

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 780**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012** **PCT/EP2012/064843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013** **WO13014294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012** **E 12745446 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017** **EP 2737071**

54 Título: **Sistemas de expresión de baculovirus mejorados**

30 Prioridad:

27.07.2011 US 201161512142 P

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**GENETHON (100.0%)
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, FR**

72 Inventor/es:

**GALIBERT, LIONEL;
MERTEN, OTTO-WILHELM;
VAN OERS, MONIQUE y
RIVIERE, CHRISTEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 780 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

Sistemas de expresión de baculovirus mejorados

La presente invención se refiere a un constructo baculovírico optimizado útil para la producción de partículas víricas (similares a virus) o vectores víricos, en particular de vectores víricos para terapia génica.

5 **Antecedentes de la invención**

El sistema de vector de expresión baculovírico (BEV) se usa para producir altos niveles de proteínas recombinantes en células de insecto. Está generalmente basado en la delección del gen de polihedrina baculovírico (*polh*), que se reemplaza por el gen que se va a expresar bajo el control del promotor *polh*. La incorporación de un origen de replicación bacteriano, un gen de resistencia a antibiótico y un sitio de recombinación Tn7 aceptor al genoma baculovírico (concretamente bácmido) ha mejorado en gran medida este sistema, haciéndolo mucho más rápido para generar virus recombinantes (Luckow *et al.*, 1993). Los vectores baculovíricos más disponibles comercialmente carecen del gen *polh* y tienen por lo demás un genoma completo, aunque la compañía Oxford Expression Technologies distribuye, con flashBACGOLD, un vector baculovírico negativo de los genes de quitinasa y catepsina. Se ha previsto por tanto que este sistema de expresión podría mejorarse. Se ha mostrado que la delección de los genes *quitinasa* y *catepsina* del genoma de AcMNPV tiene un efecto positivo sobre la estabilidad de la proteína intracelular y recombinante secretada (Kaba *et al.*, 2004). Se ha mostrado también que un BEV deficiente de *quitinasa*, *catepsina*, *p26*, *p10* y *p74* permitía la producción de mayores niveles de proteínas recombinantes que los obtenidos con virus sin delección (Hitchman *et al.*, 2009). Sin embargo, los datos de expresión obtenidos en este último estudio atañían solo a proteínas recombinantes individuales. Para la producción de estructuras complejas tales como vectores víricos y partículas similares a virus, es necesario producir una o una serie de proteínas y, en el caso de vectores víricos, también un genoma vírico. A partir de los resultados de Hitchman *et al.*, no era evidente que la producción de dichas estructuras complejas pudiera mejorarse en términos de calidad de proteína cuando se eliminan los genes *quitinasa*, *catepsina*, *p26*, *p10* y *p74*.

El objetivo del presente estudio era proporcionar un sistema de expresión baculovírico optimizado para la producción de vectores víricos y/o partículas similares a virus.

Descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un genoma baculovírico recombinante que comprende los ORF de los genes baculovíricos *p26* y *p74*, mientras que los genes baculovíricos *catepsina*, *quitinasa* y *p10* están interrumpidos. En una realización preferible, el gen *p10* se interrumpe sin eliminar el promotor *p10*. En otra realización, el genoma baculovírico recombinante comprende una o más secuencias heterólogas de interés.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un baculovirus recombinante que comprende un genoma baculovírico recombinante como se describe anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un baculovirus recombinante, que comprende cultivar una célula procariótica que contiene el genoma baculovírico recombinante de la invención en condiciones que permitan la producción de un baculovirus.

En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende un genoma baculovírico recombinante de la invención.

Un aspecto adicional proporciona un método para producir una proteína o ácido nucleico recombinante (p.ej., una molécula de ARN o ADN o un genoma recombinante, siendo el genoma recombinante por ejemplo un genoma de ARN o ADN), que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora con uno o varios baculovirus recombinantes de la invención, que comprende un genoma baculovírico recombinante que alberga una secuencia heteróloga de interés que codifica una proteína o ácido nucleico recombinante.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un vector vírico o partícula similar a virus que comprende la etapa de cultivar células hospedadoras con uno o varios baculovirus recombinantes, comprendiendo cada uno un genoma baculovírico recombinante que alberga una secuencia heteróloga de interés para producir dicho vector vírico o partícula similar a virus, en el que todos los baculovirus recombinantes comprenden un genoma baculovírico recombinante con ORF de los genes baculovíricos *p26* y *p74* intactos, y en el que los ORF de los genes baculovíricos *catepsina*, *quitinasa* y *p10* están interrumpidos, y en el que el promotor del gen *p10* no está interrumpido.

En una realización, los métodos anteriores se ejecutan para la producción de un vector de AAV recombinante.

La presente invención se refiere a un genoma baculovírico recombinante optimizado y a métodos que usan el mismo. Se ha encontrado sorprendentemente que la interrupción de los genes *catepsina*, *quitinasa* y *p10* no mejoraba el nivel de partículas de AAV recombinantes (rAAV) producidas en células de insecto, pero permitía la producción de partículas de rAAV con infectividad mejorada para células de mamífero. Este resultado era altamente

inesperado, ya que Hitchman *et al.* (véase supra) reseñó niveles mayores de expresión de proteínas recombinantes individuales producidas a partir de baculovirus nulos de *cathepsina*, *quitinasa*, *p26*, *p10* y *p74*, aunque este estudio no reseñaba la producción de un vector vírico. Los resultados presentados aquí muestran en particular que el nivel de expresión del gen *cap* de AAV, que codifica VP1, VP2 y VP3, no mejora con un baculovirus cuando se interrumpen los genes baculovíricos anteriormente mencionados (cuyos resultados difieren de los que se habrían esperado a partir de la divulgación de Hitchman *et al.*). En lugar de ello, se reduce el nivel de degradación de VP1 y VP2 y las partículas de rAAV producidas con este baculovirus de delección muestran una mejora de la infectividad de cuatro veces cuando se comparan con las partículas de rAAV producidas a partir de un bácmido de sistema de producción baculovírico de tipo silvestre, concretamente sin modificación de los loci de *quitinasa*, *cathepsina*, *p26*, *p10* y/o *p74*.

