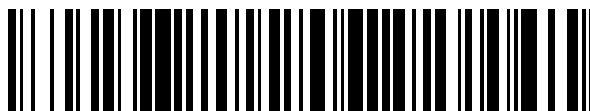


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 855**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2009 PCT/GB2009/002647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO2010055292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2009 E 09748839 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2358883**

54 Título: **Vectores baculovirales**

30 Prioridad:

11.11.2008 GB 0820631

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.06.2017

73 Titular/es:

**LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL
MEDICINE (100.0%)**

**Keppel Street
WC1E 7HT London, GB**

72 Inventor/es:

**ROY, POLLY y
NOAD, ROBERT, JAMES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 616 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores baculovirales

5 La presente invención se refiere a un vector de transferencia para insertar un gen en un locus genético de una secuencia de baculovirus. La presente invención se refiere también a procedimientos de uso del vector de transferencia y bácmidos y baculovirus derivados.

10 El sistema de expresión de baculovirus se ha usado para expresar muchos miles de proteínas en células eucariotas para estudios estructurales y bioquímicos (14). Además de su capacidad para expresar proteínas recombinantes individuales, el sistema de baculovirus se ha usado también para co-expresar proteínas múltiples que forman complejos (15-22). Esto es importante, puesto que las pantallas de interacción de amplio genoma están revelando que muchas funciones críticas de las células vivas son realizadas por complejos de proteínas de subunidades múltiples (23). Se han usado dos estrategias principales para lograr la co-expresión de proteínas usando el sistema
15 de baculovirus. La co-infección de células con dos o más virus, cada uno de los cuales expresa una proteína recombinante, es con diferencia el enfoque más común (19,24,25). Sin embargo, a menudo el rendimiento de los complejos de proteínas de estos estudios es muy variable y la co-infección de las mismas células por dos baculovirus diferentes no sigue la distribución de Poisson (26). Por lo tanto, aunque el enfoque de co-infección es técnicamente directo, está prácticamente limitado a la recuperación de complejos relativamente simples para
20 aplicaciones que no requieren grandes cantidades de proteínas purificadas.

Para aplicaciones tales como estudios estructurales y grandes estudios de vacunas donde se requiere más proteína, y para complejos más complicados formados a partir de muchas subunidades, se ha usado el enfoque alternativo de la co-expresión de proteínas de casetes de expresión múltiples similares insertados en los loci de polihedrina o P10
25 (15-18,22,27). Este enfoque tiene la ventaja de que cualquier célula en el cultivo que sea infectada con el virus recombinante, expresa todas las proteínas requeridas para la formación del complejo de proteínas de manera reproducible. Cuando los enfoques de co-infección y baculovirus individual se han comparado, este último ha demostrado un rendimiento significativamente mejor del complejo recombinante (28). Sin embargo, la expresión de proteínas múltiples usando un virus recombinante individual no carece de inconvenientes. Aunque el baculovirus con
30 forma de bacilo parece ser bastante tolerante a las inserciones en su genoma, los genes son transferidos al virus por recombinación homologa, y el vector de transferencia debe ser de un tamaño que sea fácilmente manipulado en *E. coli*. Por lo tanto, existe un límite para el número de genes que pueden insertarse en un vector de transferencia. En la práctica, esto significa que es raramente posible expresar más de cuatro proteínas de un solo locus. Además, los baculovirus contienen secuencias y expresan proteínas que promueven la recombinación homologa (29-32). Por lo
35 tanto, los virus que contienen grandes cantidades de secuencia repetida, son propensos a transposición y recombinación (21,33,34).

El enfoque de co-expresión de baculovirus individual se ha modificado por la inserción de un sitio *loxP* en el locus *chiA/catepsina* de un bácmido que contiene ya la diana Tn7 en el locus de polihedrina (20). Esto permite la
40 inserción de múltiples casetes de expresión en cada uno de estos loci usando recombinación en *E. coli*. Como podría esperarse, dado que este sistema se basa en la duplicación iterativa de un casete de expresión que ha sido modificado para que exprese diferentes genes, existe evidencia de que las inserciones en este sistema son genéticamente algo inestables (21).

45 Recientemente, la investigación de los baculovirus se ha beneficiado del uso del sistema de recombinación ET que ha permitido la inactivación génica selectiva de genes virales (35-49). Sin embargo, no se ha examinado el potencial de esta técnica para diseñar y facilitar la expresión de proteínas en loci genéticos diferentes de P10 y polihedrina.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la expresión eficiente de múltiples proteínas recombinantes
50 (es decir, proteínas no baculovirales) de un genoma de baculovirus individual. El procedimiento permite que casetes de expresión de proteínas individuales se inserten eficientemente en diferentes loci dentro del genoma vírico, usando el sistema de recombinación ET. Además, el procedimiento permite la expresión de complejos con numerosas subunidades.

55 La expresión de proteínas individuales usando baculovirus como un sistema de expresión, está bien establecida. La metodología básica del sistema de expresión ha cambiado muy poco desde su primera producción. A 133 kb, el genoma del dsDNA del baculovirus es demasiado grande para ser manipulado directamente. Por lo tanto, los genes que codifican proteínas extrañas se clonan, en *E. coli*, en vectores que contienen un casete de expresión del virus de

insecto AcMNPV, y este se introduce entonces con ADN vírico en células de insecto, donde proteínas víricas y celulares median la recombinación homóloga que da como resultado la producción de un virus infeccioso (con respecto a las células de insecto) que expresa la proteína extraña. Ya se han generado algunas variaciones sobre este tema, incluyendo genomas víricos que se replican solo si ocurre recombinación (1,2), y realizando una
 5 recombinación en *E. coli* con un báculo en base al uso del transposón Tn7 (3) que acelera la selección del virus recombinante. La expresión de complejos de múltiples proteínas en células de insecto, se ha logrado también usando el sistema de expresión de baculovirus como se ha analizado de forma breve anteriormente. Inicialmente, se usaron múltiples virus que expresaban cada uno una proteína individual para co-infectar células susceptibles, y el complejo de proteínas se purificó después de la expresión. Sin embargo, esto es en el mejor de los casos ineficiente
 10 y no lo suficientemente reproducible para ser factible para una extensión a escala. Como una alternativa, se produjeron vectores que incorporaban múltiples unidades de expresión pero que se recombinaban con un locus genético de virus individual (4-6). De forma similar, el documento WO2007/104979 describe un vector de transferencia que comprende un gen que se expresará aguas abajo de un promotor de expresión, sin embargo, tal vector no proporciona un medio por el cual puedan identificarse recombinantes positivos. Además, estos vectores
 15 tuvieron la ventaja de que produjeron todas las subunidades de proteína recombinantes en cada célula infectada, y dieron como resultado rendimientos significativamente mayores del complejo de proteínas recombinantes. Además, debido a que solo un virus individual expresa todas las proteínas, los resultados de las infecciones fueron mucho más reproducibles. La desventaja de estos vectores es doble. Primero, debido a que los vectores contienen secuencias repetidas y el baculovirus expresa proteínas que promueven la recombinación homóloga, la expresión,
 20 en particular de construcciones que contienen tres o cuatro unidades de expresión, no siempre es muy estable genéticamente a través de grandes números de pases víricos (que son necesarios durante el aumento a escala industrial para la expresión de proteínas de baculovirus). En segundo lugar, existe un límite práctico con respecto al tamaño de la inserción que puede fácilmente mantenerse y manipularse en *E. coli*, lo que limita el número de proteínas que pueden expresarse a partir de estos vectores. Otro enfoque que se ha propuesto para la producción
 25 de múltiples proteínas, es la inserción de una o más proteínas extrañas en un locus genético en baculovirus, después la selección de un virus que exprese esa proteína, y el uso de este genoma vírico para recombinar en un segundo locus genético con el fin de expresar otras proteínas (7). Sin embargo, debido al alto grado de aptitud técnica y a la cantidad de tiempo implicada en este enfoque (16 días para el primer locus y 25 días para cada locus posterior), este enfoque no se ha usado prácticamente nunca. Un desarrollo reciente fue modificar el sistema del
 30 transposón Tn7 basado en BAC para insertar un sitio LoxP en un segundo locus genético en baculovirus, para permitir también la inserción de genes adicionales en este locus en *E. coli* (8). Sin embargo, este procedimiento padece aún los problemas de las secuencias de repetición de la duplicación de promotores en los vectores bacterianos, lo que significa que la construcción es genéticamente inestable para pases víricos múltiples, y los vectores de transferencia alcanzarán rápidamente el tamaño práctico máximo para manipulación en *E. coli*.

35 El procedimiento de la presente invención supera al menos algunos de los problemas inherentes en los procedimientos anteriores, tales como la inestabilidad genética y el requisito de rondas múltiples de recombinación.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un vector de transferencia para insertar un gen
 40 en un locus genético de una secuencia de baculovirus que comprende:
 un casete de expresión que comprende un promotor eucariota unido operativamente al gen;
 un casete de selección bipartita flanqueado por secuencias de recombinación LoxP donde dichas secuencias LoxP están modificadas para asegurar que únicamente puede producirse una única ronda de recombinación que
 comprende:

- 45
- i. una secuencia expresable que codifica un primer marcador seleccionable; y
 - ii. una secuencia expresable que codifica un segundo marcador seleccionable; y

50 secuencias que flanquean los casetes de expresión y de selección bipartita, donde las secuencias corresponden sustancialmente a secuencias del locus genético en la secuencia de baculovirus, permitiendo de este modo la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y el baculovirus.

El vector de transferencia de la presente invención puede usarse para insertar eficientemente un gen en un locus genético de una secuencia de baculovirus, y para seleccionar las secuencias de baculovirus que comprenden el gen.
 55 En particular, se ha encontrado que, mediante el uso de un casete de selección bipartita, se obtuvo un aumento sustancial en la identificación de clones positivos (es decir, secuencias de baculovirus que contenían el gen insertado), en comparación con la selección usando un marcador de selección individual. Esto proporciona una ventaja significativa sobre el uso de un marcador de selección individual. Únicamente un pequeño número de baculovirus se transforman y, por lo tanto, el marcador solo se expresa a niveles muy bajos. Por ejemplo, cuando el

marcador es resistente a antibióticos, solo pueden usarse niveles muy bajos de antibiótico. Esto da como resultado la selección de variantes bacterianas que son resistentes al antibiótico usado. Por lo tanto, algunas bacterias que crecen en las placas pueden no contener la modificación. El uso de dos procedimientos de selección positiva supera la posibilidad de dichas selecciones de falsos positivos.

5

El vector de transferencia de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, siempre que sea capaz de recombinarse con una secuencia de baculovirus a través de recombinación homóloga para insertar un gen en la secuencia de baculovirus. Los vectores de transferencia adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica. A continuación, se analizan características clave del vector de transferencia.

10

El gen a insertar en la secuencia de baculovirus puede ser cualquier gen heterólogo (es decir, gen no baculoviral). Se prefiere que el gen heterólogo codifique una subunidad de un complejo de proteínas. El gen heterólogo puede codificar una proteína vírica, un componente de un receptor o un complejo de chaperonas. Se prefiere particularmente que el gen heterólogo codifique para una proteína vírica que, junto con otras proteínas víricas, puedan formar una partícula pseudovírica (VLP).

15

El locus genético en el que el gen se inserta en la secuencia de baculovirus, puede ser cualquier locus adecuado que permita la expresión del gen insertado, y además, no impida la capacidad de replicación de la secuencia de baculovirus. Además, el locus usado no debe afectar a la capacidad del baculovirus para infectar células, es decir, que se replique o se propague de célula a célula. Dichos loci incluyen los loci de polihedrina y P10. Otros loci adecuados identificados por los presentes inventores incluyen *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*.

