marco abierto de lectura *orf46* del genoma del nucleopolyhedrovirus múltiple *Spodoptera exigua* (SeMNPV).

Casete de expresión

Las secuencias de ácido nucleico de la invención, como por ejemplo las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30 y SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias, pueden estar operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, constituyendo de este modo un casete de expresión.

Tal y como se utiliza en esta descripción, el término "operativamente unida" significa que la proteína o proteínas es (son) expresada(s) en el marco de lectura correcto bajo el control del promotor y las secuencias de control o reguladoras de expresión.

Por lo tanto, la invención proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la presente invención, operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína.

Además, opcionalmente, el casete de expresión puede incorporar otras secuencias de control o secuencias reguladoras de la expresión. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de la proteína de interés. Además de promotores, incluyen secuencias que codifican reguladores transcripcionales,

secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. Dichas secuencias de control de expresión pueden ser funcionales en células y organismos procariontes y/o en células y organismos eucariotes.

5 Por lo tanto, el casete de expresión de la presente invención puede comprender adicionalmente una región de recombinación homóloga (*hr*), como amplificadores (enhancers), unida al promotor que controla la expresión de la proteína.

Las regiones de recombinación homóloga (*hr*) en baculovirus, como por ejemplo en AcMNPV, se componen de unidades de unas 70 pb repetidas en tándem, cuya región central alberga un semipalíndromo de 28 pb caracterizado por contener una diana *EcoRI*. Se
10 han identificado 8 regiones que contienen de 2 a 8 repeticiones de esta unidad. Su principal función es la de actuar como origen de replicación del DNA vírico, la estabilización del genoma del virus y la intensificación de la transcripción.

Por ejemplo, estas regiones de recombinación homóloga se repiten en ocho localizaciones en el genoma de AcMNPV, con de 2 a 8 repeticiones en cada uno de los lados.

15 Un amplificador o región amplificadora (enhancer) en el contexto de la presente invención se entiende como una secuencia de control a la cual se unen elementos reguladores de la transcripción, aumentando así el nivel de transcripción de los genes asociados.

Ventajosamente, dicho casete de expresión puede además comprender un marcador o gen que codifica para un motivo o fenotipo que permite la selección de la célula hospedadora
20 transformada con dicho casete de expresión. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que podrían estar presentes en el casete de expresión de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a compuestos tóxicos y, en general, todos aquellos que permitan seleccionar las células transformadas genéticamente.

Preferentemente, la proteína codificada en el casete de expresión de la invención se
25 selecciona entre las siguientes: vacuna proteica, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citoquina, factor de coagulación, anticoagulante, receptor, hormona, proteína con valor diagnóstico o proteínas de partículas similares a virus (VLP).

El casete de expresión puede además comprender, si así se desea, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o
30 purificación del producto de interés. Por lo tanto, el casete de expresión de la presente invención comprende, si se desea, una secuencia de ácido nucleico que comprende la

secuencia de nucleótidos que codifica un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación. Dicha secuencia de ácido nucleico puede estar situada en cualquier posición siempre que no altere la funcionalidad del producto de interés.

5 Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión podría ser empleado. Por ejemplo, secuencias de polihistidina, secuencias peptídicas susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos que puedan servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de immunoafinidad, péptidos etiqueta, etc. Una o más secuencias de este tipo pueden ser incluidas, opcionalmente, en el casete de expresión de la presente invención.

10 Si se desea, el casete de expresión puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos con el fin de liberar el producto de interés una vez aislada la proteína de fusión. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida por medios enzimáticos o químicos puede ser
15 empleada, como por ejemplo, sitios de reconocimiento de proteasas (enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa, Factor de coagulación Xa, etc) o sitios susceptibles de ser específicamente escindidos por reactivos químicos (bromuro de cianógeno, etc.).

Vectores

20 La secuencia de ácido nucleico de la invención o el casete de expresión de la invención pueden ser insertados en un vector apropiado. Por tanto la presente invención se relaciona con un vector recombinante, tal y como un vector de clonación, vector de transferencia y/o báculo recombinante que comprende las secuencias de ácido nucleico o el casete de expresión de la invención.

25 Un "vector de clonación" se refiere a cualquier vector adecuado para clonar, lo que generalmente supone la presencia de sitios de restricción, un origen de replicación para su propagación en bacterias y un marcador de selección.

En la presente invención, el vector de clonación comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, el vector de clonación comprende al menos una secuencia de
30 las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30 y SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias

anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el vector de clonación de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44. Además, la presente invención proporciona un vector que comprende el casete de expresión de la presente invención y puede ser empleado preferentemente para producir el bákmido, el baculovirus recombinante, la célula, el insecto (o larva) o el medio de cultivo de la invención.

El vector de clonación que comprende un casete de expresión se denomina también “vector donador”. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el vector donador de la

presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el vector donador de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44.

5 En el contexto de la presente invención, “vector de transferencia” hace referencia a un vector donador adecuado para su integración o transposición en el genoma de baculovirus. El vector de transferencia permite generalmente la inserción de material genético en el genoma de un baculovirus.

10 Preferentemente, el vector de transferencia de la presente invención comprende alguna de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención, y/o alguno de los casetes de expresión de la presente invención así como elementos que permitan su integración o transposición en el genoma de baculovirus. La obtención de dicho vector puede hacerse por métodos convencionales conocidos por técnicos en la materia [por ejemplo, Sambrock *et al.*, 1989, Molecular cloning. Vol. 2. New York: Cold spring harbor laboratory press]. Por ejemplo, la obtención de dicho vector puede hacerse mediante el método convencional 15 conocido como “Sistema Gateway” (Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Res. 2000 Nov;10(11):1788-95). El vector de transferencia puede transformar células que comprenden una o varias copias del genoma de baculovirus. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID Nos.: 1-2, SEQ ID NOs.: 20 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el vector 25 de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30 13. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el vector de transferencia de la

presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el vector de transferencia de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44.

5 El vector de transferencia de la presente invención puede derivar de alguno de los sistemas de expresión basados en baculovirus disponibles comercialmente “Bac-to-Bac[®]” (Invitrogen[™]), “BacPAK[™]” (Clontech[™]), “FlashBAC[™]” (Oxford Expression Technologies[™]), “BacuVance[™]” (GenScript[™]), “Bac-N-Blue DNA[™]” (Invitrogen[™]), “BaculoDirect[™]” (Invitrogen[™]), “BacVector[®]” 1000, 2000, 3000 (Novagen[®]), “DiamondBac[™]” (Sigma-Aldrich[®]), “BaculoGold[™]” (BD Biosciences[™]) or “MultiBack” (ETH Zurich/Redbiotec AG).

10 Los vectores de clonación, donadores o de transferencia de la presente invención pueden ser adecuados para transformar o transducir células procariontas. Además, pueden ser adecuados para transfectar o transducir células eucariotas, preferentemente células de insecto, más preferentemente células Sf21 y/o Hi5 y/o Sf9 y/o Se301. Los vectores de clonación y transferencia de la presente invención pueden ser adecuados para transfectar o
15 transducir insectos o larvas de insecto, como por ejemplo *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*, preferentemente larvas de insecto de *Trichoplusia ni*.

La presente invención también se refiere al uso de los vectores de la presente invención para transformar, transfectar o transducir células procariontas, células eucariotas, preferentemente células de insecto, más preferentemente células Sf21 y/o Hi5 y/o Sf9 y/o
20 Se301. Así mismo, la presente invención se refiere al uso de los vectores de clonación y transferencia de la presente invención para transfectar o transducir insectos o larvas de insecto, como por ejemplo *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*, preferentemente larvas de insecto de *Trichoplusia ni*.

En el contexto de la presente invención el término “transformación” se entiende como la
25 introducción de material genético externo en células procariontas mediante plásmidos, vectores virales (en ocasiones también referido como transducción) u otras herramientas para la transferencia.

En el contexto de la presente invención, el término “transducción” se entiende como el
30 proceso por el cual se introduce material genético exógeno en una célula procarionta u eucariota utilizando un virus como vector.

En el contexto de la presente invención el término “transfección” se entiende como la introducción de material genético externo en células eucariotas u organismos mediante plásmidos, vectores virales u otras herramientas para la transferencia.

Bácmido

5 En un aspecto de la invención el vector es un bácmido recombinante.

Un “bácmido” tal y como se entiende en la presente invención es un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico suficiente como para generar un baculovirus.

El bácmido recombinante de la presente invención comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención y/o el casete de expresión de acuerdo con la presente invención.

10 Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un
15 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo,
20 el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención
25 comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el bácmido de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44. El bácmido es preferentemente adecuado para producir un baculovirus recombinante, una célula, un insecto (o larva) o el medio de cultivo de la presente invención.

30 El bácmido de la presente invención puede ser adecuado para transformar o transducir células procariotas y/o transfectar o transducir células eucariotas, preferentemente células de insecto. Más preferentemente, es adecuado para transfectar células Sf21 y/o Hi5 y/o Sf9

y/o Se301, o para transfectar insectos o larvas de insecto, preferentemente larvas de insecto de *Trichoplusia ni*. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso del báculo de la presente invención para transformar, transfectar o transducir células células procariontas, células eucariotas, preferentemente células de insecto, más preferentemente células Sf21 y/o Hi5 y/o Sf9 y/o Se301. Así mismo, la presente invención se refiere al uso del báculo de la presente invención para transfectar insectos o larvas de insecto, preferentemente larvas de insecto de *Trichoplusia ni*.

Baculovirus

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con un baculovirus que comprende una secuencia de ácido nucleico o un casete de expresión según la presente invención.

Por ejemplo, el baculovirus de la invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44.

El baculovirus de la presente invención puede derivar de cualquier baculovirus. Por ejemplo, el baculovirus de la presente invención puede derivar de nucleopoliedrovirus múltiple *Spodoptera exigua* (SeMNPV), o de nucleopoliedrovirus *Spodoptera littoralis* (SpliMNPV), o de nucleopoliedrovirus *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV), o de

nucleopoliedrovirus *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV), o de nucleopoliedrovirus *Agrotis segetum* (AgseMNPV), o de nucleopoliedrovirus *Bombyx mori* (BmNPV), o de nucleopoliedrovirus *Autographa californica* (AcMNPV).

5 Preferentemente, el baculovirus de la presente invención deriva de AcMNPV, BmNPV o SeMNPV.

El baculovirus de la presente invención es adecuado para infectar células de insecto, insectos y/o larvas de insecto. Preferentemente, el baculovirus de la presente invención es adecuado infectar larvas de insecto de *Trichoplusia ni*. Por lo tanto la presente invención se refiere al uso del baculovirus de la presente invención para infectar células de insecto, insectoso larvas de insecto, preferentemente larvas de insecto de *Trichoplusia ni*.

La generación de baculovirus puede estar basada en sistemas de expresión basados en baculovirus disponibles comercialmente: “Bac-to-Bac[®]” (Invitrogen[™]), “BacPAK[™]” (Clontech[™]), “FlashBAC[™]” (Oxford Expression Technologies[™]), “BacuVance[™]” (GenScript[™]), “Bac-N-Blue DNA[™]” (Invitrogen[™]), “BaculoDirect[™]” (Invitrogen[™]), “BacVector[®]” 1000, 2000, 3000 (Novagen[®]), “DiamondBac[™]” (Sigma-Aldrich[®]), “BaculoGold[™]” (BD Biosciences[™]) or “MultiBack” (ETH Zurich/Redbiotec AG).