El genoma baculovírico recombinante de la invención es capaz de replicación preferentemente en una célula de insecto y en una célula procariótica tal como *E. coli*. En particular, puede usarse cualquier genoma baculovírico vírico que contenga un replicón BAC. En una realización particular, el genoma baculovírico recombinante es un bácmido. Las secuencias baculovíricas adecuadas incluyen el bácmido MNPV de *Autographa californica* (Ac).

Los baculovirus se usan comúnmente en la infección de células de insecto para la expresión de proteínas recombinantes. En particular, la expresión de genes heterólogos en insectos puede lograrse como se describe, por ejemplo, en los documentos US 4.745.051; Friesen *et al.*, 1986; EP 127.839; EP 155.476; Vlak *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1988; Carbonell *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1985; Lebacqz-Verheyden *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1985; Miyajima *et al.*, 1987 y Martin *et al.*, 1988. Se describen numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas que pueden usarse para la producción de proteína en Luckow *et al.*, 1988, Miller *et al.*, 1986; Maeda *et al.*, 1985, McKenna, 1989, van Oers, 2011 y Lynn, 2007.

Según la presente invención, puede usarse cualquier genoma baculovírico derivado de un baculovirus usado comúnmente para la expresión recombinante de proteínas y productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, el genoma baculovírico puede derivar, por ejemplo, de AcMNPV, (Bm)NPV de *Bombyx mori*, (Hear)NPV de *Helicoverpa armigera* o (Se)MNPV de *Spodoptera exigua*, preferiblemente de AcMNPV. En particular, el genoma baculovírico puede derivar del clon C6 de AcMNPV (secuencia genómica: n° de acceso a Genbank NC_001623.1) o E2 (Smith y Summers, 1979).

La invención ejecuta la interrupción de genes baculovíricos. Pueden ejecutarse varias estrategias con este fin, y en particular la mutación, por ejemplo por delección, del gen o genes seleccionados a partir del genoma baculovírico (recombinante). Es un método bien conocido y establecido de investigar las funciones génicas la manipulación de un genoma baculovírico en bacterias mediante recombinación homóloga usando recombinación basada en ET (proteínas RecE y RecT de *E. coli*) o en Red de lambda dirigida a un solo gen o un tramo de genes flanqueantes, que se reemplazan entonces por un marcador de selección antibiótico (Datsenko y Wanner, 2000; Westernberg *et al.*, 2010). Para preparar múltiples delecciones en el mismo genoma, tienen que usarse varios marcadores de selección diferentes o el marcador de selección tiene que estar flanqueado por sitios de restricción únicos que permitan la retirada después de cada delección génica mediante digestión y religamiento. Se ha adaptado una estrategia derivada de un método para elaborar delecciones/inserciones secuenciales en un genoma bacteriano (Suzuki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2005) para la tecnología de bácmidos (Marek *et al.*, 2011) y se ha usado eficazmente en el presente estudio. Ejecuta un sistema recombinasa cre-lox modificado que usa sitios loxP modificados para elaborar mutaciones en serie. Después del reemplazo del primer gen por un marcador de selección, por ejemplo el marcador antibiótico *cloranfenicol acetiltransferasa*, por recombinación homóloga, el marcador puede retirarse debido a la presencia de sitios loxP en ambos extremos del marcador. En la configuración usada, se usan dos sitios loxP modificados (lox66 y lox71), cada uno con una mutación diferente. Después de recombinación por recombinasa cre, queda un sitio lox72 (Lambert *et al.*, 2007), que tiene ahora dos mutaciones en lugar de una, y no puede reconocerse ya por la recombinasa cre. Esto permite la delección posterior de un segundo gen diana.

En una realización particular, se interrumpen los genes *chi/v-cath* (nucleótidos 105282-107954 según el mapa genético de AcMNPV (Ayres *et al.*, 1994) y *p10* (nucleótidos 118839-119121).

La interrupción de *p10* se realiza sin interrumpir los ORF de los genes *p26* y *p74*. En una variante preferida de esta realización, el genoma baculovírico recombinante de la invención comprende todavía el promotor *p10* (la secuencia de codificación de *p10* se interrumpe por tanto sin eliminar su promotor, que corresponde a los nucleótidos 118739-118836 según el mapa genético de AcMNPV). En otra realización, se elimina también el promotor *p10*. Se muestra a continuación que la interrupción del ORF del gen *p10* dejando su promotor intacto y sin interrumpir los ORF de los genes *p26* y *p74* permite la producción de partículas víricas de rAAV más eficaces que cuando se interrumpen estos tres genes en el genoma baculovírico recombinante.

El presente genoma baculovírico recombinante puede usarse para producir proteínas o ácidos nucleicos recombinantes según métodos bien conocidos en el campo de los sistemas de expresión basados en baculovirus. El genoma baculovírico recombinante puede albergar por tanto también secuencias nucleotídicas heterólogas útiles para la producción de proteínas recombinantes, ácidos nucleicos o para la producción de estructuras complejas tales como vectores víricos y partículas similares a virus.

Según la invención, una secuencia nucleotídica heteróloga es una secuencia útil para la producción de un producto de interés (p.ej. una proteína, un ácido nucleico tal como un ARNm, ARNip, secuencia nucleotídica no codificante, secuencia de horquilla y un genoma vírico tal como un genoma vírico recombinante para terapia génica).

5 Como tal, la presente invención se refiere también a un genoma baculovírico recombinante (y a baculovirus recombinantes y células hospedadoras que comprenden los mismos) como se define anteriormente, que comprende una secuencia heteróloga.