20

La secuencia de baculovirus puede ser cualquier secuencia de baculovirus adecuada que pueda replicarse en una célula de insecto y una célula procarionta tal como *E. coli*. En particular, puede usarse cualquier genoma de baculovirus vírico que contenga un replicón BAC. Las secuencias de baculovirus adecuadas incluyen el bácmido AcMNPV.

25

El término "casete de expresión" se refiere a la combinación de elementos requeridos para la expresión del gen. Por consiguiente, el casete de expresión comprende un promotor adecuado que permite la expresión del gen codificado en células eucariotas (es decir, células de insecto), y una secuencia de señal de poliadenilación adecuada que flanquea la secuencia del gen. Los casetes de expresión para la expresión de genes en células eucariotas se conocen bien por los expertos en la técnica. Los promotores particularmente preferidos incluyen los promotores tardíos víricos de baculovirus (por ejemplo, p35), o los promotores muy tardíos víricos (por ejemplo, los promotores de polihedrina y p10). Las secuencias de señal de poliadenilación adecuadas incluyen la secuencia de poliadenilación de triptófano hidroxilasa (Tph), o secuencias de poliadenilación de genes de baculovirus.

30

35

El casete de expresión puede comprender más de un gen (por ejemplo, 2, 3 o 4 genes) que da como resultado la expresión de más de un gen. Sin embargo, en general, se prefiere que el casete de expresión comprenda un único gen.

40

Se ha encontrado que el casete de selección bipartita mejora la identificación y el aislamiento de clones que han recibido con éxito el gen. El casete de selección bipartita comprende 2 marcadores seleccionables diferentes. El casete comprende también cualquier elemento requerido para la expresión de los marcadores en una célula bacteriana, tal como uno o más promotores bacterianos. La etapa de selección de secuencias que han recibido el gen comprende la selección de secuencias que comprenden ambos marcadores seleccionables. Esta etapa de selección se realiza en células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*. Los marcadores seleccionables pueden ser cualquier marcador que permita que las células que comprenden el casete sean seleccionadas. Por ejemplo, los marcadores pueden ser visibles, tales como un marcador que cause la apariencia o el cambio de color en una célula o colonia. Como alternativa, el marcador puede conferir resistencia, por ejemplo, a un antibiótico. Los dos marcadores seleccionables pueden ser el mismo tipo de marcador, por ejemplo, con resistencia a dos antibióticos diferentes, o diferentes tipos de marcador, por ejemplo, con resistencia a antibióticos y un marcador visual. El primer marcador seleccionable es preferiblemente un marcador visual, tal como el fragmento *LacZ*alfa, que permite que células que expresan el fragmento *LacZ*alfa parezcan de color azul en presencia de IPTG o X-gal. El segundo marcador seleccionable es preferiblemente cualquier marcador que confiera resistencia a antibióticos, tal como resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, puromicina, ampicilina, penicilina, apramicina, kanamicina o fleomicina. Se prefiere particularmente que el segundo marcador confiera resistencia a fleomicina.

45

50

55

Según se menciona, el casete de selección bipartita está flanqueado por secuencias de recombinación LoxP. Las secuencias de recombinación LoxP se combinan entre sí en presencia de Cre recombinasa, dando como resultado

la delección de la secuencia intermedia. Por consiguiente, el casete de selección bipartita puede eliminarse, permitiendo que los mismos marcadores seleccionables sean usados cuando se inserta algún gen adicional en la secuencia de baculovirus. Preferiblemente, los sitios LoxP se modifican para garantizar que solo pueda producirse una única ronda de recombinación entre los sitios. Los sitios LoxP modificados adecuados se conocen por los 5 expertos en la técnica, por ejemplo, los sitios modificados Lox66 y Lox71.

Las secuencias que flanquean los casetes de expresión y de selección bipartita, corresponden sustancialmente a secuencias del locus genético que permiten que ocurra una recombinación homologa entre el vector de transferencia y la secuencia de baculovirus. Cada secuencia de flanqueo es preferiblemente de al menos 20 pb de longitud, más 10 preferiblemente de al menos 30 pb de longitud, e incluso más preferiblemente de al menos 50 pb de longitud, y tiene una secuencia que permite una recombinación específica con una secuencia del locus genético.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un báculo recombinante que comprende:
15 poner juntos un báculo y el vector de transferencia de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para permitir la recombinación homóloga; y
seleccionar un báculo recombinante que comprenda el casete de selección bipartita.

El báculo recombinante puede seleccionarse usando técnicas estándar, dependiendo del casete de selección 20 bipartita.

El procedimiento para producir un báculo recombinante puede comprender además detectar la presencia del gen en el báculo o su producto de expresión. Pueden usarse técnicas de selección adecuadas, dependiendo del gen específico. 25

Además, dado que el casete de selección es flanqueado por secuencias de recombinación LoxP, el procedimiento comprende además preferiblemente inducir la recombinación entre los sitios LoxP, por ejemplo, exponiendo el báculo a Cre recombinasa, para eliminar el casete de selección bipartita. La Cre recombinasa está preferiblemente bajo el control de un promotor inducible, tal como el promotor de arabinosa. La ventaja de eliminar el casete de 30 selección bipartita, es que un vector de transferencia adicional puede recombinarse con el báculo, donde el vector de transferencia adicional contiene al mismo casete de selección bipartita. La selección del báculo recombinado adicional puede realizarse usando las mismas técnicas que se usan después de la primera ronda de recombinación.

En general, el procedimiento para producir un báculo recombinante se realiza en una célula procariota, ya que un 35 sistema basado en células procariotas es más fácil y más rápido de manipular. Se prefiere que el sistema basado en células procariotas conduzca a la recombinación homologa. Dichos sistemas incluyen el sistema de recombinación lambda red, que se describe en la solicitud de patente Europea EP-A-1291420. Preferiblemente, el procedimiento para producir el báculo recombinante se realiza en *E. coli*. Se prefiere particularmente que el procedimiento se realice usando la línea celular de *E. coli* EL350 que tiene un profago lambda integrado que expresa *exo*, 40 *bet* y *gam* bajo el control del promotor lambdaPL regulado por la temperatura, y Cre recombinasa bajo el control de un promotor inducible por arabinosa.

El procedimiento para producir el báculo recombinante puede repetirse varias veces, de manera que el báculo puede contener muchos genes heterólogos, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más genes heterólogos. Mediante la 45 tentativa de usar diferentes promotores para la expresión de cada gen insertado, y puesto que cada gen se inserta en un locus genético diferente, es posible reducir o evitar el tener secuencias repetidas en el báculo y garantizar de esta manera que el báculo tenga buena estabilidad genética. Se prefiere además que al menos un gen esencial esté situado entre cada gen heterólogo insertado. Tal disposición garantiza que, si se produce una recombinación homologa entre cualquiera de las secuencias insertadas, un gen esencial será eliminado, dando como resultado un 50 báculo no viable.

De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención proporciona un báculo recombinante obtenido por el procedimiento de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. El báculo comprende el gen insertado y, como se indica en el presente documento, puede comprender también remanentes de las secuencias LoxP. Estos 55 remanentes pueden usarse como marcadores para identificar los báculos. El báculo comprende preferiblemente al menos 6, 7, 8 o 9 genes heterólogos.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención proporciona también un procedimiento para producir un baculovirus recombinante que comprende cultivar una célula eucariota que contiene el báculo recombinante

obtenido por el procedimiento de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, en condiciones de manera que se produzca un baculovirus.

Preferiblemente, las células eucariotas son células de insecto, más preferiblemente derivadas de los insectos 5 *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*, por ejemplo, las células de insecto (*Sf21*, *Sf9* o *TN5B-1-4*). El baculovirus puede aislarse usando técnicas estándar, y puede ponerse a prueba la expresión del gen heterólogo insertado.

De acuerdo con un quinto aspecto, la presente invención proporciona un baculovirus recombinante obtenido por el procedimiento de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención.

10 De acuerdo con un sexto aspecto, la presente invención proporciona también un bÁcmido recombinante o un baculovirus recombinante que expresa una pluralidad de proteínas heterólogas, donde cada proteína se expresa a partir de un locus genético separado del bÁcmido o baculovirus. Se prefiere adicionalmente que al menos un gen esencial estÉ situado entre cada locus genético que exprese una proteína heteróloga. Tal disposición garantiza que 15 si se produce una recombinación homologa entre loci genéticos que expresan un gen heterólogo, un gen esencial es eliminado, dando como resultado un bÁcmido o baculovirus no viable. Preferiblemente, el bÁcmido o baculovirus expresa al menos 3, más preferiblemente al menos 5, y mucho más preferiblemente al menos 8 proteínas. Las proteínas son heterólogas, es decir, no estÁn codificadas por baculovirus de origen natural. Se prefiere ademÁs que las proteínas heterólogas codificadas sean subunidades de un complejo de proteínas, tales como una VLP, un 20 complejo de receptores o un complejo de chaperonas.

Se prefiere adicionalmente que los loci genéticos separados del bÁcmido o baculovirus recombinante se seleccionen de entre *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56* y *p10*. La posición de dichos loci se describe específicamente con referencia al baculovirus AcMNPV en la Tabla 1 que se indica a continuación. Un experto en la técnica puede 25 determinar fÁcilmente la ubicación de los loci en otras cepas de baculovirus y bÁcmidos usando esta información.

Tabla 1 Los loci genéticos a los que se ha hecho referencia anteriormente, se definen a continuación con referencia a la secuencia de acceso de referencia para AcMNPV (número de acceso NC001623).

Locus	límites
ctx	2028-2296
egt	11310-13091
39k	29196-30070
orf51	43154-44337
gp37c	52192-52327
iap2	60983-61823
p35	116282-117460
p10	118767-119135
odv-e56	128947-130166

30 Como se indica en el presente documento, también se puede obtener un bÁcmido recombinante o baculovirus recombinante, donde un casete de expresión que codifica una proteína heteróloga se inserta en uno o más de los siguientes loci genéticos: *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*.

Se ha encontrado que estos loci genéticos permiten específicamente la expresión de alto nivel de la proteína 35 heteróloga, sin que se interrumpan las funciones esenciales del bÁcmido o el baculovirus.

Preferiblemente, el bÁcmido recombinante o el baculovirus recombinante codifica para una pluralidad de proteínas, estando cada casete de expresión insertado en un locus genético diferente. Se prefiere ademÁs que el bÁcmido recombinante o el baculovirus recombinante codifique al menos 3, más preferiblemente al menos 5, y mucho más 40 preferiblemente al menos 8 proteínas. Se prefiere ademÁs que las proteínas heterólogas codificadas sean subunidades de un complejo de proteínas, tales como una VLP, un complejo de receptores o un complejo de chaperonas.

Se indica en el presente documento un vector de transferencia para insertar un gen en un locus genético de una secuencia de baculovirus que comprende:

- un casete de expresión que comprende un promotor eucariota unido operativamente al gen; y
- 5 secuencias que flanquean el casete de expresión, donde las secuencias corresponden sustancialmente a las secuencias del locus genético dentro de la secuencia de baculovirus, donde el locus genético se selecciona de entre: *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*.

Como se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que insertando el gen en los loci genéticos mencionados, puede obtenerse una expresión de alto nivel del gen sin que se interrumpan las funciones esenciales de la secuencia de baculovirus.