Células

Los vectores recombinantes proporcionados por esta invención pueden ser utilizados para transformar, transducir y/o transfectar células eucariotas o procariotas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula huésped transformada, transducida o transfectada que comprende el vector recombinante y/o la secuencia de ácido nucleico proporcionada por la invención. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o

transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, la célula transformada, transducida y/o transfectada de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44.

Se pueden obtener células transformadas, transducidas o transfectadas mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, e.g. [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*, Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 2000 Nov;10(11):1788-95].

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula huésped transformada, transducida o transfectada que comprende, al menos, una secuencia de ácido nucleico de la invención, un casete de expresión proporcionado por la presente invención o un vector recombinante de la invención.

La célula de la presente invención puede ser infectada con el baculovirus de la presente invención. En el contexto de la presente invención, el término "infección" se entiende como entrada de virus en la célula hospedadora que genera un daño estructural del hospedero.

Preferentemente, la célula de la presente invención comprende una o varias copias del genoma del baculovirus, para la obtención de báciidos recombinantes según la presente invención. En un aspecto de la presente invención, la célula transformada es *Escherichia coli*. Por ejemplo, cuando se emplea el sistema de expresión basado en baculovirus comercial Bac-to-Bac[®], la célula empleada es DH10Bac[™]. En otro aspecto, la célula transformada transducida, transfectada o infectada es una célula eucariota, preferentemente una célula de insecto, como por ejemplo Sf21, Hi5, Sf9 o Se301.

La presente invención se refiere además a una célula que comprende un baculovirus según la presente invención. En otro aspecto, la invención proporciona una célula transgénica que comprende, insertada en su genoma, al menos, una secuencia de ácido nucleico o un casete de expresión proporcionados por la presente invención. Por ejemplo, la célula

5 transgénica de la presente invención comprende, insertada en su genoma, al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un

10 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende, insertada en su genoma, la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende, insertada en su genoma, la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende, insertada en su genoma, la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente

15 invención comprende, insertada en su genoma, la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo la célula

20 transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, la célula transgénica de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44. En una realización

25 particular dicha célula transgénica es una célula eucariota, preferentemente una célula animal, preferentemente una célula de insecto.

Cuando la célula es una célula de insecto, pertenece preferentemente a una línea celular derivada de un insecto del género Lepidoptera o Diptera. Más preferentemente, se trata de una célula que deriva de alguna de las siguientes: *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda*,

30 *Ascalapha odorata*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Stigmene acrea* y *Aedes aegypti*. Aún más preferentemente, la célula se selecciona de entre el grupo de células de insecto consistente en Hi-5TM, Sf9, Sf21, BTI-Tn5B-1, Tn368, ExpresSf+[®], BTI-TnAo38, ATC-10, MimicTM Sf9, SfSWT-1, SfSWT-3, SfSWT-5, TriExTM, Se301y Schneider's *Drosophila* Line 2. Preferentemente, la célula de insecto es Hi-5TM, Sf9, Sf21 o Se301. La célula de la

35 presente invención puede crecer en cultivos en monocapa o en suspensión.

Insectos

Además, la invención también proporciona un animal transgénico, particularmente un insecto o una larva de insecto que comprende una secuencia de ácido nucleico o un casete de expresión, un vector o un báculo según la presente invención. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.: 44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el insecto o larva de insecto de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 44. Preferentemente, el insecto o larva de insecto es capaz de expresar y/o expresa la proteína recombinante de interés. Por lo tanto, la presente invención se refiere además al uso del insecto o larva de insecto de la presente invención para la producción de proteínas recombinantes.

En otra realización de la presente invención, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la secuencia de ácido nucleico, el casete de expresión, el vector de clonación, el vector de transferencia, el báculo o el baculovirus recombinante de la presente invención. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con al menos una secuencia de las secuencias representadas en SEQ ID NOs.: 1-2, SEQ ID NOs.: 4-8, SEQ ID NO.:10, SEQ ID NOs.: 12-15, SEQ ID NOs.: 17-20, SEQ ID NOs.: 22-25, SEQ ID NOs.: 27-30, SEQ ID NO.:

44, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 70%, o un 80%, o un 90%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 1. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 2. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 5. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 6. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 12. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 13. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 14. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 18. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 23. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 28. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 29. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 30. Por ejemplo, el insecto (o la larva) ha sido infectado, transfectado, transducido o transformado con la SEQ ID NO.: 44.

En una realización preferida de la presente invención, el insecto o larva de insecto comprende un baculovirus según la presente invención. El baculovirus se puede administrar al insecto, o a la larva por vía oral (*per os*) o mediante inyección tal y como se describe por ejemplo en (Hughes P.R and Wood H.A. (1996). In vivo production, stabilization and infectivity of Baculovirus preoccluded virions. Applied and Environmental Microbiology, 62: 105-108; *per os*; Perez-Filgueira DM, Gonzalez-Camacho F, Gallardo C, Resino-Talavan P, Blanco E, Gomez-Casado E, et al. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. J Clin Microbiol 2006;44(9):3114–21)).

Preferentemente, el insecto o larva de insecto es un insecto transgénico.

El insecto es preferentemente un lepidóptero y más preferentemente un insecto seleccionado de entre: *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Ascalapha odorata*, *Bombix mori*, *Rachiplusia ni* y *Stigmene acrea*. En una realización preferida, el insecto es una larva.

Medio de cultivo

Además, la presente invención proporciona un medio de cultivo que comprende una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un bÁcmido, un baculovirus recombinante, una célula o un insecto (o larva) según la presente invención.

Métodos para producir el producto de interés

Cualquiera de las secuencias de la presente invención pueden ser utilizadas para producir productos de interés. La invención también proporciona un método para expresar un gen que codifica un producto de interés en un animal no humano, preferentemente en un insecto o larva y más preferentemente en una larva de insecto. Por tanto, en otra realización particular, la invención proporciona un método para producir un producto de interés que puede ser una proteína recombinante, que comprende el uso de una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un bÁcmido, un baculovirus recombinante, una célula o un insecto (o larva de insecto) según la presente invención, y la obtención de la proteína recombinante o producto de interés. En una realización particular, la presente invención se relaciona con un método para producir una proteína que comprende los pasos de:

- a) infectar células de insecto con un baculovirus según la presente invención, o transfectarlas, transducirlas o transformarlas con el bÁcmido, o con el vector de clonación o de transferencia, o con un casete de expresión según la presente invención;
- b) expresar la proteína;
- c) obtener dicha proteína.

Además, la presente invención proporciona un método para producir una proteína que comprende los pasos de:

- a) infectar insectos o larvas de insecto con un baculovirus según la presente invención, o transfectarlas, transducirlas o transformarlas con el bÁcmido, o con el vector de clonación o de transferencia, o con un casete de expresión según la presente invención;
- b) expresar la proteína;

c) obtener dicha proteína

Los métodos descritos en la presente invención comprenden el uso de las células, insectos o larvas de insecto descritos en la presente invención.

5 La transfección, transducción o transformación de células, más preferentemente de células de insecto, puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a insectos, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc., véase, por ejemplo, Tomita, M. *et al.*, Nature Biotechnology 2003, 21:53-56 o Perez-Filgueira, M *et al.*, Virology 2007, 364:422-443.

10 Las condiciones para optimizar el cultivo de dichas células u organismos dependerán de la célula u organismo utilizado. Si se desea, los métodos para producir un producto de interés como por ejemplo una proteína recombinante proporcionados por la presente invención incluyen, además, el aislamiento y/o purificación de dicho producto de interés.

15 En general, el producto de interés obtenible por el método de la presente invención se encuentra en forma de péptido o proteína, preferentemente proteína. Por lo tanto, la presente invención proporciona además una proteína recombinante obtenible mediante los métodos de la presente invención. En una realización particular, la proteína obtenible mediante los métodos de la presente invención es una proteína recombinante para su uso en métodos de tratamiento, terapia o diagnóstico. Por lo tanto la presente invención se refiere al uso de la proteína recombinante de la invención en terapia o diagnóstico.

20 A modo de ejemplo, la proteína obtenible por los métodos de la presente invención puede ser una vacuna recombinante, una vacuna proteica, una proteína terapéutica, un anticuerpo, una enzima, una citoquina, un factor de coagulación, un anticoagulante, un receptor, una hormona, una proteína con valor diagnóstico o proteínas de partículas similares a virus (VLP).

25 La presente invención se refiere además el uso de una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un bácmido, un baculovirus recombinante, una célula, un insecto o una larva de insecto según según la presente invención para la producción de una proteína.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO.:	Nombre:
1	<i>Secuencia diferencial</i> (aaaattaaattttgctacaatata)
2	Promotor <i>pSeL</i> (atcatgtgttgaacggcgactgtttggcggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatattgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttact tgtgtccattgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaatata)
3	Promotor <i>pSeL A-D</i> o <i>pSeS</i> (atcatgtgttgaacggcgactgtttggcggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatattgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttact tgtgtccattgctgatgattattaagtcttttgca)
4	Promotor <i>pSeL-140</i> (cgaatgtacaatattgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccat tgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaatata)
5	Promotor <i>pSeL-120</i> (gttcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttg gcaaaaattaaattttgctacaatata)
6	Promotor <i>pSeL-120-pph</i> (gttcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttg gcaaaaattaaattttgctacaatataatcatggagataattaaatgataaccatctcgaaataaataagtatttta ctgtttcgtaacagttttgtaataaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcg)
7	Promotor <i>Secuencia diferencial-pph</i> (aaaattaaattttgctacaatataatcatggagataattaaatgataaccatctcgaaataaataagtatttactg ttttcgtaacagttttgtaataaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcg)
8	Promotor <i>pSeL-pph</i> (atcatgtgttgaacggcgactgtttggcggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatattgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttact tgtgtccattgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaatataatcatggagataattaaatg ataaccatctcgaaataaataagtatttactgtttcgtaacagttttgtaataaaaaaacctataaatattccggatta