La secuencia heteróloga puede insertarse en un sitio o un locus conocido en el baculovirus por permitir la expresión de la secuencia insertada. Por ejemplo, se usa clásicamente el locus de polihedrina como sitio de inserción para secuencias nucleotídicas heterólogas (en particular a través del sitio de recombinación Tn7 del bácmido).

10 La invención se refiere también a un baculovirus recombinante y a una célula hospedadora que comprende el genoma baculovírico recombinante de la invención.

El baculovirus recombinante de la invención está bien adaptado para producir estructuras complejas tales como vectores víricos o partículas similares a virus. En el último caso, los componentes de la estructura compleja pueden expresarse a partir de varios genomas baculovíricos recombinantes, portando cada uno de dichos genomas al menos un componente de la estructura compleja, y estando codificado cada uno de dichos componentes por secuencias nucleotídicas heterólogas comprendidas en diferentes baculovirus recombinantes de la invención. Cuando se usa dicho conjunto de baculovirus recombinantes para producir varios componentes recombinantes, preferiblemente todos los vectores baculovíricos deberían tener las mismas modificaciones en los genes *quitinasa*, *cathepsina*, *p26*, *p74* y *p10*. Por ejemplo, para la producción de un AAV recombinante, puede usarse un sistema que comprende tres baculovirus: un baculovirus que codifica las proteínas Rep de AAV, un baculovirus que codifica las proteínas Cap de AAV y un baculovirus que codifica el genoma de AAV-ITR que comprende un gen de interés (p.ej., un gen terapéutico) entre las dos ITR de AAV (Manno *et al.*, 2006; Mendell *et al.*, 2010; Simonelli *et al.*, 2010). Está también disponible ahora un sistema que comprende dos baculovirus (sistema de infección dual) para el que las secuencias de ADN que codifican las proteínas Rep de AAV y las proteínas Cap de AAV se proporcionan por un baculovirus. El último sistema de infección dual se ejecuta en los ejemplos.

Como tal, la presente invención se refiere también a un genoma baculovírico recombinante (y a baculovirus recombinantes y células hospedadoras que comprenden el mismo) como se define anteriormente, que comprende una secuencia heteróloga que codifica una parte de un vector vírico o de una partícula similar a virus. En una realización particular, el vector baculovírico codifica:

- 30 – un genoma de rAAV, o
- proteínas Rep de AAV, o
- proteínas Cap de AAV, o
- proteína activadora del ensamblaje de AAV (AAP).

En una realización particular, el genoma baculovírico recombinante comprende un módulo de expresión que comprende los genes *rep* y *cap* de AAV, preferiblemente en orientación inversa.

La célula hospedadora puede ser una célula productora para la producción de una proteína, ácido nucleico, virus o partícula similar a virus recombinante que se ha infectado con uno o más baculovirus según la invención. Por supuesto, el promotor o promotores y las regiones no traducidas en 5' y 3' tales como la señal de poliadenilación o las regiones diana de microARN, que controlan la expresión de la secuencia nucleotídica heteróloga presente en el genoma baculovírico recombinante, dependerán en última instancia de la célula hospedadora usada para la expresión del producto de dicha secuencia heteróloga. Si la célula hospedadora es una célula de insecto, tienen que usarse promotores eficaces en células de insecto (por ejemplo, los promotores baculovíricos muy tardíos *p10* y *polihedrina* o una combinación de los mismos). En caso de una célula hospedadora productora de mamífero, el promotor o promotores pueden ser promotores de mamífero tales como el promotor de citomegalovirus (CMV) humano.

Las células según la presente invención pueden seleccionarse del grupo consistente en células de mamífero, preferiblemente células humanas, células de *C. elegans*, células de levadura, células de insecto y células procarióticas tales como células de *E. coli*.

Las células de levadura preferidas para practicar la invención son *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* y *P. pastoris*.

50 Las células de *E. coli* preferidas para practicar la invención son células Top10, DH5 α , DH10 β , TG1, BW23473, BW23474, MW003 y MW005 (Westernberg *et al.*, 2010).

Las células de insecto preferidas para practicar la invención son células de *S. frugiperda*, preferiblemente células Sf9, Sf21, Express Sf+ o *Trichoplusia ni* High Five, y de *D. melanogaster*, preferiblemente células S2 Schneider.

Las células humanas preferidas para practicar la invención se seleccionan del grupo consistente en HeLa, Huh7, HEK293, HepG2, KATO-III, IMR32, MT-2, células beta pancreáticas, queratinocitos, fibroblastos de médula ósea, CHP212, células neurales primarias, W12, SK-N-MC, Saos-2, WI38, hepatocitos primarios, FLC4, 143TK-, DLD-I, fibroblastos pulmonares embrionarios, fibroblastos primarios de prepucio, osteosarcoma Saos-2, células MRC5 y MG63.

La invención se describirá ahora con relación a los ejemplos siguientes y figuras adjuntas.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Mapa esquemático del bácmido de AcMNPV con delección de ORF de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*, dejando el promotor *p10* intacto ($\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$) o en combinación con una delección de los genes *p26*, *p10* y *p74* ($\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$).

En el bácmido de AcMNPV se han inactivado los genes *quitinasa*, *cathepsina* y *p10* o *p26*, *p10* y *p74*. Se inserta el módulo de expresión *rep2/cap8* de AAV en el sitio *Tn7* del bácmido. En el mismo esqueleto de bácmido, se transfiere el gen de rAAV (mSeAP en este ejemplo) al sitio *Tn7*.

Figura 2. Determinación del genoma vírico de rAAV en muestras brutas y purificadas.

Se ha valorado la productividad de rAAV en muestras brutas o muestras de producto purificado originadas por la producción efectuada con esqueletos baculovíricos wt, $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ y $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$. Se cuantifican los títulos de rAAV mediante QPCR y se expresan como genomas víricos por ml (gv/ml)/ml (barras azules), se cuantifican los títulos baculovíricos contaminantes mediante QPCR en gv/ml (puntos rojos). (a) muestras brutas de rAAV, (b) rAAV purificados por inmutaoafinidad.