Como se indica en el presente documento, este procedimiento que usa los loci anteriores para producir un bÁcrido recombinante, comprende:

- poner juntos dicho bÁcrido y el vector de transferencia para permitir una recombinaci3n hom3loga; y
- 15 seleccionar un bÁcrido recombinante que comprenda el casete de expresi3n.

Los procedimientos para producir tal bÁcrido recombinante y seleccionar tal bÁcrido, se conocen bien por los expertos en la t3cnica. La presente invenci3n tambi3n proporciona un bÁcrido recombinante obtenido mediante este procedimiento.

Tambi3n se indica en el presente documento un procedimiento que usa los loci anteriores para producir un baculovirus recombinante que comprende producir dicho bÁcrido recombinante y cultivar una c3lula eucariota que contiene el bÁcrido, de manera que se produzca un baculovirus.

Los procedimientos para producir tal baculovirus recombinante se conocen bien por los expertos en la t3cnica. La presente invenci3n tambi3n proporciona un baculovirus recombinante obtenido mediante este procedimiento.

La presente invenci3n tambi3n proporciona una c3lula que contiene un vector de transferencia, un bÁcrido, o un baculovirus de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invenci3n.

La presente invenci3n tambi3n proporciona un procedimiento para producir una o mÁs prote3nas que comprende cultivar el bÁcrido o baculovirus recombinante de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invenci3n en las condiciones adecuadas. La una o mÁs prote3nas se codifican por el uno o mÁs genes, y pueden combinarse para formar un complejo de prote3nas, tal como una VLP o un complejo de chaperonas. La una o mÁs prote3nas pueden aislarse usando t3cnicas estÁndar bien conocidas por los expertos en la t3cnica.

La presente invenci3n se describe ahora a modo de ejemplo únicamente con referencia a las siguientes figuras.

La figura 1 muestra una selecci3n mejorada de recombinantes de la clonaci3n ET. A) Dibujo del ADN usado para las recombinaciones cat y bipartita. Ambas construcciones tuvieron las mismas secuencias de flanqueo del baculovirus (AcMNPV), el casete de expresi3n de luciferasa de Renilla (Pp35-Rluc-Tph) y sitios loxP (LoxP). El marcador seleccionable bipartita tuvo tambi3n el gen de resistencia a zeocina (ZeoR) y el fragmento LacZ α . En la construcci3n resistente a cloranfenicol, este se reemplaz3 por el gen cat. B) NÚmero de colonias bacterianas positivas tras la recombinaci3n ET. El ADN usado para la recombinaci3n se produjo mediante PCR o digesti3n con enzimas de restricci3n, segÚn se indique. C) La inserci3n correcta del casete de expresi3n Rluc se confirm3 por PCR usando un cebador en el ADN transferido, y uno flanqueando el locus diana en el ADN del baculovirus. El producto de PCR correcto (indicado con una flecha) solo se producirÁ despu3s de la integraci3n correcta. Se muestran los resultados para 12 recombinantes independientes (1-12), sin control de PCR del molde (13), molde de bÁcrido no modificado (14) y molde de ADN de transferencia (15). El campo M es el ADN marcador. D) Actividad de luciferasa de Renilla (unidades luminosas relativas) 48 horas post-infecci3n, en el lisado de c3lulas de c3lulas infectadas con el pase 2 de los bÁcridos recombinantes 1-12 de C. La actividad de fondo en los lisados equivalentes de c3lulas no infectadas y c3lulas infectadas con bÁcrido no modificado (AcMNPV), era mÁs de 106 veces menor.

La figura 2 muestra la eliminaci3n selectiva de los genes marcadores. A) Dibujo que muestra la estrategia para la recombinaci3n ET de un casete de expresi3n (expresi3n) en el ADN del bÁcrido AcMNPV, y la eliminaci3n selectiva de solo los genes marcadores (selecci3n) por recombinaci3n mediada por Cre. B) PCR usando cebadores marcados como a y b en A, campos 1-2: dos recombinantes de bÁcrido independientes despu3s de la recombinaci3n ET, campos 3-6: cuatro recombinantes independientes despu3s de la

recombinación mediada por Cre para eliminar los marcadores seleccionables bacterianos, campo 7: sin molde, campo 8: molde de ADN de bácmido no modificado, campo 9: molde de ADN de plásmido que contiene el casete marcador seleccionable, campo 10: marcador de ADN. Los productos de PCR que corresponden a los tamaños predichos para los productos precursor y recombinante de la recombinación mediada por Cre, están marcados como P y R, respectivamente. C) Secuenciación del archivo de rastreo de un recombinante representativo del análisis por PCR en B, que confirma la presencia de un loxP defectuoso que incorpora los brazos loxP71 y loxP66 que hacen que el recombinante sea incapaz de experimentar una recombinación mediada por Cre adicional (secuencias mostradas en las SEQ ID NOS: 1 y 2). D) Actividad de luciferasa de Renilla de los bácmidos recombinante y precursor de B, al transfectarse en células de insecto. La actividad de luciferasa de Renilla se ensayó 48 horas post-infección después del pase del virus recombinante. La actividad de fondo de las células no infectadas se marca como Células.

La figura 3 muestra la identificación de sitios adicionales para la expresión de proteínas recombinantes en el genoma de AcMNPV. A) Dibujo de AcMNPV que muestra las posiciones relativas de los loci usados para la expresión de proteínas. B) Tabla que muestra los loci usados para la inserción y cualquier cambio adicional hecho al locus. C) Actividad de luciferasa relativa de Renilla 48 horas post-infección con un virus modificado que contiene un casete de expresión de luciferasa de luciérnaga adicional en cada locus indicado. Todos los virus tenían el mismo casete de expresión de luciferasa de Renilla en el locus p10 bajo el control del promotor p35. Las barras de error indican la desviación estándar de cinco réplicas para cada locus. D) Actividad de luciferasa normalizada de luciérnaga, que muestra la expresión relativa de un casete de terminador de promotor de polihedrina-polihedrina de luciferasa de luciérnaga insertado en cada locus, según se indica. Las barras de error indican la desviación estándar de 5 réplicas para cada locus. La luciferasa de luciérnaga se normalizó usando el control de luciferasa de Renilla expresado del mismo genoma. Se excluyeron las inserciones de luciferasa de luciérnaga en los loci orf11, v-fgf, pe y orf23, debido a los niveles de luciferasa de Renilla de más de 2 logaritmos menor que el virus control. La Ph del virus tiene luciferasa de luciérnaga en el locus de polihedrina, y luciferasa de Renilla en el locus p10. La Ph* del virus tiene la misma inserción de luciferasa de Renilla p10, pero ninguna inserción de luciferasa de luciérnaga.

La figura 4 muestra la expresión de M1 de influenza los loci de polihedrina y egt. El panel izquierdo muestra gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie de la proteína total de células infectadas con baculovirus de control (campos 1 y 4), egt-M1 (campo 2) e YM1-M1 (campo 3). El tamaño de los marcadores de proteína (campo M) se indica en el lado izquierdo del gel. El panel derecho muestra el análisis Western blot de gel duplicado sondeado con antisuero anti-H7N7.

La figura 5 muestra la co-expresión de M1 y HA de influenza y la formación de VLP. A) El panel izquierdo muestra el gel con tinción de Coomassie de la proteína total; el panel derecho muestra el análisis Western blot de gel duplicado sondeado con suero de virus de la influenza anti-H7N7. Las células se infectaron con baculovirus doble que expresaba HA y M1 (campo 1), baculovirus que expresaba solo HA (campo 2), células control (campo 3) y baculovirus que expresaba solo M1 (campo 4). B) Imágenes de EM de tinción negativa de VLP de la influenza. C) VLP de la influenza marcadas con inmuno-oro (HA) con partículas de oro indicadas con una flecha.

La figura 6 muestra la producción de baculovirus que co-expresan 4 proteínas. A) Lisado celular de células infectadas con baculovirus que expresa VP2 (campo 1), VP5 (campo 2), VP3 (campo 3) y VP7 (campo 4), células no infectadas (campo 5) o las 4 proteínas (campos 6 a 10), posición de las proteínas marcadoras (M) y tamaño en kDa, según se indica. B) Lisado celular para células que expresan VP5, VP2, VP3, VP7 (campos 1-4) y VLP parcialmente purificadas (campo 5). C) Tabla que muestra el locus de inserción y el promotor vírico usado para la expresión de cada proteína del BTV. D) EM con tinción negativa de inmuno-oro (para VP5) que muestra VLP del BTV purificadas.

La figura 7 muestra placas cristalinas formadas en la sobreexpresión de CCT5. Se muestran agregados de proteína cuadrilaterales en medio de cultivo de infecciones muy tardías con baculovirus que expresa CCT5.

La figura 8 muestra la expresión de CCT en células de insecto. A) Lisado celular teñido con Coomassie de células infectadas con baculovirus que expresa CCT1-CCT8 (campos 1-8, respectivamente), solo células (campo 9), o baculovirus que co-expresa 7 subunidades de CCT (campo 10). B) Western blot de gel duplicado usando antisuero de CCT anti-ratón policlonal. C) Cuadros que muestran diferentes loci genéticos y promotores usados para expresar cada una de las subunidades de CCT.

Ejemplos

- El sistema de expresión de baculovirus tiene un potencial ya establecido para la producción de grandes cantidades de proteínas eucariotas correctamente plegadas para estudios enzimáticos y estructurales. Sin embargo, cada vez está más claro que muchas proteínas, si no la mayoría de ellas, son activas dentro de las células como complejos constituidos por los productos de varios genes distintos. Dada la aceleración al ritmo del descubrimiento de la estructura de las proteínas, existe la necesidad real de establecer sistemas para la producción y purificación rápida y fiable de complejos de proteínas. Esto es particularmente cierto para los complejos más grandes que requieren la expresión simultánea y el plegamiento y procesamiento eucariotas de muchas subunidades de proteína.
- 10 Previamente, los inventores han desarrollado vectores de transferencia de baculovirus capaces de expresar 2, 3, 4 y 5 proteínas del mismo genoma de baculovirus. El propósito principal de los inventores en los estudios previos fue producir un sistema capaz de sintetizar grandes cantidades de complejos de proteínas víricas que contuviesen cantidades no equimolares de proteínas codificadas por virus para estudios estructurales y enzimáticos. Una de las observaciones de la experiencia con estos sistemas es que los baculovirus individuales que expresan múltiples
- 15 genes, son mucho más eficientes en la formación de los complejos de proteína deseados, que la co-infección de células de insecto con múltiples baculovirus que expresan genes individuales. En el presente estudio, los inventores han usado nuevas tecnologías para aprovechar esta observación para la producción de baculovirus recombinantes que expresen múltiples proteínas para complejos de proteínas de mamífero biológicamente relevantes.
- 20 En particular, los inventores han adaptado y mejorado nuevas tecnologías de diseño de cromosomas bacterianos para la producción rápida y eficiente de baculovirus recombinantes que expresan simultáneamente múltiples proteínas. Los nuevos sistemas desarrollados son 30 veces más eficientes que los procesos convencionales, y permiten la inserción de rutina de genes en cualquier locus dentro del genoma del baculovirus. Estos estudios han permitido la identificación de 7 nuevos loci genéticos dentro del genoma del baculovirus que permiten la expresión
- 25 de alto nivel de proteínas recombinantes. Además, los inventores han demostrado que pueden realizarse múltiples rondas iterativas de recombinación que permiten la generación de genomas de virus que expresan múltiples proteínas en un complejo de inserciones de genes individuales separados. Como ejemplos, los inventores han expresado complejos de proteínas de VLP para los virus de la influenza A (subtipo H7) y la fiebre catarral (serotipo 1), así como el CCT del complejo de chaperonas de mamífero de 8 subunidades (TCP), que es un punto central para
- 30 estudios del cáncer.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

- Se logran inserciones de genes individuales de locus múltiples en *E. coli* usando recombinación lambda red. La invención incluye el uso de loci de baculovirus que no se han usado previamente para la expresión de proteínas múltiples, y la incorporación de marcadores seleccionables que pueden ser eliminados del genoma del baculovirus y reutilizarse posteriormente. A diferencia de otros sistemas, los genes de proteínas recombinantes no están flanqueados por secuencias de repetición, mejorando su estabilidad genética.
- 40 Los vectores de transferencia contienen una región de AcMNPV para la recombinación homóloga diana, un casete de expresión (promotor de AcMNPV, polienlazador, señal de poliadenilación) y un casete de selección bacteriano. El promotor de AcMNPV usado es de los genes víricos tardíos (por ejemplo, p35) o muy tardíos (por ejemplo, polihedrina, p10). El casete de selección bacteriano consiste en el sitio LoxP mutante - marcador seleccionable bacteriano - sitio Lox P mutante. Los sitios Lox P mutantes son variantes en las variantes LoxP66 y LoxP71 (9). Los
- 45 sitios LoxP para cada marcador seleccionable se diseñan de tal forma que en la recombinación, el marcador es eliminado, destruyendo el sitio LoxP que queda. Cada marcador seleccionable tiene diferentes brazos mutantes de LoxP, de manera que no se producirá la recombinación entre diferentes genes marcadores seleccionables insertados en el mismo baculovirus.