	ttcataccgtcccaccatcgggcgcg)
9	Promotor <i>pSeL A-D-pph</i> (atcatgtgttgaacggcgactgttggcgggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggatthttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactt tgttgccattgctgatgattattaagtcttttgcaaatcatggagataattaaatgataaccatctcgcaataaata agtattttactgttttcgtaacagttttgtaataaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcggg cgcg)
10	Promotor <i>pSeL-140-pph</i> (cgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgttccat tgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaataatcatggagataattaaatgataaccat ctcgcaataaataagattttactgttttcgtaacagttttgtaataaaaaaacctataaatattccggattattcatacc gtcccaccatcgggcgcg)
11	Promotor <i>pph</i> (atcatggagataattaaatgataaccatctcgcaataaataagattttactgttttcgtaacagttttgtaataaaa aacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcg)
12	Promotor <i>pSeL-pSeL</i> (atcatgtgttgaacggcgactgttggcgggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggatthttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactt tgttgccattgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaataatcatgtgttgaaacggcgac tgtttggcgggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggccttttggattttgtcaaaaagaacga cgagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaattgttactggaccgaatgtacaat attgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgttgcattgctgatgattatt aagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaataata)
13	Promotor <i>pSeL-pSeL-pSeL</i> (atcatgtgttgaacggcgactgttggcgggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggatthttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactt tgttgccattgctgatgattattaagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaataatcatgtgttgaaacggcgac tgtttggcgggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggccttttggattttgtcaaaaagaacga cgagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaattgttactggaccgaatgtacaat attgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgttgcattgctgatgattatt aagtcttttgcaaaaattaaattttgctacaataataatcatgtgttgaaacggcgactgttggcgggatgcaggagc gtcgctacctcgaccgacgaaccggcggccttttggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatg

	ttgcaaattgtggaccggcacgaacacggtgaattgtactggaccgaatgtacaatattgtgaaatgttcaataatc aataaacctctctattatgctttgtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagcttttgcaaaaattaa attttgctacaatata)
14	Promotor <i>pph-Secuencia diferencial</i> (atcatggagataaataaatgataaccatctcgcaataaataagatcttactgtttcgtaacagtttgtaataaaa aaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcgaaaattaaattttgctacaatata)
15	Promotor <i>pph-pSeL</i> (atcatggagataaataaatgataaccatctcgcaataaataagatcttactgtttcgtaacagtttgtaataaaa aaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcgatcatgtgttgaaacggcgactgtttggcg gtatgcaggagcgtcgtacctcgaccgacgaaccggcgcccttttgattttgtcaaaaagaacgacgcagcg aaaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacggtgaattgtactggaccgaatgtacaatattgttga aatgttcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagctttt ggcaaaaattaaattttgctacaatata)
16	Promotor <i>pph-pSeL A-D</i> (atcatggagataaataaatgataaccatctcgcaataaataagatcttactgtttcgtaacagtttgtaataaaa aaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcgatcatgtgttgaaacggcgactgtttggcg gtatgcaggagcgtcgtacctcgaccgacgaaccggcgcccttttgattttgtcaaaaagaacgacgcagcg aaaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcacgaacacggtgaattgtactggaccgaatgtacaatattgttga aatgttcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagctttt ggca)
17	Promotor <i>pph-pSeL-140</i> (atcatggagataaataaatgataaccatctcgcaataaataagatcttactgtttcgtaacagtttgtaataaaa aaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggaatgtacaatattgtgaaatgttcaat aatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagcttttgcaaaaa ttaattttgctacaatata)
18	Promotor <i>pph-pSeL-120</i> (atcatggagataaataaatgataaccatctcgcaataaataagatcttactgtttcgtaacagtttgtaataaaa aaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggaatccaaggccactagtgcggccgctct gcagtctcgaggttcaataatcaataaacctctctattatcctttgtaaatttttattactttgtgtccattgctgatcatta ttaagcttttgcaaaaattaaattttgctacaatata)
19	Promotor <i>Secuencia diferencial-p10</i> (aaaattaaattttgctacaatataatacggaccttaattcaaccaacacaatataatagttaaataagaattatt atcaaatcattgtatattaattaaataactataactgtaaattacattttattacaatcactcgac)
20	Promotor <i>pSeL-p10</i>

	(atcatgtgttgaacggcgactgttggcggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcagcaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactt tgtgtccattgctgatgattattaagtcttttggcaaaaattaaatttttctacaataataacggacctttaattcaacc caacacaatatattatagtaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaaataactatactgtaaattacatttt attacaatcactcgac)
21	Promotor <i>pSeL A-D-p10</i> (atcatgtgttgaacggcgactgttggcggatgcaggagcgtcgctacctcgaccgacgaaccggcggcctttt ggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgccaatgttgcaaattgtggaccggcagcaacacgttgaatt gttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactt tgtgtccattgctgatgattattaagtcttttggcaatacggacctttaattcaacccaacacaatatattatagtaaata aagaattattatcaaatcattgtatattaattaaataactatactgtaaattacattttattacaatcactcgac)
22	Promotor <i>pSeL-140-p10</i> (cgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccat tgctgatgattattaagtcttttggcaaaaattaaatttttctacaataataacggacctttaattcaacccaacacaa tatattatagtaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaaataactatactgtaaattacattttattacaatc actcgac)
23	Promotor <i>pSeL-120-p10</i> (gttcaataatcaataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttg gcaaaaattaaatttttctacaataataacggacctttaattcaacccaacacaatatattatagtaaataagaatt attatcaaatcattgtatattaattaaataactatactgtaaattacattttattacaatcactcgac)
24	Promotor <i>p10-Secuencia diferencial</i> (atacggacctttaattcaacccaacacaatatattatagtaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgacaaaattaaatttttctacaataata)
25	Promotor <i>p10-pSeL</i> (atacggacctttaattcaacccaacacaatatattatagtaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgacatcatgtgttgaacggcgactgttggcggatgcagga gcgctcgctacctcgaccgacgaaccggcggccttttggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgcca gttgcaaattgtggaccggcagcaacacgttgaattgttactggaccgaatgtacaatatgttgaaatgtcaataat caataaacctctctattatgctttgtaaatttttatttactttgtgtccattgctgatgattattaagtcttttggcaaaaatta aatttttctacaataata)
26	Promotor <i>p10-pSeL A-D</i> (atacggacctttaattcaacccaacacaatatattatagtaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgacatcatgtgttgaacggcgactgttggcggatgcagga gcgctcgctacctcgaccgacgaaccggcggccttttggattttgtcaaaaagaacgacgcagcgaacgcca

	tgttgcaaattgtggaccggcacgaacacgttgaattgttactggaccgaatgtacaatattgtgaaatgttcaataat caataaacctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttggca)
27	Promotor <i>p10-pSeL-140</i> (atacggaccttaattcaaccaacacacaatatattatagttaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgaccgaatgtacaatattgtgaaatgttcaataatcaataaac ctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttggcaaaaattaaattttgct acaatata)
28	Promotor <i>p10-pSeL-120</i> (atacggaccttaattcaaccaacacacaatatattatagttaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgaccggtcaataatcaataaacctctctattatgcttggtaaattttt attactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttggcaaaaattaaattttgctacaatata)
29	Promotor <i>pSeL-120-pSeL-120</i> (gttcaataatcaataaacctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttg gcaaaaattaaattttgctacaatatagttcaataatcaataaacctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgt ccattgctgatgattattaagtctttggcaaaaattaaattttgctacaatata)
30	Promotor <i>pSeL-120-pSeL-120-pSeL-120</i> (gttcaataatcaataaacctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttg gcaaaaattaaattttgctacaatatagttcaataatcaataaacctctctattatgcttggtaaatttttattactttgtgt ccattgctgatgattattaagtctttggcaaaaattaaattttgctacaatatagttcaataatcaataaacctctctatt atgcttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatgattattaagtctttggcaaaaattaaattttgctacaatata)
31	Promotor <i>p10</i> (atacggaccttaattcaaccaacacacaatatattatagttaaataagaattattatcaaatcattgtatattaattaa atactatactgtaaattacattttattacaatcactcgac)
32	Cebador <i>pSeL^F</i> (ggatccgtatacatcatgtgttgaacggcgactg)
33	Cebador <i>pSeL^R</i> (gactagtattgttagcaaaaatttaattttgccaaga)
34	Cebador <i>pSeS^F</i> (ggatccgtatacatcatgtgttgaacggcgactg)
35	Cebador <i>pSeS^R</i> (gactagtccaaaagacttaataaatcatcagc)
36	Cebador <i>pSeL-140^F</i> (tagtataccgaatgtacaatattgtg)
37	Cebador <i>pSeL-140^R</i> (ctgggtgtagcgtcgtgaagc)
38	Cebador <i>pSeL-120^F</i> (tagtatacgttcaataatcaataaacctctc)
39	Cebador <i>pSeL-120^R</i> (ctgggtgtagcgtcgtgaagc)
40	Cebador <i>pph-pSeL^F</i> (atctcgagggtcaataatcaataaacctctctattatccttggtaaatttttattactttgtgtccattgctgatcat)
41	Cebador <i>pph-pSeL^R</i> (ctgggtgtagcgtcgtgaagc)

ES 2 554 561 B1

42	<p>Secuencia del sitio multiclonaje (PL) (GGATCCaaggccactagtgccggcctctgcagctctcgagcatgCGgtaccaagcttGAATTC)</p>
43	<p>eGFP (enhanced GFP) (atggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggccatcctggctgagctggacggcgacgtaaacg gccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgc accaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctctgaccacctgacctacggcgtgagtgcttcagccgc taccggaccacatgaagcagcagcagcttctcaagtcgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcacccat cttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgc atcgagctgaagggcatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca gccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcatggtgaactcaagatccgccacaacatc gaggacggcagcgtgagctcgcgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctg cccgacaaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaaagacccaacgagaagcgcatcacatggtc ctgctggagttcgtgaccgccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaa)</p>
44	<p>Promotor <i>p_{ph}-pSeL-120</i> teórico (atcatggagataattaaatgataaccatctcgaaataaataagttttactgttttcgtaacagttttgtaataaaa aaacctataaatattccgattattcataccgtcccaccatcgggcgcggttcaataatcaataaacctctctattatgc tttgtaaatttttatttactttgtgtccattgctgatgatttattaagcttttggcaaaaattaaattttgctacaatata)</p>

^F = forward

^R = reverse

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Clonación de GFP bajo los distintos promotores

En el vector pFB-PL-GFP (pph-GFP), el gen que codifica para la proteína GFP (SEQ ID NO.: 43) fue clonado bajo el control del promotor de poliedrina (pph, SEQ ID NO.: 11),. Este vector (pFB-PL-GFP (pph-GFP)) es un derivado del pFasTBac1 que expresa la proteína GFP, y sobre el que se insertó, aguas arriba de la GFP, un sitio de multi-clonaje (PL). La secuencia del sitio multiclonaje (PL) es GGATCCAaggccactagtcggccgctctgcagctctcgagcatgcggtaccaagcttGAATTC (SEQ ID NO.: 42). El fragmento de ADN correspondiente a los promotores pSeL y pSeS se obtuvo mediante amplificación por PCR usando como molde ADN del genoma de SeMNPV y cebadores específicos que incorporaban sitios de restricción para los enzimas BstZ17I y SpeI (cebadores, SEQ ID NOs.: 32, 33, 34, 35). Después el promotor de poliedrina en pph-GFP fue sustituido por los promotores pSeL y pSeS empleando los sitios de restricción BstZ17I y SpeI (New England biolabs, Ipswich, EUA) y generando los vectores pSeL-GFP y pSeS-GFP.