Figura 3. Caracterización de vectores de rAAV purificados.

Se analizan los vectores de rAAV purificados por inmutaoafinidad mediante PAGE-SDS seguida de tinción con azul de Coomassie (a) o transferencia Western de las proteínas VP de AAV (b).

1: AAV-mSeAP (5×10^{10} gv) producido por el baculovirus WT

2: AAV8-mSeAP (5×10^{10} gv) producido por el baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$

3: AAV8-mSeAP (5×10^{10} gv) producido por el baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$

Figura 4. Evaluación *in vivo* de vectores de rAAV.

Se inyectó por vía intramuscular rAAV8-mSeAP producido con baculovirus WT o $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ o $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ en ratones a 10^9 gv (n= 4). (a) Se mide el curso temporal de la expresión de mSeAP sérico. (b) Análisis histológico de la expresión de mSeAP. Se prepararon secciones musculares (8 μM) y se analizó la localización de mSeAP. (c) Cuantificación del genoma de rAAV en músculo transducido.

EJEMPLOS

Materiales y métodos:

Delecciones génicas de baculovirus

Se efectuó la delección de *cathepsina* y *quitinasa* del bácmido de AcMNPV de tipo silvestre a partir de la cepa DH10Bac de *E. coli* que contiene el bácmido de AcMNPV (Luckow *et al.*, 1993) y se transformó con el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000). Se generó el producto de PCR necesario para la inactivación génica de *cathepsina/quitinasa* con los cebadores CC-KO-F y CC-KOR (Tabla 1) usando pCRTopo-lox-CAT-lox como molde (Marek *et al.*, 2011). Se efectuó la inactivación génica según Marek *et al.*, 2011 y se valoró usando los cebadores *quitinasa*-105625F y *cathepsina*-107849R (Tabla 1). Se efectuó la retirada del marcador génico CAT del bácmido nulo de *cathepsina/quitinasa* (Acba $\Delta\text{CC}\Delta\text{cat}$) como se describe (Marek *et al.*, 2011) y se verificó mediante PCR y secuenciación, usando los cebadores anteriormente descritos. Se efectuó la segunda inactivación génica para retirar la secuencia de codificación de *p10* de Acba $\Delta\text{CC}\Delta\text{cat}$ de la misma manera, con un producto de PCR generado con los pares de cebadores *p10*-KO-F/*p10*-KO-R (Tabla 1). Se efectuó la verificación de la inactivación génica correcta usando PCR y secuenciación con los pares de cebadores *p10*-118725-F/*p10*-119259-R (Tabla 1). Esta segunda inactivación génica condujo al bácmido nulo de *cathepsina/quitinasa/p10* (Acba $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$), con un promotor *p10* intacto. Como alternativa, se efectuó la segunda inactivación génica de los genes vecinos *p26*, *p10* y *p74* en Acba $\Delta\text{CC}\Delta\text{cat}$ de manera similar, con un producto de PCR generado con los pares cebadores *p26*-KO-F/*p74*-KO-R (Tabla 1). Se efectuó la verificación de la inactivación génica correcta usando PCR y secuenciación con los pares cebadores *p26*-117989-F/*p74*-121176-R (Tabla 1). La última inactivación génica condujo al bácmido nulo de *cathepsina/quitinasa/p26/p10/p74* (Acba $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$).

Insertión de los genes *rep/cap* de AAV y del genoma de AAV recombinante en el bácmido por transposición

Se transformaron células DH10Bac de *E. coli* que contenían el bácmido de tipo silvestre y células DH10 β de *E. coli* que contenían Acba Δ CC Δ p10 o Acba Δ CC Δ p26p10p74 con el plásmido pMON7124 (Luckow *et al.*, 1993). Se efectuó entonces la transposición según el manual del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) en los tres bácmidos con el plásmido pFBD-mSeAP, que codifica un gen informador *fosfatasa alcalina secretada de múdo* (mSeAP) controlado por un promotor de CMV y flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2. Se efectuó también la transposición con el plásmido pSR660 que codifica el gen *rep78/52* de AAV2 bajo el promotor muy tardío *polihedrina* y el gen *cap* de AAV8 bajo el promotor muy tardío *p10* (Smith *et al.*, 2009). Se verificó la recombinación eficaz en el genoma de bácmido según el protocolo de Bac-to-Bac. Esto dio como resultado tres conjuntos de bácmidos para la producción de partículas de rAAV que portan ADN de ITR-mSeAP, cada conjunto con un esqueleto genómico baculovírico diferente (wt, Acba Δ CC Δ p10 o Acba Δ CC Δ p26p10p74).

Producción de línea celular, baculovirus y rAAV

Se hicieron crecer células Sf9 en cultivo en suspensión a 27 °C en medio SF900II (Invitrogen) en matraces agitados Bellco de 1 l. Se generaron baculovirus según las directrices del protocolo Bac-to-Bac a partir de los bácmidos con delección y los bácmidos recombinantes descritos anteriormente y se amplificaron en cultivos en suspensión de células Sf9 en agitadores Bellco de 100 ml. Se efectuó la producción de rAAV por infección dual de células Sf9 con baculovirus que albergan el genoma de AAV recombinante (ITR-mSeAP) y los genes *rep2/cap8* de AAV, cada uno a una MOI de 1,6 en 70 ml de cultivo de células Sf9 sembradas a 10⁶ células/ml en agitadores Bellco de 100 ml. A las 72 h después de la infección, se recuperó 1 ml del cultivo total para la cuantificación directa de la producción de rAAV antes de purificación y se almacenó entonces a -80 °C.