50 Elección del sistema usado para la expresión de locus múltiples de proteínas recombinantes.

- El plan de investigación original implicó el uso de recombinación homóloga en células de insecto, o el procedimiento alternativo de recombinación ET en *E. coli*, para permitir la inserción eficiente de casetes de expresión para proteínas recombinantes en diferentes loci dentro del genoma de baculovirus. Los datos preliminares de los
- 55 inventores habían sugerido que la linealización del vector de transferencia dio como resultado un aumento significativo de la frecuencia de recombinación (hasta ~30 %) en un locus (p10) que no tuvo selección positiva diferente de la proteína recombinante producida. Al inicio del proyecto de investigación, se consideraron los dos sistemas (recombinación ET y recombinación en células de insecto) con respecto a su reproducibilidad y el tiempo transcurrido para completar la inserción de un gen recombinante en un locus particular y verificar la expresión de la

proteína resultante. En cuando al tiempo transcurrido para cada ronda de expresión, el sistema de recombinación ET fue más rápido, principalmente debido al tiempo reducido necesario para preparar el genoma del baculovirus para la inserción de genes en un segundo locus genético en el baculovirus. Además, fue posible diseñar un procedimiento que permitiera la confirmación de las inserciones genéticas independientemente de la expresión del transgen, y por lo tanto, la necesidad de desarrollar el virus en células de insecto para verificar que la expresión fue menos crítica que para el sistema basado enteramente en células de insecto. En segundo lugar, aunque es posible co-introducir un marcador con genes insertados en el sistema de baculovirus, el número de dichos marcadores es limitado y cada uno puede usarse solo una vez. Puesto que uno de los objetivos del proyecto era expresar el complejo de CCT de ratón (TCP1) (8 subunidades), se adoptó el enfoque de recombinación ET como la prioridad de investigación en una fase temprana, ya que este sistema fue más rápido y más capaz de acomodar inserciones genéticas múltiples.

EJEMPLO 1

Desarrollo de reactivos que permiten la selección eficiente de recombinantes ET.

Los experimentos iniciales usando el procedimiento ET fueron decepcionantes. Se realizaron experimentos en los que se insertó un gen indicador (luciferasa) en un cromosoma artificial bacteriano que llevaba el genoma de AcMNPV completo (bácmido), y se seleccionó un gen de resistencia a cloranfenicol que se integró conjuntamente con el indicador de luciferasa. Aunque se recuperaron colonias bacterianas resistentes a cloranfenicol, el análisis posterior reveló que no contenían el bácmido modificado correctamente con el indicador de luciferasa. Se obtuvieron resultados similares cuando el indicador, que fue diseñado para expresarse solo en células de insecto en presencia de AcMNPV replicante, se cambió por GFP. Sin embargo, cuando la construcción de GFP se usó para la recombinación en *E. coli*, sin selección con cloranfenicol, y se preparó ADN del bácmido para la población transformada entera de *E. coli*, entonces este ADN dio como resultado algunos foci fluorescentes cuando se transfeció en células de insecto (*Sf21*). Estos datos sugirieron que el problema no estaba en la propia recombinación, sino en la selección post-recombinación de las bacterias que contenían la inserción. Para superar estos problemas, los inventores diseñaron un nuevo casete de selección que incorporó un sistema marcador bipartita basado en el fragmento *LacZ α* y el gen de resistencia a zeocina flanqueado por sitios de recombinación *LoxP* modificados (figura 1A). Mediante el uso de este sistema, se añadió suficiente zeocina a las placas de selección para reducir, pero no para eliminar, el crecimiento de la colonia de fondo, y se seleccionaron los recombinantes en base al fenotipo de colonias azules en presencia de IPTG y X-gal. Para evaluar la eficiencia relativa de la recuperación de recombinantes usando los sistemas de selección de cloranfenicol (*cat*) y bipartita, los inventores realizaron un experimento donde *E. coli* competente por recombinación que contenía bácmido no modificado se electroporaron con 30 ng (~12,5 fmoles) del casete de selección bipartita o basado en cloranfenicol (figura 1B). Dado que un sistema ideal para la incorporación de secuencias que codifican para proteínas extrañas no implicará un análisis por PCR repetido del gen insertado, los inventores también compararon la eficiencia de la recombinación entre el ADN amplificado por PCR, es decir, la rutina para la recombinación ET, y ADN purificado en gel y liberado por enzimas de restricción. Se diseñaron cebadores de PCR de tal forma que los extremos de los productos de PCR correspondieran a los extremos de los fragmentos liberados por las enzimas de restricción.

La selección bipartita dio como resultado un aumento de 20 veces el número de colonias positivas en comparación con la selección con solo cloranfenicol, cuando el fragmento de ADN que se recombina se generó por PCR, y un aumento de 30 veces cuando se liberó por la digestión por enzimas de restricción del ADN plasmídico (figura 1B). Estas diferencias fueron significativas (prueba de t, $p = 0,03$). Para la selección con cloranfenicol, no hubo diferencia entre el número de colonias recuperadas por PCR y el ADN generado por enzimas de restricción. Sin embargo, para la selección bipartita, el número medio de colonias fue cuatro veces mayor para el ADN liberado por enzimas de restricción, en comparación con el ADN amplificado por PCR (prueba de t, $p = 0,05$). Para confirmar que los recombinantes de la nueva selección bipartita eran genuinos, representando al bácmido modificado que contenía la construcción de expresión insertada, se realizó una PCR en el ADN de bácmido purificado de colonias positivas. Se diseñó un cebador para una secuencia dentro del marcador de resistencia a zeocina y un cebador dirigido hacia una secuencia presente solo en el ADN de bácmido que flanqueaba el sitio de inserción correcto y no en el ADN de transferencia. Por lo tanto, el producto de PCR solo se producirá donde la recombinación haya ocurrido entre el ADN lineal usado para la recombinación y el bácmido. Se ensayaron 12 muestras de ADN de bácmido separadas usando este procedimiento (figura 1C, campos 1-12), y todas fueron positivas para el diagnóstico del producto de PCR para la recombinación correctamente dirigida. Por el contrario, ni el ADN de bácmido solo, ni el ADN plasmídico que contenía el fragmento de ADN usado para la recombinación, fueron capaces de actuar como molde para generar el producto de PCR (figura 1C, campos 14 y 15, respectivamente). Para confirmar además que la recombinación había dado como resultado la recuperación de baculovirus recombinantes infecciosos, los mismos 12 clones de bácmido positivos para PCR se transfecieron en células *Sf21* y se pasaron dos veces, después se ensayó la actividad de

luciferasa de *Renilla* en células infectadas con cada uno de los recombinantes 48 horas posteriores a la infección. Las células infectadas con cada uno de los 12 virus recombinantes tuvieron actividades de luciferasa de *Renilla* que estuvieron 106 veces por encima del fondo (figura 1D). En base a estos datos, los inventores procedieron a usar la selección bipartita para investigaciones adicionales.

5

EJEMPLO 2

La eliminación mediada por Cre del marcador seleccionable permite múltiples rondas de recombinación con la misma selección bipartita.

10

Para expresar complejos de proteína con múltiples subunidades diferentes usando inserciones de locus individuales, el sistema de marcador bipartita se diseñó de tal forma que el casete de selección fuese flanqueado por sitios LoxP modificados. Estos sitios incorporan tanto las mutaciones *lox66* como *lox71*, que limitan la recombinación mediada por Cre a una única ronda (1), y una mutación en el espaciador que reduce la homología a sitios loxP de tipo silvestre. Por lo tanto, la incubación del báculo modificado con Cre recombinasa da como resultado la eliminación del marcador seleccionable bipartita y la inactivación del sitio de recombinación *lox*, pero deja atrás el casete de expresión de baculovirus (figura 2A). Para confirmar que esta estrategia puede usarse con éxito para diseñar múltiples inserciones en el ADN de báculo, se usó la recombinación con Cre para eliminar el marcador bipartita del báculo en el que se había insertado el indicador de luciferasa de *Renilla*. Se consiguió la recombinación en *E. coli* usando la línea celular EL350 (2), que tiene tanto un profago lambda integrado que expresa *exo*, *bet*, y *gam* bajo el control del promotor λ P_L regulado por la temperatura, como Cre recombinasa, bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Las células EL350 que contenían tres de los báculos modificados para incorporar la inserción de selección luciferasa de *Renilla*-bipartita (figuras 1A-1D), se indujeron con arabinosa y después se extendieron en placas que contenían kanamicina, para seleccionar el báculo, y X-gal, para seleccionar para colonias que habían perdido el marcador seleccionable por recombinación mediada por Cre. Se purificó el ADN de báculo de cuatro recombinantes putativos, y se confirmó la recombinación mediada por Cre por PCR, usando cebadores que flanqueaban los marcadores seleccionables (figura 2B). Los cuatro recombinantes tenían productos de PCR consistentes con el tamaño esperado de la recombinación exitosa por Cre. Esto se confirmó adicionalmente por la secuenciación a través del sitio *loxP* modificado de los 4 recombinantes (figura 2C). Los recombinantes contenían un sitio *loxP* inhabilitado que incorporaba las mutaciones *loxP71* y *loxP66*, y no era competente para rondas adicionales de recombinación. Para confirmar además que los recombinantes de báculo mediados por Cre continuaban siendo viables en células de insecto, el ADN de báculo se transfirió en células de insecto, y la actividad de luciferasa se ensayó después de dos pases, como anteriormente. Todos los recombinantes tenían una actividad de luciferasa de *Renilla* que era equivalente a los báculos precursores antes de la recombinación por Cre (figura 2D).

35

EJEMPLO 3

Identificación de loci genéticos en el genoma de baculovirus adecuados para la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas.