A partir del vector pSeL-GFP, se amplificaron mediante PCR el fragmento pSeL140 y pSeL120. Para ello se emplearon 2 cebadores específicos, uno incluyendo la región 5' correspondiente así como un sitio de restricción para BstZ17I (cebadores, SEQ ID NOs.: 36, 38) y un segundo cebador que fue diseñado para amplificar la región 3' de gen GFP la cual contenía un sitio de restricción AvrII (cebadores, SEQ ID NOs.: 37, 39). El vector pphGFP fue digerido con los enzimas BstZ17I y AvrII a 37°C durante 3 horas, liberando el fragmento conteniendo el pph-GFP el cual fue reemplazado por los fragmentos generados previamente para pSeL140 (SEQ ID NO.: 4) y pSeL120 (SEQ ID NO.: 5) y dando lugar a los vectores pSeL140-GFP y pSeL120-GFP, respectivamente.

Para la generación de la construcción conteniendo el pph y el pSeL120 (SEQ ID NOs.: 11 y SEQ ID NO.: 5, respectivamente) en tándem (pph-pSeL-120-GFP) el fragmento pSeL-120 (SEQ ID NO.: 5) fue amplificado mediante PCR con cebadores específicos que contenían los sitios de restricción XhoI y AvrII (secuencias de los cebadores: SEQ ID NOs.: 40, 41). Dicho fragmento se clonó en el plásmido pph-GFP abierto con dichos enzimas de restricción. El plásmido resultante se nombró como pph-pSeL-120-GFP.

Generación de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se generaron empleando el sistema de expresión en baculovirus Bac-to-Bac[®] (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos resultantes del paso previo se usaron para transformar células de *E. coli* DH10Bac[™] para la transposición en el genoma viral y generación de los bácmidos recombinantes. El ADN de cada uno de los bácmidos recombinantes obtenidos se purificó siguiendo el protocolo descrito en el manual Bac-to-Bac[®] (Invitrogen[™]), y se empleó para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, Sf21 empleando Cellfectin[®] II Reagent (Invitrogen[™]) como reactivo de transfección, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los virus generados se recogieron tras 3 días de incubación a 27°C. Los virus resultantes de la transfección se amplificaron, infectando de nuevo células Sf21 para poder obtener así un stock viral.

Las líneas celulares de insecto se crecieron en Grace's Insect Medium (1X) (Gibco[®], Life technologies[™]) suplementado con FBS (suero bovino fetal) 10%. Los diferentes stocks de virus generados se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) empleando cebadores específicos para la ADN polimerasa viral.

Ensayos de infección en células de insecto

Para los ensayos de infección con baculovirus se emplearon tres tipos de células de insecto diferentes: *S. exigua*, Se301; *S. frugiperda*, Sf21; y *Trichoplusia ni*, Hi5. Aproximadamente 2×10^5 células (70% de confluencia) se infectaron con cada uno de los virus a una multiplicidad de infección (MOI) 5, añadiendo la solución de virus directamente sobre el medio de cultivo de las células, y a los distintos tiempos post infección, las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y la actividad promotora se determinó mediante la cuantificación de su fluorescencia.

Ensayos fluorescencia

Las células obtenidas en los pasos previos se lisaron empleando un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerol) y se midió la fluorescencia emitida por el gen reportero GFP a 535 nm tras haber sido excitado a 485 nm. Cada valor se obtuvo haciendo 4-5 medidas para cada muestra. El porcentaje de intensidad de fluorescencia GFP está directamente relacionado con los niveles de expresión de GFP (se entiende que se trabaja a concentraciones más bajas que la concentración de saturación, lo cual se

confirma para cada medida). Los valores que se muestran son el promedio resultante de al menos dos ensayos independientes.

Ensayos de infección en insecto

Se usaron larvas en el quinto estadio larvario (el último antes de la pupación) del lepidóptero *Trichoplusia ni* (*T. ni*) para todos los ensayos con insectos. Se inocularon con 5 µl de los baculovirus recombinantes conteniendo 50,000 BVs y se recolectaron a las 72 hpi (horas post infección). Estas larvas se mantuvieron a -20°C hasta su uso. La extracción de las proteínas solubles en condiciones nativas se hizo homogenizando las larvas en un tampón de extracción compuesto por: PBS 1x, 0.01% de Triton X-100, 1mM de PMSF y DTT 25 mM. Para su procesado se usó un triturador del tipo Bag Mixer® blender (Interscience™, France). Los homogenizados se centrifugaron 30 minutos a 1800 g y a 4 °C. Se descartó el sedimento y la fracción soluble, filtrada con miracloth (Calbiochem), (20 µg/pocillo) se analizó por fluorimetría, del mismo modo que se describe el apartado anterior. Cada valor se obtuvo midiendo cada muestra 4-5 veces. Los valores que se muestran son el promedio resultante de al menos dos ensayos independientes.

Ejemplo 2. Expresión de la proteína GFP en células de insecto Sf21, Se301 y Hi5 bajo los promotores pph, pSeL y pSeS.

Las células de insecto de *S. exigua*, Se301; *S. frugiperda*, Sf21; y *Trichoplusia ni*, Hi5 se infectaron con baculovirus recombinantes que incorporaban los siguientes casetes de expresión (Figura 3):

- pph-GFP (pph en la Figura 1)
- pSeL-GFP (pSeL en la Figura 1)
- pSeS-GFP (pSeS en la Figura 1)

Los resultados se observan en la Figura 1. La expresión de GFP en las líneas celulares Sf21 (A), Se301 (B) y Hi5 (C) es superior cuando esta proteína se expresa bajo el promotor pSeL (SEQ ID NO.: 2) que cuando la proteína se expresa bajo el promotor pph (el “gold standard” (modelo de referencia estándar, SEQ ID NO.: 11) hasta 72 horas después de la infección. Además, la expresión de GFP en Hi5 es superior cuando la proteína se expresa bajo el promotor pSeL que cuando la proteína se expresa bajo el promotor pph incluso después de 72 horas tras la infección. Estos resultados muestran la idoneidad de este promotor (pSeL) para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto. Además, la expresión de GFP bajo el promotor pSeS (SEQ ID NO.: 3) fue prácticamente

nula tras la infección. Por lo tanto, la SEQ ID NO.: 1 es una secuencia esencial del promotor de la invención (ver Figura 7).

Ejemplo 3. Expresión de la proteína GFP en células de insecto Sf21, Se301 y Hi5 bajo los promotores pph, pSeL, pSeL-140 y pSeL-120.

5 Las células de insecto de *S. exigua*, Se301; *S. frugiperda*, Sf21; y *Trichoplusia ni*, Hi5 se infectaron con baculovirus recombinantes que incorporaban los siguientes casetes de expresión (Figura 3):

- pph-GFP (pph en la Figura 2)
- pSeL-GFP (pSeL en la Figura 2)
- 10 - pSeL-140-GFP (pSeL-140 en la Figura 2)
- pSeL-120-GFP (pSeL-120 en la Figura 2)

Los resultados se observan en la Figura 2. La expresión de GFP en las líneas celulares Sf21 (A), Se301 (B) y Hi5 (C) es superior cuando esta proteína se expresa bajo el promotor pSeL-120. En la línea celular Se301 los niveles de expresión de GFP bajo los promotores pSeL-120 (SEQ ID NO.: 5) y pSeL-140 (SEQ ID NO.: 4) son parecidos, y superiores a los niveles de expresión de GFP cuando esta proteína se expresa bajo el promotor pSeL (SEQ ID NO.: 2) o pph (SEQ ID NO.: 11). Por lo tanto, ambos promotores pSeL-120 y pSeL-140, y principalmente pSeL-120 permiten una elevada expresión de la proteína recombinante, bastante superior a la expresión bajo el promotor polihedrina (“*gold standard*”).

20 **Ejemplo 4. Expresión de la proteína GFP en células de insecto Sf21, Se301 y Hi5 bajo los promotores pph, pSeL, pSeL-120 y pph-pSeL-120.**

Las células de insecto de *S. exigua*, Se301, *S. frugiperda*, Sf21, y *Trichoplusia ni*, Hi5, se infectaron con baculovirus recombinantes que incorporaban los siguientes casetes de expresión (Figura 3):

- 25 - pph-GFP (pph en la Figura 4)
- pSeL-GFP (pSeL en la Figura 4)
- pSeL-120-GFP (pSeL-120 en la Figura 4)
- pph-pSeL-120-GFP (pph/pSeL-120 en la Figura 4)

Los resultados se observan en la Figura 4. La expresión de GFP en las líneas celulares Sf21 (A), Se301 (B) y Hi5 (C) es superior cuando esta proteína se expresa bajo el promotor pph-pSeL-120 (pph/pSeL-120 en la Figura 4, SEQ ID NO.:18) que cuando se expresa bajo

5 cualquiera de los otros promotores (pSeL, SEQ ID NO.: 2 y pSeL-120, SEQ ID NO.: 5). Se observan los mayores niveles de expresion cuando el promotor de polihedrina (pph) y la secuencia pSeL-120 y se disponen en tándem (pph-pSeL-120, SEQ ID NO.:18). Por lo tanto, la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto es máxima cuando la secuencia que codifica para dicha proteína recombinante está bajo el control del promotor pph-pSeL-120 (SEQ ID NO.:18).

Ejemplo 5. Expresión de la proteína GFP en larvas de insecto de *T. ni*

10 Larvas de *T. ni* en el quinto estadio larvario se inocularon con los baculovirus recombinantes y se recolectaron a las 72 hpi. La Figura 5 muestra la expresión de la proteína recombinante GFP bajo los distintos promotores (distintos casetes de expresión):

- pph-GFP (pph en la Figura 5)
- pSeL-GFP (pSeL en la Figura 5)
- pSeL-120-GFP (pSeL-120 en la Figura 5)

15 La Figura 5 demuestra la utilidad de los nuevos promotores (pSeL, SEQ ID NO.: 2 y pSeL-120, SEQ ID NO.: 5) para la expresión de proteínas recombinantes en larvas de insecto

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de ácido nucleico adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende:
 - a. la secuencia SEQ ID NO.: 1 o su secuencia complementaria; o
 - 5 b. una variante de cualquiera de las secuencias del apartado a) que posee al menos un 70% de identidad con dicha secuencia.
2. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1, donde dicha secuencia comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de la lista que consiste en:
 - 10 a. la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO.: 2, o SEQ ID NO.: 4, o SEQ ID NO.: 5, o SEQ ID NO.: 6, o SEQ ID NO.: 7, o SEQ ID NO.: 8, o SEQ ID NO.: 10, o SEQ ID NO.: 12, o SEQ ID NO.: 13, o SEQ ID NO.: 14, o SEQ ID NO.: 15, o SEQ ID NO.: 17, o SEQ ID NO.: 18, o SEQ ID NO.: 19, o SEQ ID NO.: 20, o SEQ ID NO.: 22, o SEQ ID NO.: 23, o SEQ ID NO.: 24, o SEQ ID NO.: 25, o SEQ ID NO.: 27, o SEQ ID NO.: 28, o SEQ ID NO.: 29, o SEQ ID NO.: 30, o SEQ ID NO.: 44, o sus
15 secuencias complementarias; o
 - b. una variante de cualquiera de las secuencias del apartado a) que posee al menos un 70% de identidad con dichas secuencias.
3. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha secuencia comprende la SEQ ID NO.: 5 o una variante de la SEQ ID NO.: 5 que posee
20 al menos un 90% de identidad con dicha secuencia, o su secuencia complementaria.
4. Secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de la lista que consiste en la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 23, SEQ ID NO.: 28,
25 SEQ ID NO.: 29, SEQ ID NO.: 30, SEQ ID NO.: 44.
5. Casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína.