Purificación y caracterización de rAAV

Se purificó rAAV a partir de muestra bruta en medio Immuno-affinity AVB Sepharose (GE Healthcare) según (Smith *et al.*, 2009). Se corrieron 5 x 10¹⁰ genomas víricos (gv) de vectores de rAAV purificados en PAGE-SDS de Bis-Tris al 4-12 % (Nu-PAGE, Invitrogen), y se tiñeron directamente con Coomassie o se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (nitrocelulosa de apilamiento de transferencia de gel iBlot, Invitrogen) antes de inmunodetección (véase a continuación la transferencia Western).

Determinación del título del genoma de rAAV

Se efectuó un ensayo de PCR cuantitativa directamente en las muestras de cultivo total o muestras de rAAV purificadas para determinar el título de rAAV (genoma vírico por ml de producción). Se extrajo el ADN vírico directamente de la muestra bruta o muestras purificadas usando el kit de pequeño volumen MagNA Pure DNA and viral RNA (MagNA Pure 96, Roche). El plásmido usado como referencia contiene las dos ITR de AAV2 y el gen baculovírico *ADN polimerasa*. Se efectuaron diluciones en serie para calcular el número de copias final de la muestra analizada y se usó un control positivo para valorar la titulación eficaz. Se efectuaron las titulaciones al mismo tiempo en la misma placa por un operador independiente.

Transferencia Western

Se analizaron muestras brutas de baculovirus o muestras de rAAV8 purificadas mediante transferencia Western para proteínas VP y Rep de AAV. El anticuerpo primario anti-VP es un clon B1 de IgG1 de ratón (Progen) usado a dilución 1/250. El anticuerpo primario anti-Rep es un clon 303.9 de IgG1 de ratón (Progen) usado a dilución 1/100. El anticuerpo secundario es un Dye 680 de cabra anti-ratón (LI-COR) usado a dilución 1/5000. Se efectuó la incubación en tampón de bloqueo del sistema de imagenología infrarroja (LI-COR) y se efectuó el revelado en el sistema Odyssey (LI-COR). Se cuantificaron las intensidades de fluorescencia con el software Odyssey 2.1.

Inyección *in vivo*, recogida de muestra y cuantificación de mSeAP

Se inyectaron vectores de rAAV, 10⁹ gv en 25 μ l de solución salina tamponada con fosfato, por vía intramuscular en el músculo tibial anterior (TA) izquierdo de ratones C57black6 de 6 semanas de edad (n= 4 por vector). Se recogieron muestras de sangre de los ratones inyectados a los 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días después de la inyección, para cuantificación sérica de mSeAP. El día 35, se sacrificaron los animales y se recogieron los músculos TA izquierdo y derecho y se congelaron antes de los ensayos histológico y enzimático.

Se trataron todos los ratones según la directiva 2010/63/EU sobre la protección de animales usados con fines científicos. Se efectuó un ensayo de valoración de mSeAP con 12,5 μ l de suero de ratón. Se realizó la cuantificación de mSeAP usando el kit Phospha-Light System (Applied Biosystems). Se leyeron las muestras en un aparato luminómetro Victor II. Se expresan los niveles de expresión como ng de mSeAP por ml de suero usando una curva patrón de fosfatasa alcalina de placenta humana purificada (Applied Biosystems).

Análisis histológico de la expresión de mSeAP

Se prepararon secciones musculares (8 μ M) y se analizó la localización de mSeAP usando el método de nitroazul de tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, como se describe anteriormente (Riviere *et al.*, 2006). Se contratiñeron secciones de músculo con rojo rápido nuclear y se evaluaron la inflamación e integridad muscular por

tinción con hematoxilina-eosina y análisis de microscopía óptica.

Detección del genoma de rAAV *in vivo*

Se extrajeron muestras de ADN total de músculo de ratón usando el kit FastDNA (QBIoGene) en un aparato FastPrep (QBIoGene). Se efectuó la titulación del genoma de rAAV usando QPCR como se describe en la sección anterior. Se efectuó la normalización usando la cuantificación del gen *titina*.

Análisis estadístico

Se evaluó la significación estadística de la expresión sérica de mSeAP a los 35 días después de la inyección de rAAV. Se efectuaron comparaciones de grupo. Se efectuó el análisis de varianza mediante la prueba de Fischer ($\alpha=0,05$), seguida de la prueba de Student ($\alpha=0,05$) usando el programa Excel.

Resultados:

Generación de baculovirus con delección de los genes *quitinasa* y *catepsina*, junto con *p10* o *p26*, *p10* y *p74*.

Para retirar múltiples genes, tienen que introducirse delecciones secuenciales en el bácmido de AcMNPV. Es un método bien conocido y establecido para investigar las funciones génicas la manipulación del genoma baculovírico en bacterias mediante recombinación homóloga usando recombinación basada en ET (proteínas RecE y RecT de *E. coli*) o Red de lambda dirigida a un solo gen, que se reemplaza entonces por un marcador de selección antibiótico (Datsenko y Wanner, 2000). Para preparar múltiples delecciones en el mismo genoma, tienen que usarse varios marcadores de selección diferentes o tiene que flanquearse el marcador de delección por sitios de restricción únicos después de la retirada de cada delección génica, por digestión y religamiento. Se ha adaptado una estrategia derivada de un método para elaborar delecciones/inserciones en un genoma bacteriano (Suzuki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2005) para la tecnología de bácmidos (Marek *et al.*, 2011). Después del reemplazo del primer gen por el marcador antibiótico de *cloranfenicol acetiltransferasa* por recombinación homóloga, puede retirarse el marcador debido a la presencia de sitios loxP en ambos extremos del marcador. En la configuración usada, se usan dos sitios loxP modificados (lox66 y lox71), cada uno con una mutación diferente. Después de recombinación por recombinasa cre, queda un sitio lox72 (Lambert *et al.*, 2007), que tiene ahora dos mutaciones en lugar de una y ya no puede reconocerse por la recombinasa cre. Esto permite la delección posterior de un segundo gen diana. Se ensayó este método en una configuración de bácmido para retirar en serie en dos etapas los genes *chi/v-cath* (nucleótidos eliminados 105282-107954 según el mapa genético de AcMNPV (Ayres *et al.*, 1994) y *p10* (nucleótidos eliminados 118839-119121) o *p26/p10/p74* (nucleótidos eliminados 118044-121072). Se valoraron estas delecciones por PCR y secuenciación. Se transfectaron células Sf9 exitosamente con cada uno de los ADN de bácmido de delección. Se observaron signos visibles de infección baculovírica 96 h después de la infección (interrupción de las capas celulares, mayor diámetro y mortalidad de las células Sf9), lo que indica infectividad de ambos baculovirus AcCC Δ p10 y AcCC Δ p26p10p74.