40

A pesar del extenso trabajo de la expresión de proteínas que se ha realizado en el sistema de expresión de baculovirus, la mayor parte de la expresión se ha centrado en el reemplazo de los genes de polihedrina o p10 para expresar proteínas recombinantes. Relativamente poca bibliografía describe el uso de loci alternativos para la expresión de proteínas recombinantes. Para ensayar si la selección puede usarse eficientemente en diferentes loci genéticos de baculovirus, se realizó una segunda ronda de recombinación en uno de los báculos que contenían ya el gen de luciferasa de *Renilla*. En estos experimentos, el mismo terminador de promotor de polihedrina-luciferasa de luciérnaga-polihedrina, se insertó independientemente en un total de 13 loci genéticos diferentes (*ctx*, *orf11*, *egt*, *orf23*, *v-fgf*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *chiA*, *pe*, *odv-e18* y *odv-e56*), generando baculovirus de doble expresión para proteínas de luciferasa de *Renilla* y de luciérnaga (figura 3A). Se seleccionaron loci como sitios para la inserción en estos experimentos, determinando qué genes de baculovirus no son esenciales para el crecimiento del virus en cultivo tisular, y si la disposición de los genes de baculovirus en loci particulares favorecía la inserción de un casete de expresión adicional. Sin embargo, se hicieron algunos cambios adicionales en algunos loci, en particular cambios que dieron como resultado la inactivación génica de genes de baculovirus particulares (figura 3B). Se pasaron dos veces virus recombinantes en células de insecto *Sf21*, y en el tercer pase, se cosecharon células 48 horas posteriores a la infección, se lisaron y se ensayaron para determinar la actividad de luciferasa de *Renilla* y de luciérnaga. Se usó la actividad de luciferasa de *Renilla* como un marcador para la replicación vírica y la expresión de proteínas, ya que todos los recombinantes tenían el mismo promotor p35 dirigido por el casete de luciferasa de *Renilla* en el locus p10. La expresión de la luciferasa de luciérnaga en cada nuevo locus se comparó con un virus

55

que llevaba el gen de luciferasa de luciérnaga en el locus de polihedrina y el mismo gen de referencia de luciferasa de *Renilla*. De los 13 loci ensayados, 9 tenían actividades de luciferasa de *Renilla* que estaban al menos 10^5 veces por encima del fondo, y de estos, 8 (*ctx*, *egt*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *chiA*, *odv-e18* y *odv-e56*) tenían actividad de luciferasa de *Renilla* que estaba en o por encima de la actividad medida solo para la luciferasa de *Renilla* precursora, 5 y controles de luciferasa de luciérnaga del locus de polihedrina (figura 3C). Los cuatro loci (*orf11*, *v-fgf*, *pe* y *orf23*) que dieron como resultado un virus que dio actividad de luciferasa de *Renilla* que estaba dentro de 10 veces la actividad de fondo, se excluyeron del análisis adicional. Para los virus restantes, la actividad de luciferasa de *Renilla* se usó como una referencia para normalizar la actividad de luciferasa de luciérnaga y obtener una medida de la expresión relativa de la luciferasa de luciérnaga de cada locus (figura 3D). 7 loci (*ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*) tenían una actividad de luciferasa de luciérnaga que era al menos 10^6 veces mayor que el fondo, y similar a cuando el mismo gen se expresó a partir del locus de polihedrina (figura 3D). Dos virus (*chiA* y *odv-e18*) tenían altos niveles de luciferasa de *Renilla*, pero una expresión relativamente deficiente de luciferasa de luciérnaga.

Este estudio revela que es posible la expresión de alto nivel de proteínas extrañas de varios loci genéticos dentro del 15 genoma de baculovirus, e identifica siete loci (*ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*), además de polihedrina y p10, que dan buena expresión. De estos sitios, *39k*, *orf51* y *gp37* son inserciones en el ADN que flanquea la región codificante del gen, y no interrumpen directamente la expresión de las proteínas. Por el contrario, se espera que las inserciones en cada uno de *ctx*, *egt*, *iap2* y *odv-e56* impidan la expresión de las proteínas correspondientes de estos genes. Los primeros tres de estos genes se han descrito previamente como no esenciales para el crecimiento del 20 virus en cultivo celular (3-6). Se ha indicado también el truncamiento de la proteína ODV-E56 (7).

De los loci que no dieron buena expresión del indicador de luciferasa de luciérnaga, cuatro (*orf11*, *v-fgf*, *pe* y *orf23*) también dieron como resultado una expresión reducida de la proteína del marcador de luciferasa de *Renilla* que estaba presente en todos los recombinantes. Puesto que el punto central del estudio era identificar sitios que fueran 25 adecuados para la inserción de construcciones de expresión de promotor muy tardío, no se investigó la razón precisa de esta expresión reducida. Las posibilidades incluyen efectos específicos del locus sobre la replicación o transcripción del virus, y la alteración de elementos esenciales del promotor o potenciador para los genes flanqueantes. La expresión de bajo nivel de la luciferasa de luciérnaga en los virus de inserción *chiA* y *odv-e18*, fue inesperada por diferentes razones. Otros informes han registrado la inserción de casetes de expresión de proteínas recombinantes en el locus *chiA* (8,9). Es posible que el nivel de expresión reducido observado con el gen de 30 luciferasa de luciérnaga en este locus en estos experimentos se deba a los efectos sobre los genes que flanquean la inserción. Para *odv-e18*, los informes recientes que usan el mismo virus mutante han sugerido que esta proteína es esencial para la producción de virus gemados y el movimiento de célula a célula (10,11). Estos estudios se basaron en mutantes en los que hubo una delección dentro de la secuencia codificante de *odv-e18* y el gen flanqueante aguas 35 arriba. En los experimentos, cuando se inactivó *odv-e18* por la mutación de ATG de la secuencia codificante en GAT seguida de la inserción del casete de luciferasa de luciérnaga en este punto en el gen, fue posible recuperar virus infecciosos. La expresión de la luciferasa de *Renilla* sobre el tercer pase equivalente a la expresión en el virus precursor, sugiere que no hubo alteración de la capacidad de este virus mutante para replicarse. Sin embargo, dada la reducción de ~2 logaritmos en los niveles de la luciferasa de luciérnaga en comparación con el virus sin esta 40 mutación, no es posible excluir la posibilidad de que una pequeña población del virus en la que la mutación se reparó, estuviese complementando una segunda población que expresaba el gen indicador.

EJEMPLO 4

45 Expresión de complejos de proteínas usando expresión de baculovirus de múltiples locus

El ejemplo 3 se centró en el uso de genes indicadores para evaluar cuantitativamente el potencial de diferentes loci de baculovirus para expresar una proteína recombinante. Para establecer si es posible expresar y recuperar 50 complejos de proteínas recombinantes, tres complejos específicos fueron dirigidos con diferentes números de subunidades de proteína. Se produjeron partículas pseudovíricas para el subtipo H7 de la influenza (A/foca/Mass/1/80) por co-expresión de las proteínas víricas M1 y HA (complejo de 2 proteínas), y para el serotipo 1 del virus de la fiebre catarral (BTV) por co-expresión de VP2, VP3, VP5 y VP7 (complejo de 4 proteínas). Además, los inventores dirigieron la expresión de las 8 subunidades del complejo de chaperonas de CCT de ratón que se usará para otros estudios funcionales y estructurales.

55

VLP de influenza A

Para estos experimentos, todos los genes de la influenza eran de la cepa adaptada de ratón SC35M derivada del aislado H7N7 (A/foca/Mass/1/80), obtenida de investigadores en la Universidad Phillips-Marburgo, Alemania.

- Para ensayar si el sistema de expresión de locus múltiples era capaz de producir complejos de proteínas con dos proteínas, la secuencia codificante para la proteína M1 de influenza A se insertó inicialmente en locus *egt* bajo el control del promotor de polihedrina. Para la comparación, se insertó el mismo gen en un vector de expresión de baculovirus convencional (pAc-YM1) que se dirigía al locus de polihedrina. Después de la recombinación, ambos baculovirus resultantes expresaron la proteína M1. Los niveles de expresión de la proteína de los loci de polihedrina y *egt* eran significativamente mayores que para cualquier otra proteína vírica o celular en células infectadas por baculovirus cuando se evaluaron por SDS-PAGE, teñidas con azul de Coomassie (figuras 4A y 4B).
- 10 Para generar un virus doble que expresaba tanto M1 como HA, el casete de selección bacteriano se eliminó del báculo que expresaba M1 por recombinación por Cre, y el gen HA de la misma cepa de influenza (A/foca/Mass/1/80) se insertó en el locus p10 en una segunda ronda de recombinación ET. La co-expresión de M1 y HA del virus resultante se confirmó por SDS-PAGE y análisis Western blot como anteriormente (figura 5A). Además, se aislaron VLP de influenza del medio de cultivo de las células infectadas, se purificaron por ultracentrifugación de gradiente de densidad y se visualizaron por análisis de EM de tinción negativa (figura 5B). Para garantizar que las VLP visualizadas eran por supuesto de la influenza, las partículas se marcaron por inmuno-oro usando anticuerpos específicos para HA de la influenza (figura 5C).

Considerados en conjunto, estos datos eran buena evidencia de que podía usarse con éxito el enfoque de locus múltiples para la expresión de proteínas recombinantes, y que era práctico producir tal virus recombinante a través de dos rondas de inserción del sistema de marcador seleccionable bipartita. Las VLP de la gripe se han ensayado ampliamente por otros, y se ha mostrado que son inmunógenas en ratones y hurones. Este procedimiento para construir las VLP tiene la ventaja de que es posible tener el genoma de baculovirus con M1 ya pre-integrada y lista para la expresión. Por lo tanto, para hacer VLP, solo debería ser necesario realizar una única ronda de recombinación para añadir el gen HA de cualquier subtipo de la gripe emergente que se requiera para la producción de la vacuna. Para vacunas de la gripe basadas en VLP, esto simplificará la clonación necesaria y aumentará potencialmente la velocidad con la que pueden obtenerse nuevos tipos de VLP.

VLP del BTV1

A diferencia de la influenza, cuando pueden formarse VLP por la expresión de solo dos proteínas, las VLP del BTV requieren la expresión coordinada de cuatro proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5 y VP7). Para demostrar adicionalmente la utilidad del nuevo sistema para recombinación, se produjeron virus que expresaban cada proteína individualmente y la combinación de las cuatro proteínas estructurales del BTV (figuras 6A-6C). Una de las ventajas del nuevo sistema, es que los virus que expresan proteínas individuales y proteínas múltiples, pueden hacerse a partir del mismo conjunto de vectores de transferencia. Esto facilita la producción de virus control que expresan proteínas individuales que actúan como marcadores para la posición de las proteínas co-expresadas en el complejo completo. Para las VLP del BTV se usó un conjunto diferente de loci de los usados en el ejemplo de la influenza (figura 6C). Además, el nuevo sistema se combinó con el báculo inactivado genéticamente *orf1629* descrito por Zhao *et al.*, (12), para permitir el uso de un vector de transferencia convencional en el locus de polihedrina que expresa una de las subunidades del complejo. La formación de VLP se confirmó por la morfología de las partículas bajo EM de tinción negativa, combinada con la marcación con inmuno-oro para una de las proteínas de la cápside exterior (VP5) (figura 6D).