6. Casete de expresión según la reivindicación 5, que adicionalmente comprende una región de recombinación homóloga (*hr*), como amplificadores (enhancers), operablemente unida al promotor que controla la expresión de la proteína.
7. Casete de expresión según la reivindicación 5 o 6 en el que la proteína se selecciona entre las siguientes: vacuna proteica, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citoquina, factor de coagulación, anticoagulante, receptor, hormona, proteína con valor diagnóstico o proteínas de partículas similares a virus (VLP).
8. Vector de clonación, vector de transferencia o bácmido recombinante que comprende las secuencias de ácido nucleico según una o más de las reivindicaciones 1 a 4 y/o el casete de expresión según una o más de las reivindicaciones 5 a 7.
9. Vector según la reivindicación 8 adecuado para transformar o transducir células procariotas.
10. Vector según la reivindicación 8 adecuado para transfectar o transducir células eucariotas.
11. Vector según la reivindicación 10 adecuado para transfectar o transducir células de insecto, o insectos o larvas de insecto.
12. Vector según la reivindicación 11 en la que las células transfectadas o transducidas son Sf21, o Hi5, o Sf9, o Se301.
13. Vector según la reivindicación 11 en la que las larvas pertenecen a *Trichoplusia ni*.
14. Célula huésped transformada, transformada, transducida o transfectada con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, y/o con el casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
15. Baculovirus que comprende una una secuencia de ácido nucleico según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, y/o un casete de expresión según una o más de las reivindicaciones 5 a 7.
16. Baculovirus según la reivindicación 15 adecuado para infectar células de insecto, insectos o larvas de insecto.
17. Célula que comprende un baculovirus según la reivindicación 15 o 16.

18. Insecto o larva de insecto que comprende una secuencia de ácido nucleico según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, y/o un casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
19. Insecto o larva de insecto que comprende un baculovirus según la reivindicación 15 o 16.
20. Medio de cultivo que comprende una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un báculo, un baculovirus recombinante, una célula, un insecto o larva de insecto según una o más de las reivindicaciones 1 a 19.
21. Método para producir una proteína que comprende los pasos de:
- infectar células de insecto con un baculovirus según cualquiera de las reivindicaciones 15 y/o 16, o transfectarlas o transducirlas con el báculo o con el vector de clonación o de transferencia según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, o con un casete de expresión según una o más de las reivindicaciones 5 a 7;
 - expresar la proteína;
 - obtener dicha proteína.
22. Método para producir una proteína que comprende los pasos de:
- infectar insectos o larvas de insecto con baculovirus según cualquiera de las reivindicaciones 15 y/o 16, o transfectarlas o transducirlas con el báculo o con el vector de clonación o de transferencia según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, o con un casete de expresión según una o más de las reivindicaciones 5 a 7;
 - expresar la proteína;
 - obtener dicha proteína.
23. Proteína recombinante obtenible mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22.
24. Uso de la proteína recombinante según la reivindicación 23 en terapia o diagnóstico.

25. Uso de una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector de clonación, un vector de transferencia, un báculo, un baculovirus recombinante, una célula, un insecto o una larva de insecto según una o más de las reivindicaciones 1 a 19 para la producción de una proteína.