Antes de la transposición del gen *rep* de AAV2 bajo los genes *polh* y *cap* de AAV8 bajo el promotor *p10* y las secuencias de AAV-mSeAP en AcCC Δ p10, se transformaron células DH10 β de *E. coli*, que contienen los diferentes constructos de bácmidos, con el plásmido pMON7124 (Luckow *et al.*, 1993) para mediar una recombinación eficaz de vectores de transferencia que contienen los constructos de interés en el sitio Tn7 del bácmido (Figura 1).

Después de la recombinación, y antes de la transfección de ADN de bácmido a las células Sf9, se verificó la ausencia de bácmido no recombinante.

Se purificaron en placa los baculovirus y se amplificaron en dos pasadas. No se observó diferencia en términos de títulos de baculovirus (ufp/ml) o los niveles de proteína VP y Rep de AAV entre los baculovirus wt, Δ CC Δ p10 y Δ CC Δ p26p10p74 recombinantes. Se usaron entonces los baculovirus para efectuar la producción de rAAV.

La delección de los genes *quitinasa*, *catepsina* y *p10* no mejora la productividad de rAAV en células Sf9.

Se efectuaron producciones de vector de rAAV estándar en cultivos agitados que muestran claramente que la producción de baculovirus recombinante, de tipo silvestre o de tipo Δ CC Δ p10 o de tipo Δ CC Δ p26p10p74 era comparable, conduciendo a títulos de $2,09 \times 10^{11}$ y $1,30 \times 10^{11}$ y $2,11 \times 10^{11}$ gv/ml, respectivamente. Igualmente, la producción de AAV (transgén modelo: mSeAP) era prácticamente similar cuando se usan ambos baculovirus, conduciendo a títulos de $1,27 \times 10^{10}$, $1,32 \times 10^{10}$ y $1,40 \times 10^{10}$ gv/ml, respectivamente (Figura 2A). La purificación de AAV usando cromatografía AVB condujo a aumentos del título a $4,25 \times 10^{12}$, $2,47 \times 10^{12}$ y $3,52 \times 10^{12}$ gv/ml, respectivamente (Figura 2B).

Estos resultados indican que la retirada de algunos genes baculovíricos no esenciales del esqueleto baculovírico no tiene impacto sobre la producción y purificación de vectores de rAAV.

El uso de un baculovirus con delección de los genes *quitinasa*, *catepsina* y *p10* o *p26*, *p10*, *p74* reduce la degradación de partículas de rAAV.

La ausencia de *quitinasa* y *cathepsina*, en combinación con una delección del ORF de *p10* o una delección de los genes *p26*, *p10* y *p74* tenía un efecto beneficioso sobre la integridad del vector de AAV. Lo más probablemente, la ausencia de actividad proteasa (cathepsina) derivada del baculovirus conducía a una degradación de partícula vectorial reducida como se muestra por PAGE-SDS y análisis de transferencia Western (WB) (Figura 3). Estos métodos analíticos indicaban claramente la desaparición de al menos tres “bandas de degradación contaminantes” específicas de VP. La banda de degradación contaminante principal de las tres bandas se localiza cerca de VP3 (Figura 3). El uso de los baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ o $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ en lugar de baculovirus wt conduce por tanto a una degradación del vector de rAAV reducida y a la desaparición de varios productos de degradación de VP.

Las partículas de rAAV producidas usando un baculovirus con delección de los genes *quitinasa*, *cathepsina* y *p10* o *p26*, *p10*, *p74* exhibe mayor infectividad *in vivo*.

La desaparición de ciertas bandas de proteína de tamaño menor en WB cuando se usan los baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ o $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ significa que la partícula del vector de rAAV se degrada menos y puede tener una mejor integridad, sugiriendo que puede mejorarse la infectividad/potencia *in vivo*. De hecho, cuando se inyectan partículas de rAAV-mSeAP purificadas producidas con los tres esqueletos baculovíricos diferentes (wt, $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ y $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$) por vía intramuscular en ratones (C57Black6), se observó actividad de mSeAP en el suero aproximadamente 1 semana después de la inyección. La actividad aumentaba hasta niveles de meseta de aproximadamente 5,8 ng/ml, 23,2 ng/ml y 9,3 ng/ml cuando se usaba el esqueleto de wt y los esqueletos de $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ y $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ para la producción de AAV, respectivamente, a las 3 semanas después de la inyección (Figura 4A). La diferencia es del orden de un factor de 4 cuando se usa el esqueleto baculovírico de $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ para la producción de rAAV en comparación con el esqueleto baculovírico de wt ($p = 0,01$). La diferencia es del orden de un factor de 2 cuando se usa el esqueleto de $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ en lugar del esqueleto de wt ($p = 0,05$).