CCT de ratón

La aplicación de la presente invención no se limita a la formación de partículas pseudovíricas. De hecho, dado que muchas proteínas celulares están presentes en las células como complejos con más de una subunidad, la formación eficiente de estos complejos tiene aplicación en una gama de campos. Para demostrar la utilidad del sistema para otros estudios, se eligió el complejo de chaperonas CCT. Este complejo tiene implicaciones en la investigación del cáncer, y con 8 subunidades, representa un desafío significativo para la expresión de proteínas. Por supuesto, no habría sido posible expresar este complejo en el sistema de baculovirus sin los vectores y procedimientos de la presente invención. Se construyeron ocho vectores de transferencia, expresando cada uno una de las subunidades para el CCT de ratón, y dirigido cada uno a un locus diferente, identificado en el ejemplo 3 anterior. Estos se usaron para generar virus recombinantes que expresaban cada subunidad en solitario y combinaciones de subunidades. Para una de las subunidades (CCT25), se observó un fenotipo inusual cuando la proteína se sobreexpresó en las células. Se observaron agujas cristalinas en el interior de las células y, después de la infección, cuando las células se habían disuelto, se observaron placas cuadrilaterales de material cristalino en el medio de cultivo (figura 7). Se generó un esquema de purificación para esta proteína, y este se suministró con condiciones de cristalización

preliminares y material de células infectadas para el colaborador para la parte de CCT del proyecto.

Aunque la expresión de algunas de las otras subunidades de CCT dio como resultado agregados visibles en las células después en la infección, ninguna dio como resultado agregados con dicha apariencia regular.

5

Las 8 subunidades de CCT tuvieron expresión de alto nivel (figura 8A), y reaccionaron de forma cruzada con un antisuero policlonal producido para CCT de ratón. Hubo cierta reacción cruzada entre una de las subunidades de CCT de células de insecto endógenas y el anticuerpo policlonal (figura 8B, campo 9). Sin embargo, esta señal endógena solo se co-localizó con 3 subunidades (CCT1, CCT5 y CCT6), que se acumularon a alto nivel en las células infectadas y de esta manera fueron claramente detectables. Las demás subunidades migraron como proteínas de masa molecular ligeramente diferente y, por lo tanto, pudieron distinguirse de las proteínas de las células de insecto basándose en la migración.

10

CONCLUSIONES

15

Para los tres complejos de proteína, hubo claras diferencias en la acumulación de la misma proteína recombinante cuando se expresó en solitario o en presencia de otras proteínas. En casi todos los casos, hubo una reducción en el nivel de expresión de proteínas cuando las múltiples proteínas se expresaron a partir del mismo virus. Esto era de esperar hasta un cierto punto. La competencia por proteínas requeridas para transcripción, el procesamiento del ARN, la traducción y el plegamiento de las proteínas pronosticará que dos genes de baculovirus altamente expresados tendrán menor expresión juntos que por separado. Sin embargo, lo que fue sorprendente tanto para los ejemplos de VLP del BTV como de CCT, fue que la reducción en la expresión de las proteínas fue variable entre los diferentes loci genéticos. Por ejemplo con el BTV, VP2, VP5, VP3 y VP7 dieron como resultado una acumulación significativa y similar de proteínas cuando se expresaron como tales. Sin embargo, al combinarse en un baculovirus individual que expresaba las cuatro proteínas, VP2 y VP3 se acumularon a menores niveles que VP5 y VP7 (figura 6A). Este efecto no puede explicarse por el efecto de la posición de la integración genómica, puesto que tanto en virus individuales como cuádruples, los genes se expresaron a partir de los mismos loci genéticos. Una explicación posible sería que el efecto se debió a los diferentes promotores que se usaron para los diferentes genes. Tanto VP5 como VP7 se expresaron bajo el control del promotor de p10, y VP2 y VP3 estaban bajo el control del promotor de polihedrina. Esto será consistente con un informe en la bibliografía, donde la delección del gen p10 dio como resultado el aumento de expresión del locus 13 de polihedrina. Por lo tanto, se pronosticará que la duplicación del promotor de polihedrina en presencia de dos promotores de p10, reduce selectivamente la expresión de los genes dirigidos por el promotor de polihedrina. Sin embargo, esta no puede ser una explicación completa para el efecto observado en el caso del complejo de CCT. Tanto CCT5 como CCT2 se expresaron a partir del promotor de p10, y dieron altos niveles de estado estable de proteína recombinante cuando se expresaron en solitario (figura 8A y figura 8B, campos 2 y 5). Sin embargo, cuando se combinaron en el mismo virus, la expresión de CCT5 se redujo sustancialmente en comparación con CCT2 (figura 8A y figura 8B, campo 10). A partir de estos datos, otras secuencias que actúan en la posición *cis* presentes en el locus p10 pueden estar contribuyendo a la expresión relativa mejorada de CCT2 y VP5 del BTV, que se insertaron en este locus. La expresión aparente relativamente baja de HA de la influenza al insertarse en el mismo sitio, puede estar más relacionada con el cambio de esta proteína en el ER, en lugar de los efectos de la transcripción. Tanto CCT2 como VP5 se acumulan en el citoplasma.

20

25

30

35

40

45

Los inventores han mejorado la eficiencia del sistema de recombinación ET como se aplica a baculovirus, hasta el punto de que puede usarse para la inserción de rutina de casetes de expresión para proteínas recombinantes. Además, se han identificado siete loci genéticos (*ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*) que pueden usarse para la expresión de alto nivel de proteínas, y demostraron que pueden ensamblarse complejos de múltiples proteínas usando este sistema, usando tres ejemplos (influenza A, VLP del BTV y complejo de CCT).

REIVINDICACIONES

1. Un vector de transferencia para insertar un gen en un locus genético de una secuencia de baculovirus que comprende:
- 5 un casete de expresión que comprende un promotor eucariota unido operativamente al gen; un casete de selección bipartita flanqueado por secuencias de recombinación LoxP donde dichas secuencias LoxP están modificadas para asegurar que únicamente puede producirse una única ronda de recombinación que comprende:
- 10 (i) una secuencia expresable que codifica un primer marcador seleccionable; y (i) una secuencia expresable que codifica un segundo marcador seleccionable; y secuencias que flanquean los casetes de expresión y de selección bipartita, donde las secuencias corresponden sustancialmente a secuencias del locus genético en la secuencia de baculovirus, permitiendo de este modo la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y el baculovirus.
- 15 2. El vector de transferencia de la reivindicación 1, donde el primer marcador seleccionable es un marcador visual.
- 3 El vector de transferencia de la reivindicación 2, donde el primer marcador es el fragmento *LacZ*alfa.
- 20 4. El vector de transferencia de la reivindicación 1, donde el segundo marcador seleccionable confiere resistencia a un antibiótico.
5. El vector de transferencia de la reivindicación 4, donde el gen resistente a antibióticos confiere resistencia a fleomicina.
- 25 6. El vector de transferencia de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las secuencias que flanquean los casetes de expresión y de selección bipartita corresponden sustancialmente a secuencias de uno cualquiera de los siguientes loci genéticos: *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56* y *p10*.
- 30 7. Un procedimiento para producir un bÁcrido recombinante que comprende:
a. poner juntos un bÁcrido y el vector de transferencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para permitir una recombinación homóloga; y
b. seleccionar un bÁcrido recombinante que comprende el casete de expresión y el casete de selección bipartita.
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 7 que comprende adicionalmente hacer que la recombinación entre las secuencias LoxP eliminen el casete de selección del bÁcrido.
9. Un procedimiento para producir un baculovirus recombinante que comprende producir un bÁcrido recombinante mediante el procedimiento de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, y cultivar una célula eucariota que contenga el bÁcrido de manera que se produzca un baculovirus.
- 40 10. Un bÁcrido recombinante que comprende el casete de expresión y el casete de selección bipartita flanqueado por las secuencias de recombinación LoxP modificadas como se caracteriza en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 45 11. Un baculovirus recombinante que comprende el casete de expresión y el casete de selección bipartita flanqueado por las secuencias de recombinación LoxP modificadas como se caracteriza en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 50 12. Un bÁcrido recombinante de acuerdo con la reivindicación 10 que expresa una pluralidad de proteínas, donde cada proteína se expresa a partir de un locus genético separado del bÁcrido.
13. Un baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 11 que expresa una pluralidad de proteínas, donde cada proteína se expresa a partir de un locus genético separado del baculovirus.
- 55 14. El bÁcrido recombinante de la reivindicación 12 o el baculovirus recombinante de la reivindicación 13, donde la pluralidad de proteínas interactúa para formar un complejo de proteínas.
15. El bÁcrido recombinante o el baculovirus recombinante de la reivindicación 14, donde el complejo de

proteínas es una partícula pseudovírica.

16. El báculo recombinante de la reivindicación 12 o el baculovirus recombinante de la reivindicación 13, donde los loci genéticos separados se seleccionan de entre *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, y *odv-e56*.

5

17. Una célula que contiene un vector de transferencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un báculo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12, 14 a 16, o un baculovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 13 a 16.

10 18. Un procedimiento para producir una o más proteínas que comprende cultivar el báculo recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12, 14 a 16, o un baculovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 13 a 16 en las condiciones adecuadas.