Figura 1

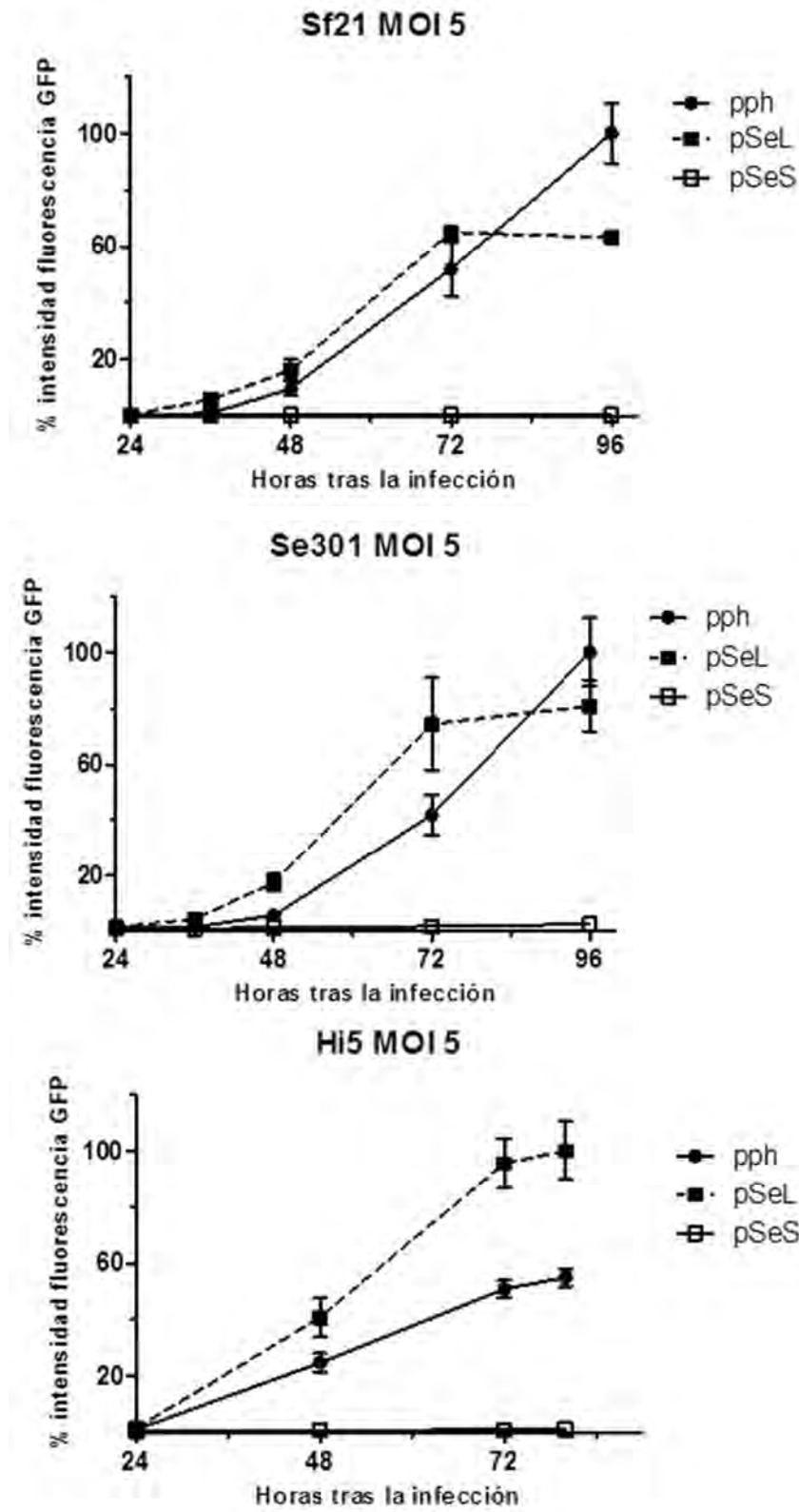


Figura 2

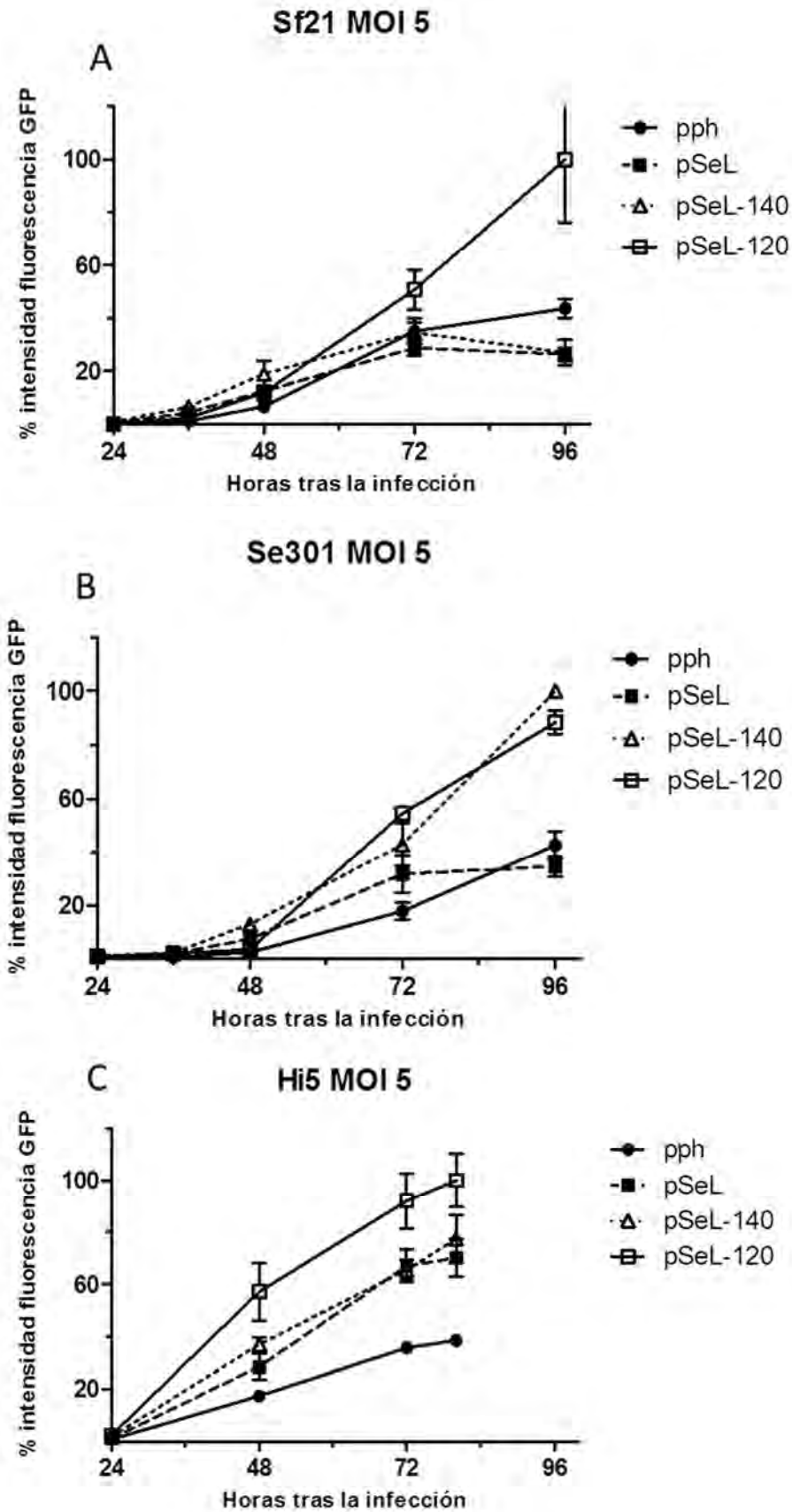


Figura 3

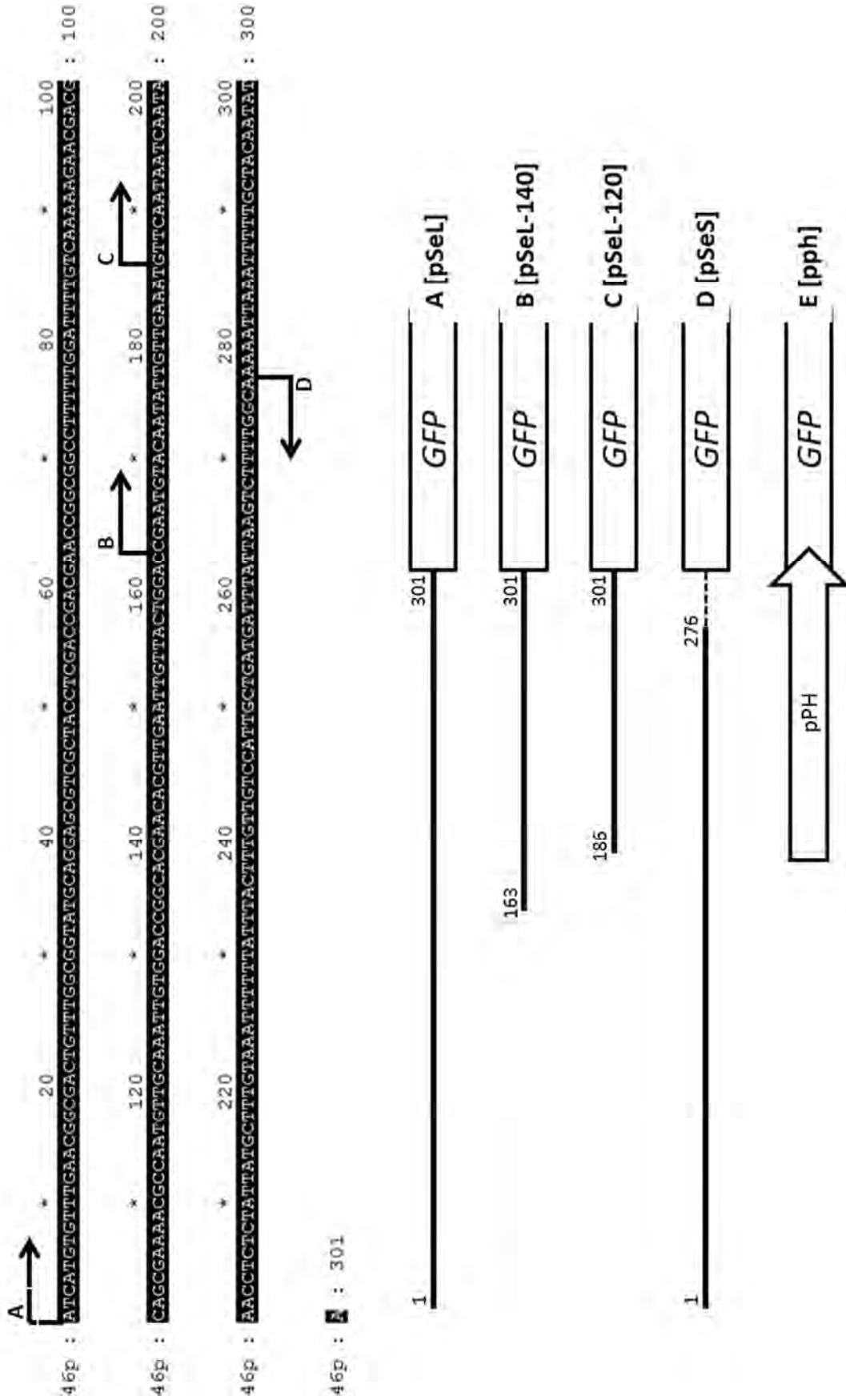


Figura 4

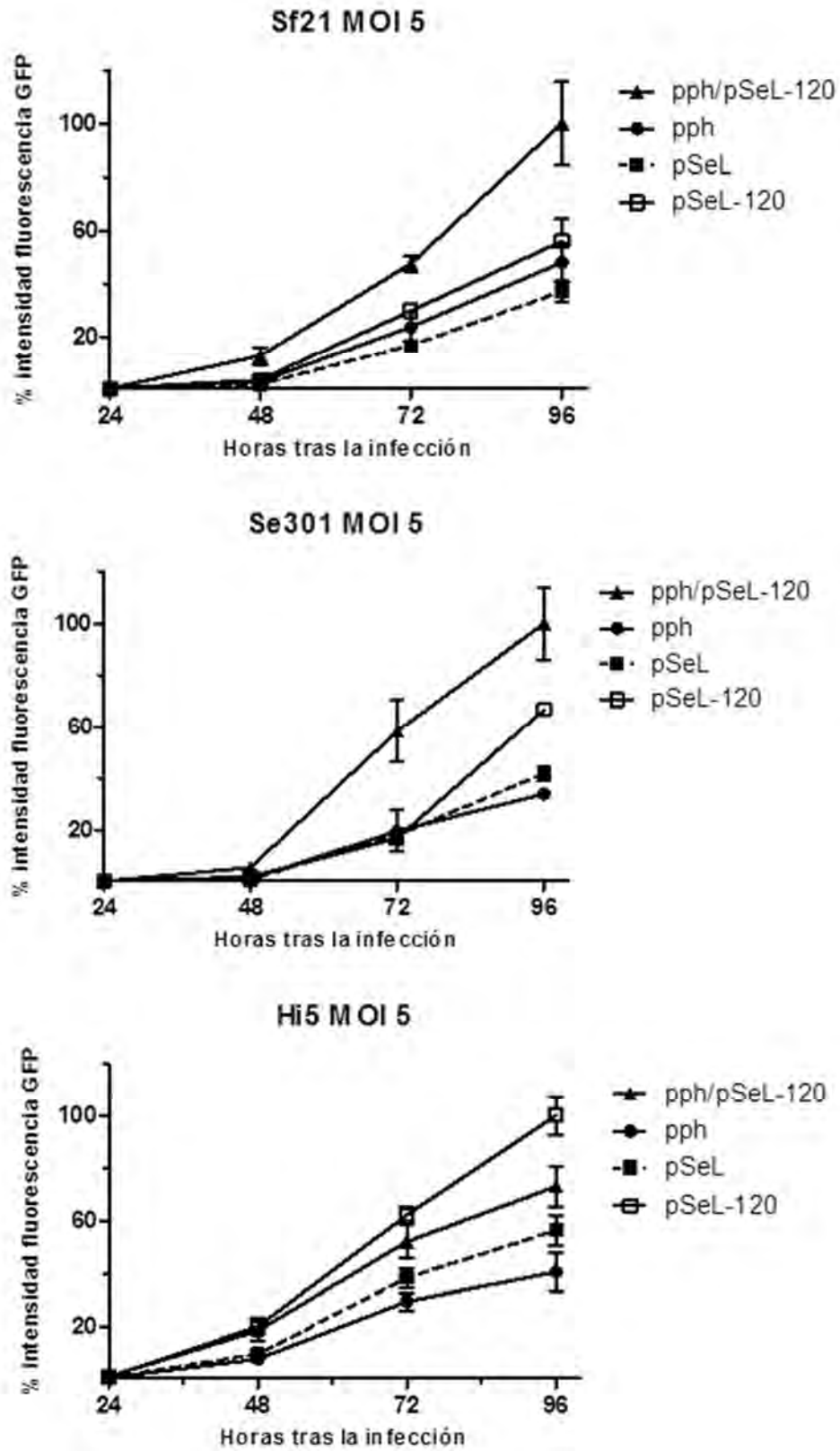


Figura 5

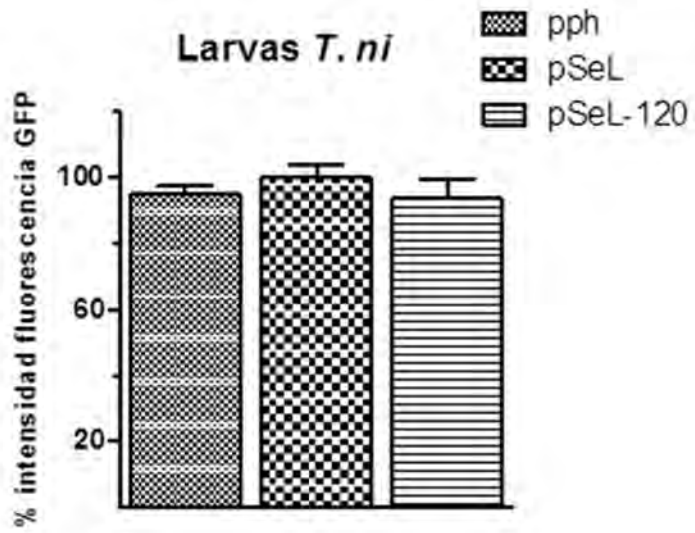
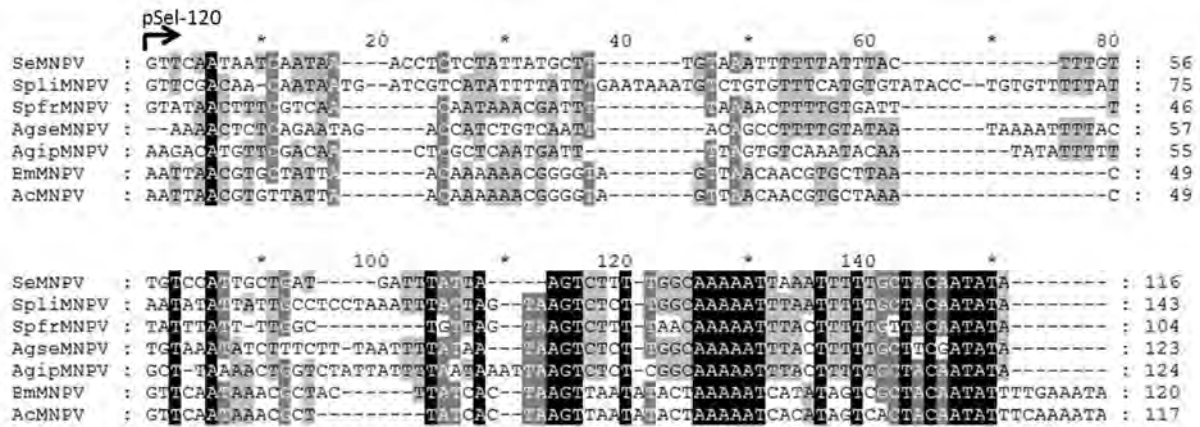


Figura 6



	SeMNPV	SpliMNPV	SpfrMNPV	AgseMNPV	AgipMNPV	BmMNPV
SeMNPV	100%					
SpliMNPV	59%	100%				
SpfrMNPV	55%	49%	100%			
AgseMNPV	51%	54%	50%	100%		
AgipMNPV	53%	51%	50%	55%	100%	
BmMNPV	41%	33%	44%	35%	38%	100%
AcMNPV	39%	30%	44%	32%	36%	92%