Treinta y cinco días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se analizaron histológicamente los músculos inyectados. En cuanto a los niveles séricos aumentados de actividad de mSeAP, los ratones inyectados con rAAV producido con el baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ mostraron una actividad de mSeAP considerablemente aumentada en el tejido muscular transducido en comparación con aquellos ratones inyectados con rAAV producido con el sistema baculovírico wt. La actividad de mSeAP en el tejido muscular transducido con rAAV producido con $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ se encontraba en un intervalo medio en comparación con el rAAV producido con los otros dos esqueletos baculovíricos (Figure 4B). La actividad de mSeAP aumentada observada con rAAV producido con el baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p10}$ se correlaciona con un aumento del número de copias del genoma de rAAV suministradas a las células de músculo TA como se muestra por PCR cuantitativa (Figura 4C), ilustrando que se suministraban 3,25 veces más copias en comparación con el sistema de producción wt. De manera similar, la evaluación del número de copias del genoma de rAAV suministrado a las células de músculo TA después de la producción con baculovirus $\Delta\text{CC}\Delta\text{p26p10p74}$ conducía a un aumento de 2 veces en comparación con el uso de rAAV producido con el esqueleto baculovírico de wt (Figura 4C). Estos valores están bien de acuerdo con los niveles de actividad de mSeAP obtenidos con los diversos vectores baculovíricos.

Referencias

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD (1994). “The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus”. *Virology* 202(2): 586-605.

Carbonell LF, Hodge MR, Tomalski MD, Miller LK (1988). “Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors”. *Gene* 73, 409-18.

Datsenko KA, Wanner BL (2000). “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products”. *PNAS* 97(12): 6640-6645.

Friesen PO y Miller LK (1986). “The regulation of baculovirus gene expression” en: “The Molecular Biology of Baculoviruses” (W. Doerfler and P. Boehm, eds.) SpringerVerlag, Berlín, pág. 31-49.

Hitchman RB, Possee RD, Crombie AT, Chambers A, Ho K, Siaterli E, Lissina O, Sternard H, Novy R, Loomis K, Bird LE, Owens RJ, King LA (Epub de 5 de agosto de 2009) “Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells”. *Cell Biol Toxicol*.

Kaba SA, Salcedo AM, Wafula PO, Vlask JM, van Oers MM (2004). “Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins”. *J Virol Methods* 122(1): 113-118.

Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M (2007). “Cre-lox-Based System for Multiple Gene Deletions and Selectable-Marker Removal in *Lactobacillus plantarum*”. *Appl Environ Microbiol* 73(4): 1126-1135.

Lebacqz-Verheyden AM, Kasprzyk PG, Raum MG, Van Wyke Coelingh K, Lebacqz JA, Battey JF. (1988). “Posttranslational processing of endogenous and of baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor”. *Molecular and Cell Biology* 8, 3129-35.

Luckow VA, Summers MD (1988). “Trends in the development of baculovirus expression vectors”. *Bio Technology* 6,

47-55.

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993). "Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*". *J Virol* 67(8): 4566-4579.

- 5 Lynn DE (2007). "Available lepidopteran insect cell lines" en *Methods Mol Biol*, pág. 117-137.

Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, Sato Y, Furusawa M. (1985). "Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector". *Nature* 315, 592-4.

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M *et al.* (2006). "Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response". *Nat Med* 12(3): 342-347.

- 10 Marek M, van Oers MM, Devaraj FF, Vlask JM, Merten OW (2011). "Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals". *Biotechnol Bioeng* 108(5): 1056-1067.

Martin BM, Tsuji S, LaMarca ME, Maysak K, Eliason W, Ginns EI (1988). "Glycosylation and processing of high levels of active human glucocerebrosidase in invertebrate cells using a baculovirus expression vector". *DNA* 7, 99-106.

- 15 McKenna KA, Hong H, van Nunen, Granados RR (1989). "Establishment of new *Trichoplusia ni* cell lines in serum-free medium for baculovirus and recombinant protein production". *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 82-90.

Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales XQ, Coley BD, Galloway G *et al.* (2010). "Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D". *Ann Neurol* 68(5): 629-638.

Miller DW, Safer P, Miller LK (1986) en "Genetic Engineering: Principles and Methods" Vol. 8 (eds Setlow, J. & Hollaender, A.) Plenum Publishing, Nueva York, pág. 277-298.

- 20 Miller LK (1988). "Baculoviruses as gene expression vectors". *Annual Review Microbiology*. 42, 177-99.

Miyajima A, Schreurs J, Otsu K, Kondo A, Arai K, Maeda S (1987). "Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3". *Gene* 58, 273-81.

- 25 Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F *et al.* (2010). "Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration". *Mol Ther* 18(3): 643.

Smith GE, Ju G, Ericson BL, Moschera J, Lahm HW, Chizzonite R, Summers MD (1985). "Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector". *Proceedings National Academy of Sciences USA* 82, 8404-8.

- 30 Smith GE, MD Summers (1979), "Restriction maps of five *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (MNPV) variants, *Trichoplusia ni* MNPV and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases *SmaI*, *KpnI*, *BamHI*, *Sad*, *XhoI*, and *EcoRI*". *J. Virol.* 30: 828-838.

Smith RH, Levy JR, Kotin RM (2009), "A Simplified Baculovirus-AAV Expression Vector System Coupled With One-step Affinity Purification Yields High-titer rAAV Stocks From Insect Cells". *Mol Ther* 17(11): 1888-1896.

- 35 Suzuki N, Nonaka H, Tsuge Y, Inui M, Yukawa H (2005). "New multiple-deletion method for the *Corynebacterium glutamicum* genome, using a mutant lox sequence". *Appl Environ Microbiol* 71(12): 8472-8480.

Suzuki N, Inui M, Yukawa H (2007), "Site-directed integration system using a combination of mutant lox sites for *Corynebacterium glutamicum*". *Appl Microbiol Biotechnol* 77(4): 871-878.

Van Oers MM (2011). "Opportunities and challenges of the baculovirus expression system". *Journal of Invertebrate Pathology* (en prensa).

- 40 Vlask JM, Klinkenberg FA, Zaai KJ, Usmany M, Klinge-Roode EC, Geervliet JB, Roosien J, van Lent JW (1988). "Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene". *Journal of General Virology* 69, 765-76.