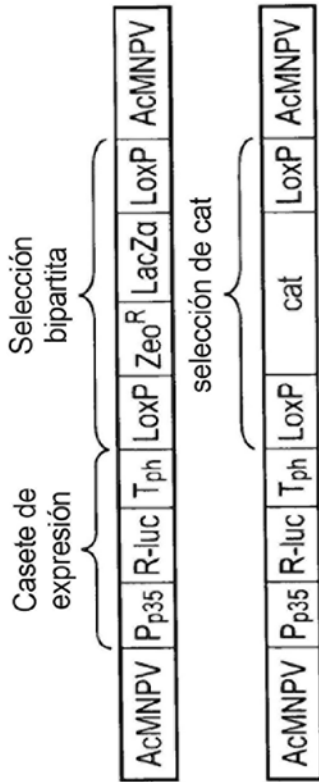


FIG. 1A

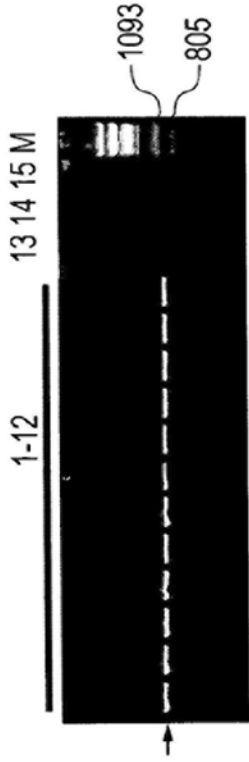


FIG. 1C

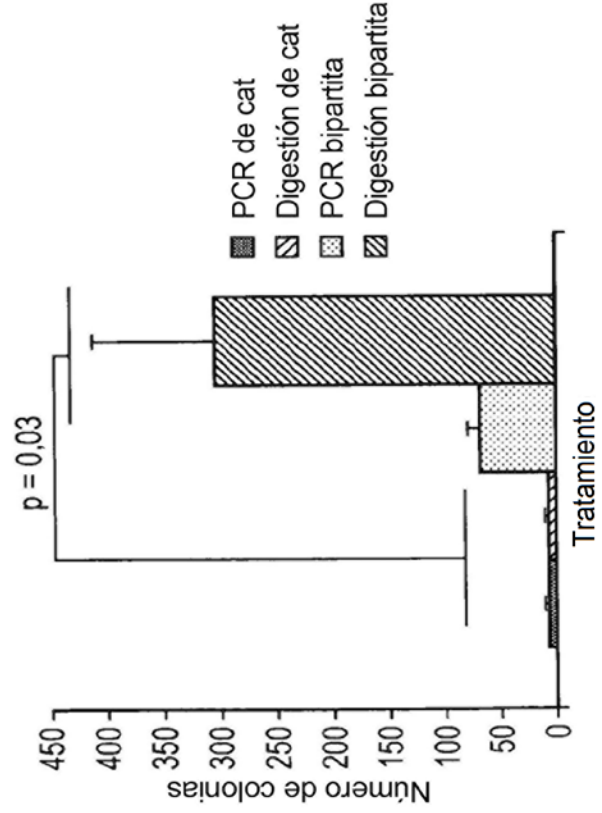


FIG. 1B

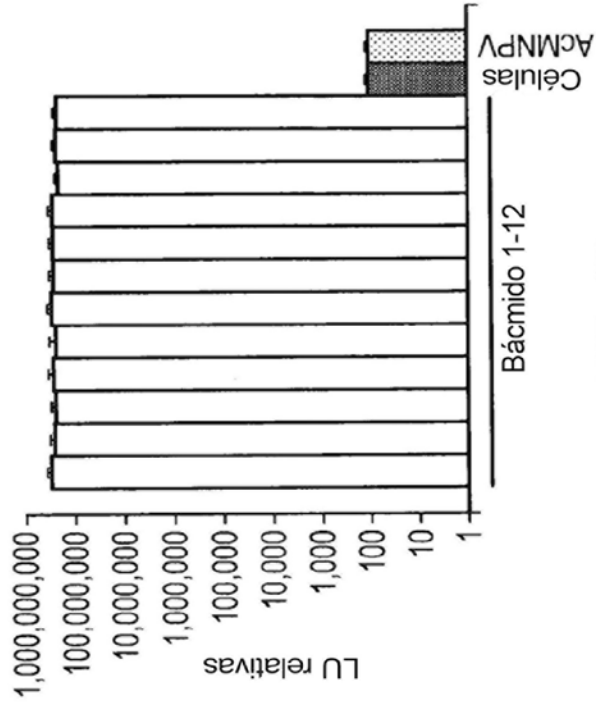


FIG. 1D

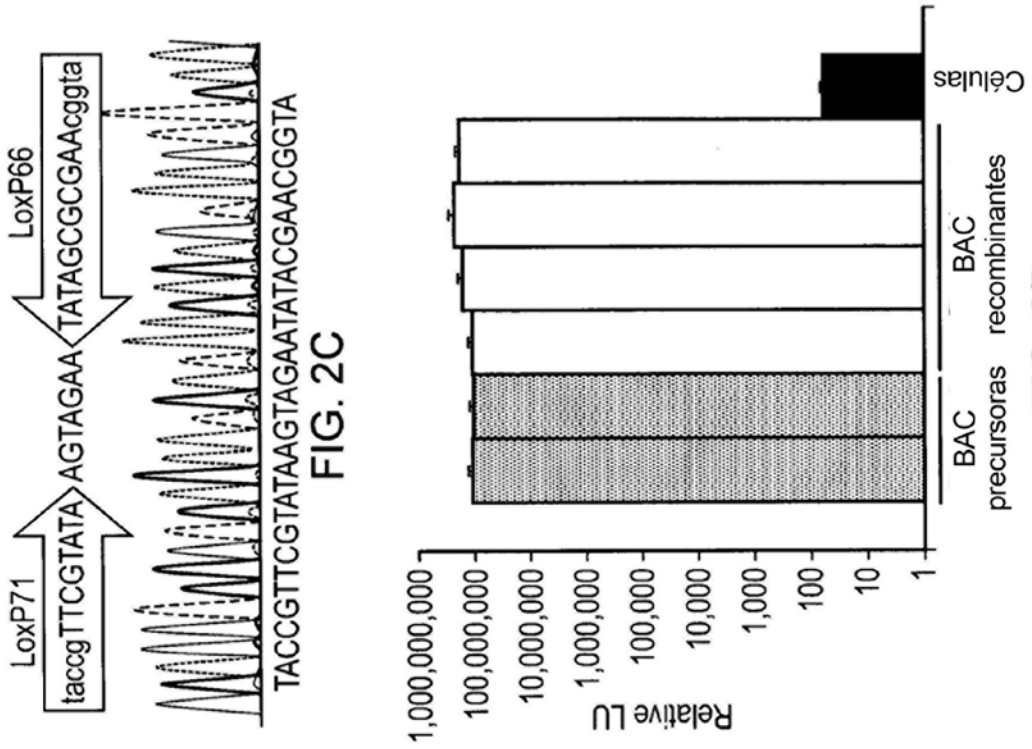


FIG. 2C

FIG. 2D

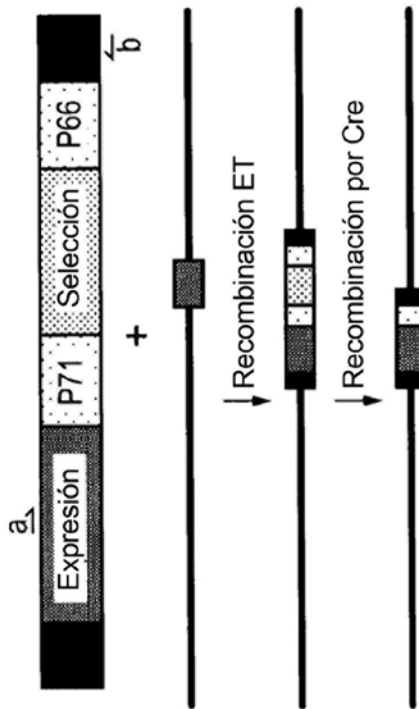


FIG. 2A

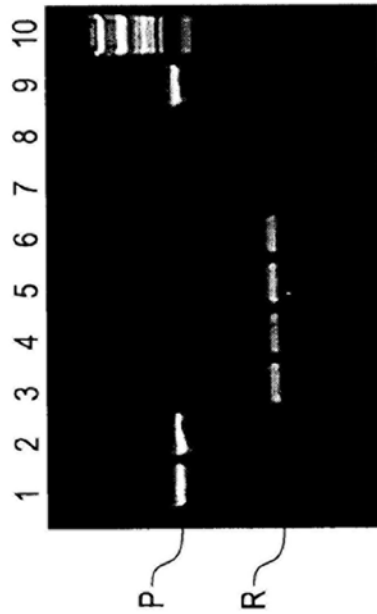


FIG. 2B

Locus	Inserción	Notas adicionales
ctx	2235	KO ATG de proteína CTX
orf11	8456	Inserción en orf
egt	11634-12486	Delección en sec. codificante de EGT
orf23	18755-20243	Inserción en y delección parcial de orf
v-fgf	27586	KO ATG de v-FGF
39k	29226	Inserción entre v-ubiquitina y 39K
orf51	44285	Inserción entre orf51 y orf52
gp37	52275	Inserción entre los genes DNApol y gp37
iap2	61113-61616	Delección en la secuencia codificante de IAP2
chiA	105470-107946	Delección de los genes chiA y v-cath
pe	110903	KO ATG de proteína PE
odv-e18	125153	KO ATG de ODV-E18
odv-e56	130010	Inserción en orf