Figura 7

pSeL („Long P“):

ATCATGTGTTTGAACGGCGACTGTTTGGCGGTATGCAGGAGCGTCGCTACCTCGACCG
 ACGAACCGGCGGCCTTTTTGGATTTTGTCAAAAAGAACGACGCAGCGAAAACGCCAATG
 TTGCAAATTGTGGACCGGCACGAACACGTTGAATTGTTACTGGACCGAATGTACAATATT
 GTTCAAATGTTCAATAATCAATAAACCTCTCTATTATGCTTTGTAAATTTTTTATTTACTTT
 GTTGTCCATTGCTGATGATTTATTAAGTCTTTTGGCAAAAATTAATTTTTTGCTACAATATA

pSeS („Short P“):

ATCATGTGTTTGAACGGCGACTGTTTGGCGGTATGCAGGAGCGTCGCTACCTCGACCG
 ACGAACCGGCGGCCTTTTTGGATTTTGTCAAAAAGAACGACGCAGCGAAAACGCCAATG
 TTGCAAATTGTGGACCGGCACGAACACGTTGAATTGTTACTGGACCGAATGTACAATATT
 GTTCAAATGTTCAATAATCAATAAACCTCTCTATTATGCTTTGTAAATTTTTTATTTACTTT
 GTTGTCCATTGCTGATGATTTATTAAGTCTTTTGGCA

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
LongP :	ATCATGTGTTTGAACGGCGACTGTTTGGCGGTATGCAGGAGCGTCGCTACCTCGACCGACGAAACCGGCGGCCTTTTGGATTTTGTCAAAAAGAACGACGC										: 101
ShortP :	ATCATGTGTTTGAACGGCGACTGTTTGGCGGTATGCAGGAGCGTCGCTACCTCGACCGACGAAACCGGCGGCCTTTTGGATTTTGTCAAAAAGAACGACGC										: 101
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
LongP :	AGCGAAAACGCCAATGTTGCAAATTGTGGACCGGCACGAACACGTTGAATTGTTACTGGACCGAATGTACAATATTGTTGAAATGTTCAATAATCAATAAA										: 202
ShortP :	AGCGAAAACGCCAATGTTGCAAATTGTGGACCGGCACGAACACGTTGAATTGTTACTGGACCGAATGTACAATATTGTTGAAATGTTCAATAATCAATAAA										: 202
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
LongP :	CCCTCTATTATGCTTTGTAAATTTTTTACTTTGTTGTCATTGCTGATGATTTATTAAGTCTTTGGCAAAAATTAATTTTTGCTACAATATA										: 301
ShortP :	CCCTCTATTATGCTTTGTAAATTTTTTACTTTGTTGTCATTGCTGATGATTTATTAAGTCTTTGGCA-----										: 276

ES 2 554 561 B1

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universitat de València
Alternative Gene Expression S. L.
- <120> Nuevos promotores derivados de baculovirus con elevada actividad en sistemas de expresión basados en baculovirus
- <130> 162 702
- <160> 44
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Promoter
- <400> 1
aaaattaaat ttttgctaca atata 25
- <210> 2
<211> 301
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Promoter
- <400> 2
atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
gaaccggcgg cttttttgga ttttgtcaaa agaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa ttaaatTTTT gctacaatat 300
a 301
- <210> 3
<211> 276
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Promoter
- <400> 3
atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
gaaccggcgg cttttttgga ttttgtcaaa agaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggca 276
- <210> 4

ES 2 554 561 B1

<211> 139
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 4
 cgaatgtaca atattgttga aatgttcaat aatcaataaa cctctctatt atgcttttga 60
 aattttttat ttactttggt gtccattgct gatgatttat taagtctttt ggcaaaaatt 120
 aaatttttgc tacaatata 139

<210> 5
 <211> 116
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 5
 gttcaataat caataaacct ctctattatg ctttgtaaat tttttattta ctttgttgtc 60
 cattgctgat gatttattaa gtcttttggc aaaattaaa tttttgctac aatata 116

<210> 6
 <211> 245
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 6
 gttcaataat caataaacct ctctattatg ctttgtaaat tttttattta ctttgttgtc 60
 cattgctgat gatttattaa gtcttttggc aaaattaaa tttttgctac aatataatca 120
 tggagataat taaaatgata accatctcgc aaataataa gtattttact gttttcgtaa 180
 cagttttgta ataaaaaac ctataaatat tccggattat tcataccgtc ccaccatcgg 240
 gcgcg 245

<210> 7
 <211> 154
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 7
 aaaattaaat ttttgctaca atataatcat ggagataatt aaaatgataa ccatctcgca 60
 aataaataag tattttactg ttttcgtaac agttttgtaa taaaaaaccc tataaatatt 120
 ccggattatt cataccgtcc caccatcggg cgcg 154

<210> 8
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 554 561 B1

<220>
 <223> Promoter
 <400> 8
 atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cctttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa ttaaattTTTT gctacaatat 300
 aatcatggag ataattaaaa tgataacat ctcgcaaata aataagtatt ttactgTTTT 360
 cgtaacagtt ttgtaataaa aaaacctata aatattccgg attattcata ccgtcccacc 420
 atcgggCGCG 430

<210> 9
 <211> 405
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter
 <400> 9
 atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cctttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaatca tggagataat taaaatgata 300
 accatctcgc aaataaataa gtattttact gttttcgtaa cagttttgta ataaaaaac 360
 ctataaatat tccggattat tcataccgtc ccaccatcgg gcgCG 405

<210> 10
 <211> 268
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter
 <400> 10
 cgaatgtaca atattgttga aatgttcaat aatcaataaa cctctctatt atgctttgta 60
 aatTTTTTat ttactttggt gtccattgct gatgatttat taagtctttt ggcaaaaatt 120
 aaatTTTTgc tacaataaa tcatggagat aattaaatg ataaccatct cgcaataaaa 180
 taagtatttt actgTTTTcg taacagtttt gtaataaaaa aacctataaa tattccggat 240
 tattcatacc gtcccacat cgggCGCG 268

<210> 11
 <211> 129
 <212> DNA

ES 2 554 561 B1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 11

atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtatct tactgttttc 60
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
 tcgggcgcg 129

<210> 12

<211> 602

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 12

atcatgtgtt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgctcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cctttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatacaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa ttaaTTTTTt gctacaatat 300
 aatcatgtgt ttgaacggcg actgtttggc ggtatgcagg agcgtcgcta cctcgaccga 360
 cgaaccggcg gcctttttgg attttgtcaa aaagaacgac gcagcgaaaa cgccaatggt 420
 gcaaattgtg gaccggcacg aacacgttga attgttactg gaccgaatgt acaatattgt 480
 tgaaatgttc aataatcaat aaacctctct attatgcttt gtaaTTTTTt tatttacttt 540
 gttgtccatt gctgatgatt tattaagtct tttggcaaaa attaaTTTTt tgctacaata 600
 ta 602

<210> 13

<211> 903

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 13

atcatgtgtt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgctcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cctttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatacaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa ttaaTTTTTt gctacaatat 300
 aatcatgtgt ttgaacggcg actgtttggc ggtatgcagg agcgtcgcta cctcgaccga 360
 cgaaccggcg gcctttttgg attttgtcaa aaagaacgac gcagcgaaaa cgccaatggt 420
 gcaaattgtg gaccggcacg aacacgttga attgttactg gaccgaatgt acaatattgt 480

ES 2 554 561 B1

tgaaatgttc aataatcaat aaacctctct attatgcttt gtaaattttt tatttacttt 540
 gttgtccatt gctgatgatt tattaagtct tttggcaaaa attaaatttt tgctacaata 600
 taatcatgtg tttgaacggc gactgttttg cggatgacg gagcgtcgct acctcgaccg 660
 acgaaccggc ggcctttttg gattttgtca aaaagaacga cgcagcgaaa acgccaatgt 720
 tgcaaattgt ggaccggcac gaacacgttg aattgttact ggaccgaatg tacaatattg 780
 ttgaaatggt caataatcaa taaacctctc tattatgctt tgtaaatttt ttatttactt 840
 tgttgtccat tgctgatgat ttattaagtc ttttggcaaa aattaaattt ttgctacaat 900
 ata 903

<210> 14
 <211> 154
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 14
 atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc 60
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
 tcgggcgcgga aaattaaatt tttgctacaa tata 154

<210> 15
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 15
 atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc 60
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
 tcgggcgcgga tcatgtgttt gaacggcgac tgtttggcgg tatgcaggag cgtcgctacc 180
 tcgaccgacg aaccggcggc ctttttggat tttgtcaaaa agaacgacgc agcgaaaacg 240
 ccaatgttgc aaattgtgga cggcacgaa cacgttgaat tgttactgga ccgaatgtac 300
 aatattgttg aaatgttcaa taatcaataa acctctctat tatgctttgt aaatttttta 360
 ttacttttgt tgtccattgc tgatgattta ttaagtcttt tggcaaaaat taaatttttg 420
 ctacaatata 430

<210> 16
 <211> 405
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 16

ES 2 554 561 B1

atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggcgcgga tcatgtgttt gaacggcgac tgtttgccgg tatgcaggag cgtcgctacc 180
tcgaccgacg aaccggcggc ctttttggat tttgtcaaaa agaacgacgc agcgaaaacg 240
ccaatgttgc aaattgtgga ccggcacgaa cacgttgaat tgttactgga ccgaatgtac 300
aatattgttg aaatgttcaa taatcaataa acctctctat tatgctttgt aaatttttta 360
tttactttgt tgtccattgc tgatgattta ttaagtcttt tggca 405

<210> 17
<211> 268
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter

<400> 17
atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggcgcgc gaatgtacaa tattgttgaa atgttcaata atcaataaac ctctctatta 180
tgctttgtaa attttttatt tactttgttg tccattgctg atgatttatt aagtcttttg 240
gcaaaaatta aatttttgct acaatata 268

<210> 18
<211> 284
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promotor

<400> 18
atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggcgcgg atccaaggcc actagtgcgg ccgctctgca gtctcgaggt tcaataatca 180
ataaacctct ctattatcct ttgtaaattt tttatttact ttgttgcca ttgctgatca 240
tttattaagt cttttggcaa aaattaaatt tttgctacaa tata 284

<210> 19
<211> 147
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter

<400> 19
aaaattaaat ttttgctaca atataatagc gacctttaat tcaaccaaac acaatatatt 60
atagttaa atagaattatt atcaaatcat ttgtatatta attaaaatac tatactgtaa 120
attacatfff atttacaatc actcgac 147

ES 2 554 561 B1

<210> 20
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 20
 atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cttttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa ttaaatTTTTT gctacaatat 300
 aatacggacc ttaattcaa cccaacacaa tatattatag ttaaataaga attattatca 360
 aatcatttgt atattaatta aaatactata ctgtaaatta cattttattt acaatcactc 420
 gac 423