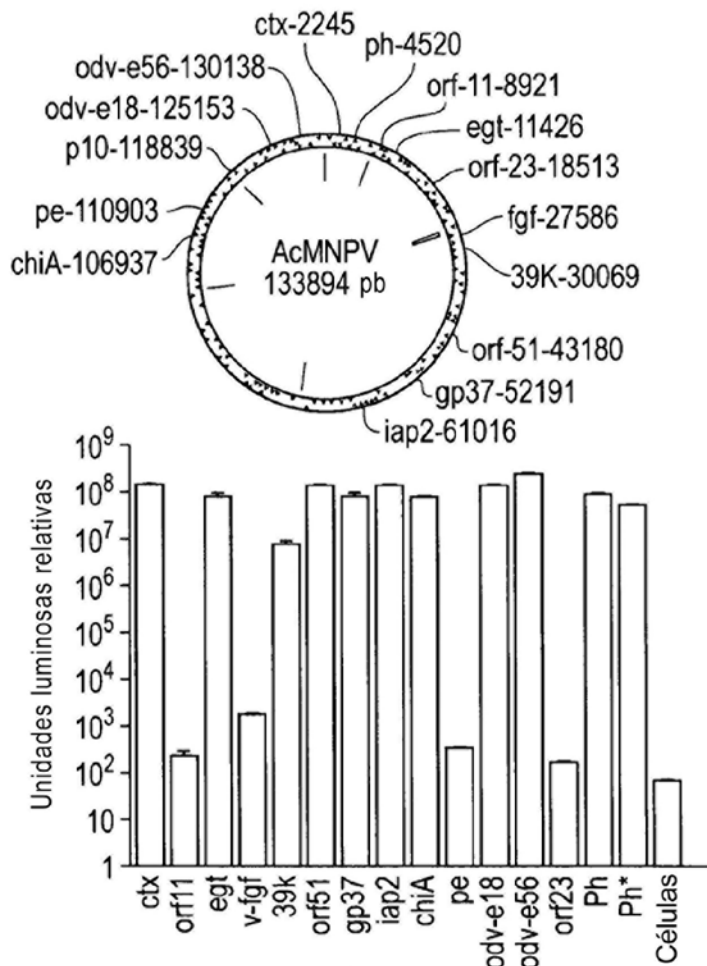


FIG. 3

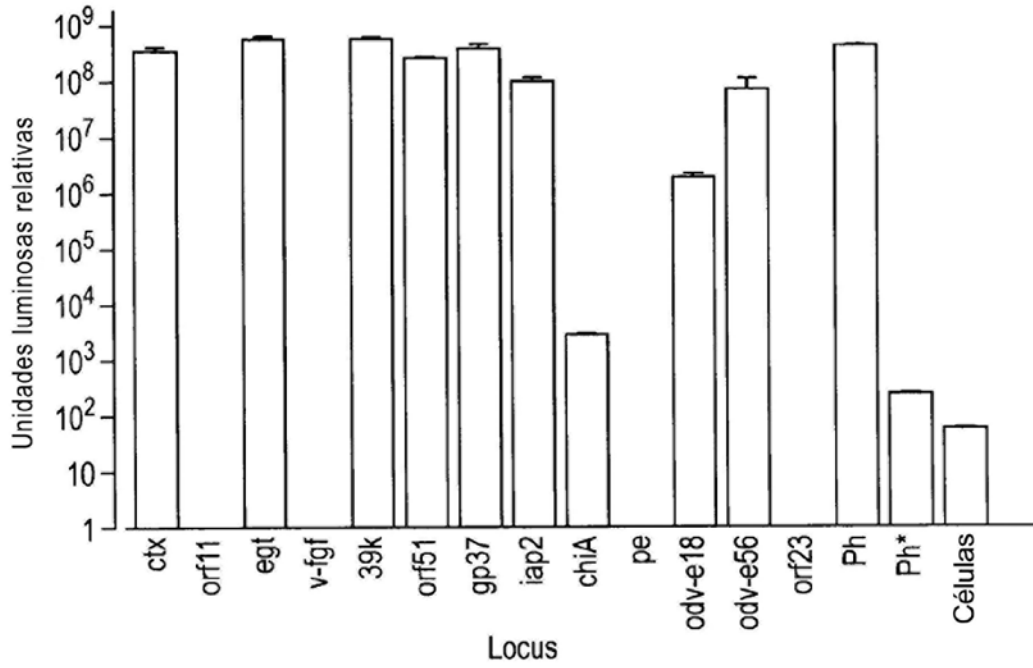


FIG. 3 continuación

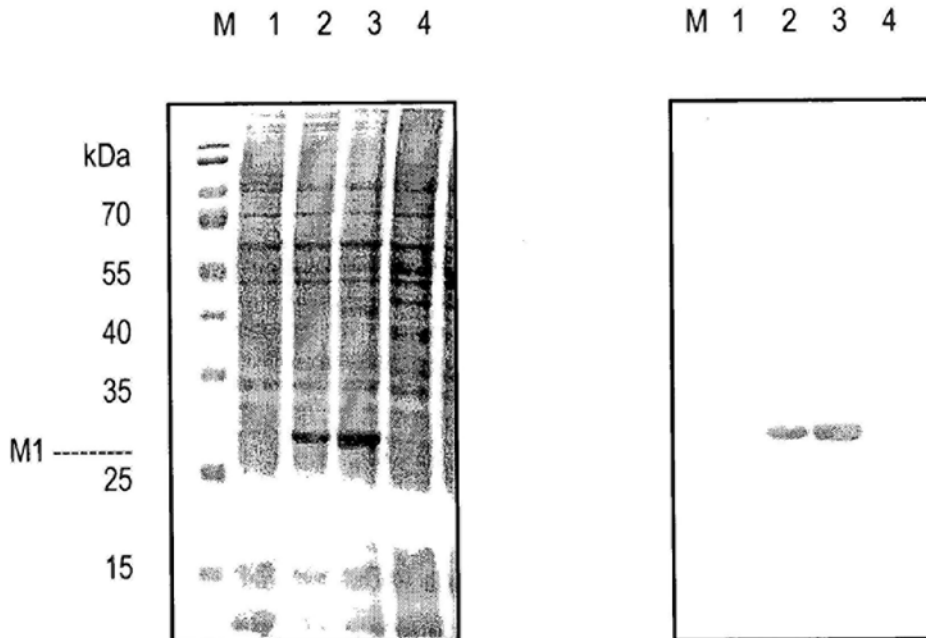


FIG. 4

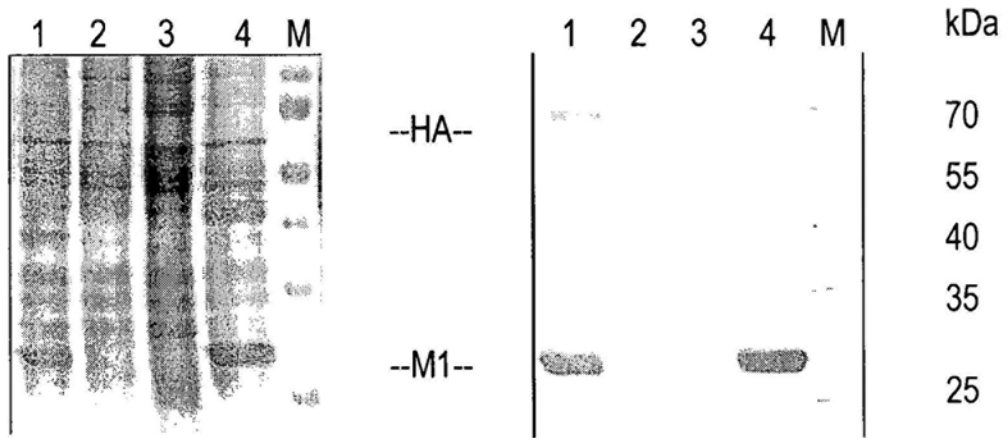


FIG. 5A

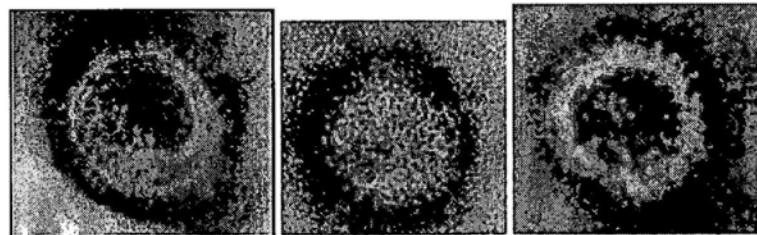


FIG. 5B

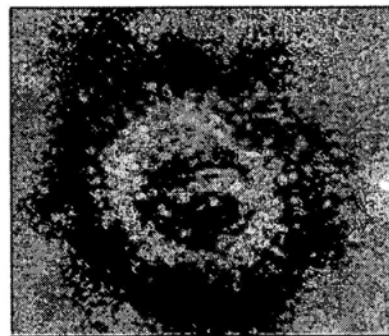


FIG. 5C

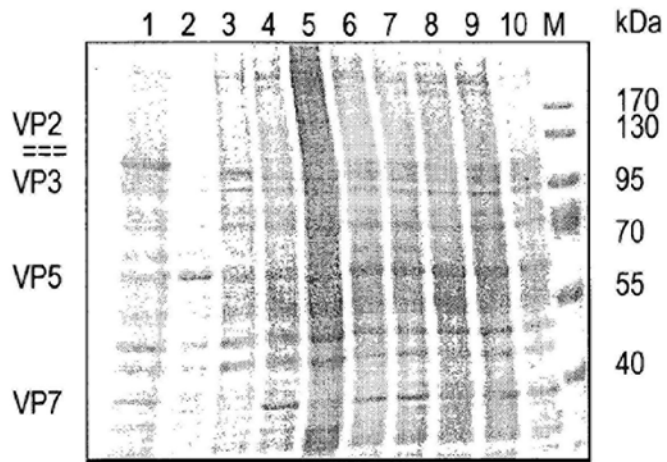


FIG. 6A

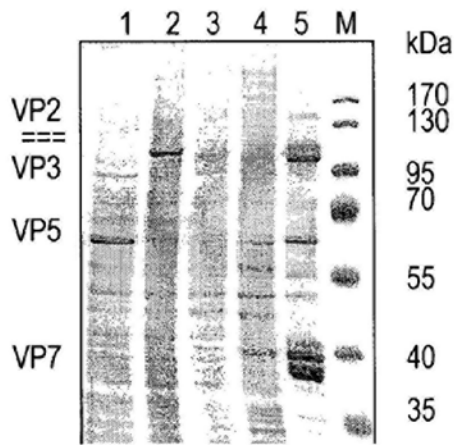


FIG. 6B

Gen	Locus	Promotor
BTV1 VP2	odv-e56	Ph
BTV1 VP5	p10	p10
BTV1 VP3	Polihedrina	Ph
BTV1 VP7	gp37	p10

FIG. 6C

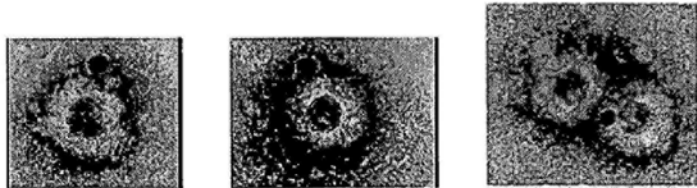


FIG. 6D

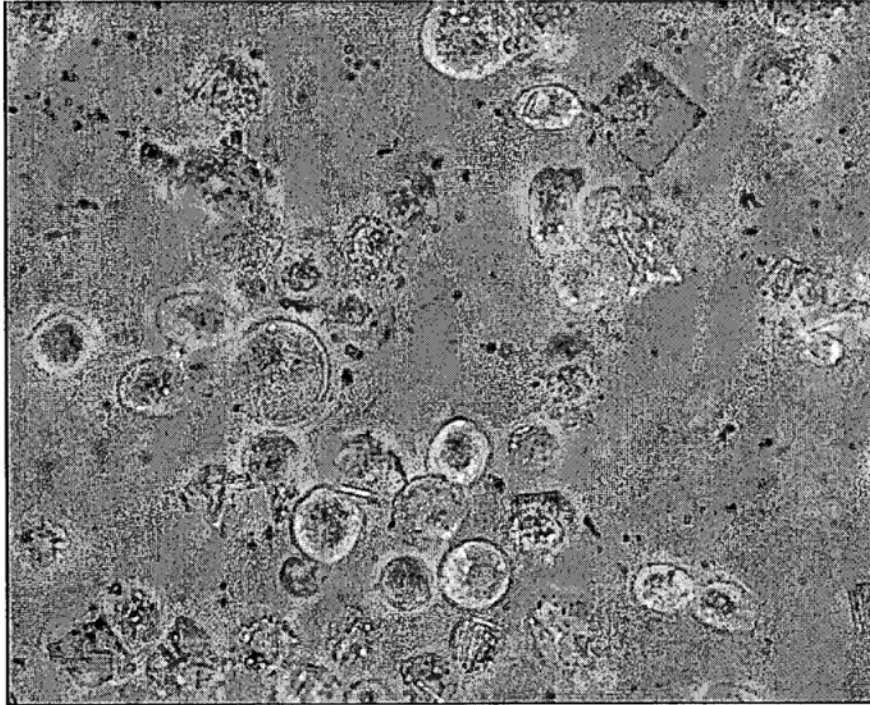


FIG. 7

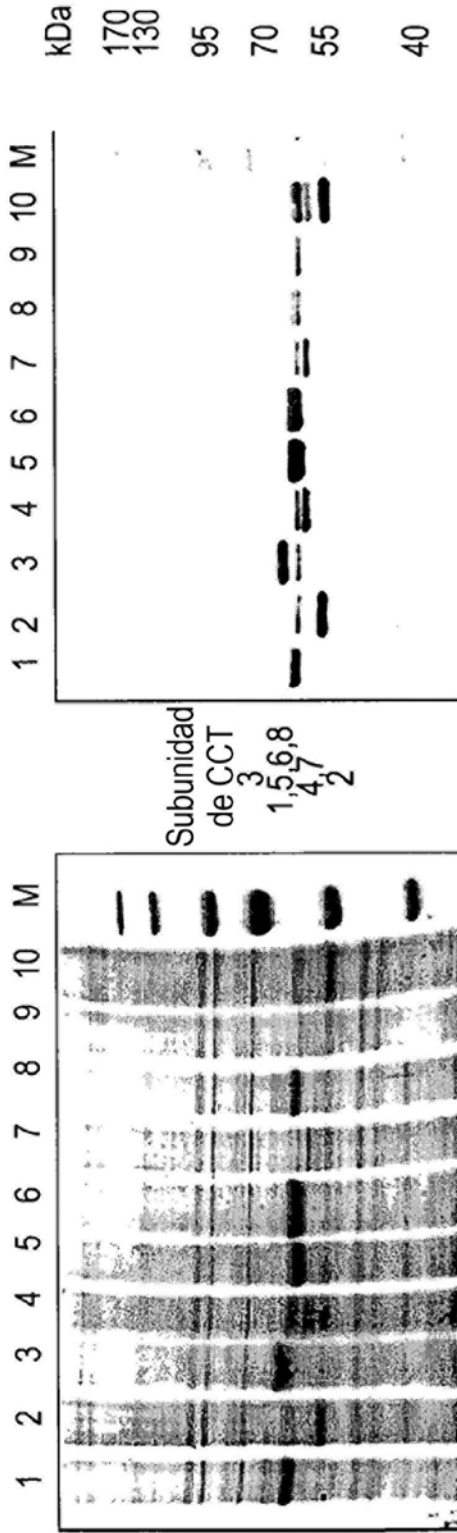


FIG. 8A

FIG. 8B

Gen	Locus	Promotor	Gen	Locus	Promotor
msCCT1	Polihedrina	Ph	msCCT5	gp37	p10
msCCT2	p10	p10	msCCT6	odv-e56	ph
msCCT3	egt	Ph	msCCT7	ctx	p10
msCCT4	39k	p10	msCCT8	orf51	p10

FIG. 8C