<210> 21
 <211> 398
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 21
 atcatgtggt tgaacggcga ctgtttggcg gtatgcagga gcgtcgctac ctcgaccgac 60
 gaaccggcgg cttttttgga ttttgtcaaa aagaacgacg cagcgaaaac gccaatgttg 120
 caaattgtgg accggcacga acacgttgaa ttgttactgg accgaatgta caatattggt 180
 gaaatgttca ataatcaata aacctctcta ttatgctttg taaatTTTTT atttactttg 240
 ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaatac ggacctttaa ttcaacccaa 300
 cacaatatat tatagttaa taagaattat tatcaaatca tttgtatatt aattaaata 360
 ctatactgta aattacattt tatttacaat cactcgac 398

<210> 22
 <211> 261
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 22
 cgaatgtaca atattgttga aatgttcaat aatcaataaa cctctctatt atgcttttga 60
 aatTTTTTat ttactttggt gtccattgct gatgatttat taagtctttt ggcaaaaatt 120
 aaatTTTTgc tacaataaa tacggacctt taattcaacc caacacaata tattatagtt 180
 aaataagaat tattatcaaa tcatttgtat attaattaa atactatact gtaaattaca 240

ES 2 554 561 B1

ttttatttac aatcactcga c 261

<210> 23
 <211> 238
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 23
 gttcaataat caataaacct ctctattatg ctttgtaaat tttttattta ctttgttgtc 60
 cattgctgat gatttattaa gtcttttggc aaaaattaa tttttgctac aatataatac 120
 ggacctttaa ttcaacccaa cacaatatat tatagttaa taagaattat tatcaaatca 180
 tttgtatatt aattaaata ctatactgta aattacattt tatttacaat cactcgac 238

<210> 24
 <211> 147
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 24
 atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
 atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
 acaaaattaa atttttgcta caatata 147

<210> 25
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Promoter

<400> 25
 atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
 atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
 acatcatgtg tttgaacggc gactgtttg cggtatgcag gagcgtcgct acctcgaccg 180
 acgaaccggc ggcctttttg gattttgtca aaaagaacga cgcagcgaaa acgccaatgt 240
 tgcaaattgt ggaccggcac gaacacgttg aattgttact ggaccgaatg tacaatattg 300
 ttgaaatggt caataatcaa taaacctctc tattatgctt tgtaaatttt ttatttactt 360
 tgttgtccat tgctgatgat ttattaagtc ttttggcaaa aattaaattt ttgctacaat 420
 ata 423

<210> 26
 <211> 398
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 554 561 B1

<223> Promoter

<400> 26
 atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
 atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
 acatcatgtg tttgaacggc gactgtttgg cggtatgcag gagcgtcgct acctcgaccg 180
 acgaaccggc ggcctttttg gattttgtca aaaagaacga cgcagcgaaa acgccaatgt 240
 tgcaaattgt ggaccggcac gaacacgttg aattgttact ggaccgaatg tacaatattg 300
 ttgaaatggt caataatcaa taaacctctc tattatgctt tgtaaatttt ttatttactt 360
 tgttgtccat tgctgatgat ttattaagtc ttttggca 398

<210> 27

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 27
 atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
 atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
 accgaatgta caatattggt gaaatgttca ataataata aacctctcta ttatgctttg 180
 taaatttttt atttactttg ttgtccattg ctgatgattt attaagtctt ttggcaaaaa 240
 ttaaattttt gctacaatat a 261

<210> 28

<211> 238

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 28
 atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
 atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
 acgttcaata atcaataaac ctctctatta tgctttgtaa attttttatt tactttgttg 180
 tccattgctg atgatttatt aagtcttttg gcaaaaatta aatttttgct acaatata 238

<210> 29

<211> 232

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Promoter

<400> 29
 gttcaataat caataaacct ctctattatg ctttgtaa atttttattta ctttgttgtc 60
 cattgctgat gatttattaa gtcttttggc aaaaattaaa tttttgctac aatatagttc 120

ES 2 554 561 B1

aataatcaat aaacctctct attatgcttt gtaaattttt tatttacttt gttgtccatt 180
gctgatgatt tattaagtct tttggcaaaa attaaatttt tgctacaata ta 232

<210> 30
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter

<400> 30
gttcaataat caataaacct ctctattatg ctttgtaaat tttttattta ctttgttgtc 60
cattgctgat gatttattaa gtcttttggc aaaaattaaa tttttgctac aatatagttc 120
aataatcaat aaacctctct attatgcttt gtaaattttt tatttacttt gttgtccatt 180
gctgatgatt tattaagtct tttggcaaaa attaaatttt tgctacaata tagttcaata 240
atcaataaac ctctctatta tgctttgtaa attttttatt tactttgttg tccattgctg 300
atgatttatt aagtcttttg gcaaaaatta aatttttgct acaatata 348

<210> 31
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter

<400> 31
atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60
atcatttga tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg 120
ac 122

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 32
ggatccgtat acatcatgtg tttgaacggc gactg 35

<210> 33
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 33
gactagtata ttgtagcaaa aatttaattt ttgccaaaag 40

<210> 34
<211> 35

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 34
 ggatccgtat acatcatgtg tttgaacggc gactg 35

 <210> 35
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 35
 gactagtgcc aaaagactta ataaatcatc agc 33

 <210> 36
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 36
 tagtataccg aatgtacaat attggtg 27

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 37
 ctgggtgtag cgtcgtaagc 20

 <210> 38
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 38
 tagtatacgt tcaataatca ataaacctct c 31

 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 39
 ctgggtgtag cgtcgtaagc 20

ES 2 554 561 B1

<210> 40
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 40
 atctcgaggt tcaataatca ataaacctct ctattatcct ttgtaaattt tttatttact 60
 ttgttgcca ttgctgatca t 81

 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 41
 ctgggtgtag cgtcgtaagc 20

 <210> 42
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> multiple cloning site (PL)

 <400> 42
 ggatccaagg ccactagtgc ggccgctctg cagtctcgag catgcggtac caagcttgaa 60
 ttc 63

 <210> 43
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> eGFP (enhanced GFP)

 <400> 43
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcatgg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

ES 2 554 561 B1

tacctgagca cccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 44
<211> 245
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter

<400> 44
atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggvcgvg ttcaataatc aataaacctc tctattatgc tttgtaaatt ttttatttac 180
tttgtgtcc attgctgatg atttattaag tcttttgca aaaattaaat ttttgctaca 240
atata 245



- ②① N.º solicitud: 201430914
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2014
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/866** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2014086981 A1 (ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S. L.) 12-06-2014, página 18, línea 1 - página 22, línea 14; reivindicaciones 14-15; figuras 7 y 9.	22, 23
X	WO 2012168492 A2 (ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S. L.) 13-12-2012, página 21, líneas 23 - 27; ejemplo 11.	22, 23
A	PASCUAL, L. et al., 'The transcriptome of Spodoptera exigua larvae exposed to different types of microbes.', Insect BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2012, Vol. 42, No. 8, Págs 557-570, ISSN: 0965-1748 (print), ISSN: 1879-0240 (electronic), doi: 10.1016/j.ibmb.2012.04.003, todo el documento.	1-25
A	MILLÁN-LEIVA, A. et al., 'Genome sequence of SeIV-1, a novel virus from the Iflaviridae family infective to Spodoptera exigua', JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 2012, Vol. 109, No. 1, Págs 127-133, ISSN: 0022-2011, doi: 10.1016/j.jip.2011.10.009, todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.08.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201430914

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/866** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HELDENS, J.G. et al., 'A highly conserved genomic region in baculoviruses: sequence analysis of an 11.3 kbp DNA fragment (46.5-55.1 m.u.) of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus', VIRUS RESEARCH, 1998, Vol. 55, No. 2, Págs 187-198, ISSN: 0168-1702, todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.08.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.08.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22, 25	SI
	Reivindicaciones 23, 24	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-22, 25	SI
	Reivindicaciones 23, 24	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2014086981 A1 (ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.)	12.06.2014
D02	WO 2012168492 A2 (ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.)	13.12.2012
D03	Pascual, L. et al., <i>Insect. Biochem. Mol. Biol.</i> , (2012), 42(8): 557-70.	2012
D04	Millán-Leiva, A. et al., <i>J. Invertebr. Pathol.</i> , (2012), 109(1): 127-33.	2012
D05	Heldens, J.G. et al., <i>Virus Res.</i> , (1998), 55(2): 187-98.	1998

En D01-D02 se divulgan diferentes sistemas de expresión basados en promotores de baculovirus para la producción de proteínas recombinantes

En D03-D05 se identifican secuencias de diferentes baculovirus que infectan al lepidóptero *Spodoptera exigua*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 1, 21, 22 y 25.

1.1.1. El objeto de las reivindicación independiente 1 consiste en una secuencia de ácido nucleico adecuada para funcionar como un promotor de baculovirus que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante que posee al menos un 70% de identidad con dicha secuencia. Además, se reivindican un casete de expresión, un vector de clonación y un baculovirus que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 1 (reivindicaciones 5, 8 y 15). Las reivindicaciones 21 y 22 tratan de métodos para producir una proteína, basados en la aplicación de la secuencia promotora SEQ ID NO: 1. Finalmente, se reivindica el uso de dicha secuencia SEQ ID NO: 1 para la producción de una proteína (reivindicación 25).

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D05, se han caracterizado diferentes secuencias de nucleótidos derivadas de baculovirus que actúan como promotores de la expresión para la producción de proteínas. Sin embargo, ninguna comparte las características técnicas de la secuencia reivindicada en la solicitud. Además, dicha secuencia no se deduce de una manera obvia del estado de la técnica correspondiente. Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 21, 22 y 25, y el de las dependientes 2-20 se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D05.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-22 y 25 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.

2.1. Reivindicación independiente 23.

2.1.1. El objeto de las reivindicación 23 consiste en una proteína recombinante producida según uno de los métodos caracterizados en las reivindicaciones 21 y 22, es decir, mediante un método que se basa en el uso de la secuencia SEQ ID NO: 1 como promotor de expresión. Según la descripción, la proteína recombinante puede ser una vacuna, una proteína terapéutica, un factor de coagulación entre otras (cf. página 30, líneas 20-24).

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 23 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas proteínas recombinantes.

En los documentos D01-D02 que constituyen el estado de la técnica más próximo, se describe la producción de diferentes proteínas recombinantes mediante métodos basados en sistemas de expresión de baculovirus, en particular, vacunas, proteínas terapéuticas, factores de coagulación entre otras (cf. D01: página 18, línea 1 – página 22, línea 14; reivindicaciones 14 y 15; figuras 7 y 9. D02: página 21, línea 23-27; Ejemplo 11). Puesto que en la solicitud no se describe ningún efecto sorprendente y/o inesperado sobre la estructura química y/o la función biológica de las proteínas recombinantes reivindicadas, asociado al método de obtención que se basa en el uso de la secuencia promotora SEQ ID NO: 1 frente a las proteínas recombinantes obtenidas por los procedimientos descritos en D01-D02, se considera que no son nuevas y, además, que la solución propuesta en la solicitud es una mera alternativa no inventiva a la planteada en el estado de la técnica.

Por todo ello, se considera que la reivindicación 23, y la reivindicación dependiente 24 no son nuevas ni inventivas sobre la base de los documentos D01-D02.

- 2.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 23 y 24 no es nuevo y ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.