Westenberg M, Bamps S, Seedling H, Hope IA, Dolphin CT (2010). "*Escherichia coli* MW005: Lambda Red-mediated recombineering and copy-number induction of oriV-equipped constructs in a single host". *BMC Biotechnol* 10.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

Tabla 1: Secuencias cebadoras usadas en este estudio

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Fin*
CC-KO-F	CCGCTGTTGAAACAATATTTATAATACCCTGTTTATAGTTAACAATGTCGGCAGC GTCTATGGCCATAGGAATAGGGCCTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGT TAT (SEQ ID NO:1)	Inactivación génica de quitinasa/catepsina nt 105771-107700
CC-KO-R	CCGCTGTTGAAACAATATTTATAATACCCTGTTTATAGTTAACAATGTCGGCAGC GTCTATGGCCATAGGAATAGGGCCTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGT TAT (SEQ ID NO:2)	
Quitinasa- 105625F	CGCGGCCGTACATGGCGACGCCCA (SEQ ID NO:3)	Verificación
Catepsina- 107849R	GTTTTTAAAGGTCCAATATGGAATG (SEQ ID NO:4)	Verificación
p10-KO-F	TTGTATATTAAATAAAATACTATACTGTAAATTACATTTTATTACAATCTACCGTT CGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:5)	Inactivación de la secuencia de codificación de p10 (codón de inicio a codón de terminación) nt 118839-119121
P10-KO-R	GAATCGTACGAATATTATAAAAACAATTGATTTGTIATTTAAAAACGATTTACCGT TCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:6)	
p10- 118725-F	CCGGGACCTTTAATTCAACCCAACA (SEQ ID NO:7)	Verificación
p10- 119259-R	CAGCATTTGTTATACACACAGAACT (SEQ ID NO:8)	Verificación
M13 PUC F	CCAGTCACGACGTTGTAAAACG (SEQ ID NO:9)	Verificación de bácmidos transpuestos
M13 PUC R	AGCGGATAACAATTCACACAGG (SEQ ID NO:10)	Verificación de bácmidos transpuestos
Genta	AGCCACCTACTCCCAACATC (SEQ ID NO:11)	Verificación de bácmidos transpuestos

* La numeración de baculovirus es según Ayres *et al.* 1994

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> GENETHON	
5	<120>SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS MEJORADOS	
	<130> B1216PC00	
	<160> 11	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 114	
15	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 1	
	ccgctgttga aacaatattt tataataccc tgtttatagt taacaatgtc ggcagcgtct	60
	atggccatag gaatagggcc taccgttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat	114
	<210> 2	
25	<211> 114	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 2	
	ccgctgttga aacaatattt tataataccc tgtttatagt taacaatgtc ggcagcgtct	60
	atggccatag gaatagggcc taccgttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat	114
35	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 3	
45	cgcggccgta catggcgacg ccca	24
	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
55	gttttaaag gtccaatag gaatg	25
	<210> 5	
	<211> 84	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 5		
	ttgtatatta attaaaatac tatactgtaa attacatttt atttacaatc taccgttcgt	60	
5	atagcataca ttatacgaag ttat	84	
	<210> 6		
	<211> 84		
	<212> ADN		
10	<213> artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 6		
	gaatcgtacg aatattataa aacaattgat ttgttatttt aaaaacgatt taccgttcgt	60	
	ataatgtatg ctatacgaag ttat	84	
	<210> 7		
	<211> 25		
20	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 7		
	ccgggacctt taattcaacc caaca	25	
	<210> 8		
30	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
35	<223> cebador		
	<400> 8		
	cagcatttgt tatacacaca gaact	25	
40	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 9		
50	ccagtcacga cgttgtaaaa cg	22	
	<210> 10		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
55	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 10		
60	agcggataac aattcacac agg	23	
	<210> 11		

ES 2 623 780 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 11
agccacctac tcccaacatc 20

10

REIVINDICACIONES

1. Un genoma baculovírico recombinante que comprende los genes baculovíricos *p26* y *p74*, en el que se interrumpen los genes baculovíricos *cathepsina*, *quitinasa* y *p10*.
- 5 2. El genoma baculovírico recombinante según la reivindicación 1, en el que se interrumpe el gen *p10* sin eliminar el promotor *p10*.
3. El genoma baculovírico recombinante de la reivindicación 1 o 2, en el que el genoma baculovírico recombinante comprende una secuencia de interés heteróloga.
4. Un baculovirus recombinante que comprende el genoma baculovírico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Un método para la producción de un baculovirus recombinante, que comprende cultivar una célula procariótica que contiene el genoma baculovírico recombinante según la reivindicación 1 o 3 en condiciones que permitan la producción de un baculovirus.
6. Una célula que comprende un genoma baculovírico recombinante según la reivindicación 1 a 3.
- 15 7. Un método para la producción de una proteína o ácido nucleico recombinante (p.ej., un ARN, un ADN o un genoma recombinante), que comprende la etapa de cultivo de una célula adaptada con un baculovirus recombinante que comprende un genoma baculovírico recombinante según la reivindicación 3 que alberga una secuencia de interés heteróloga que codifica una proteína o ácido nucleico recombinante.
- 20 8. Un método para la producción de un vector vírico o partícula similar a virus, que comprende la etapa de cultivar una célula adaptada con uno o varios baculovirus recombinantes que comprenden cada uno un genoma baculovírico recombinante que alberga una secuencia de interés heteróloga útil para producir dicho vector vírico o partícula similar a virus,
en el que todos los baculovirus recombinantes comprenden un genoma baculovírico recombinante que comprende los genes baculovíricos *p26* y *p74*, en el que se interrumpen los genes baculovíricos *cathepsina*, *quitinasa* y *p10*.
9. El método según la reivindicación 8 para la producción de un vector de AAV recombinante.
- 25

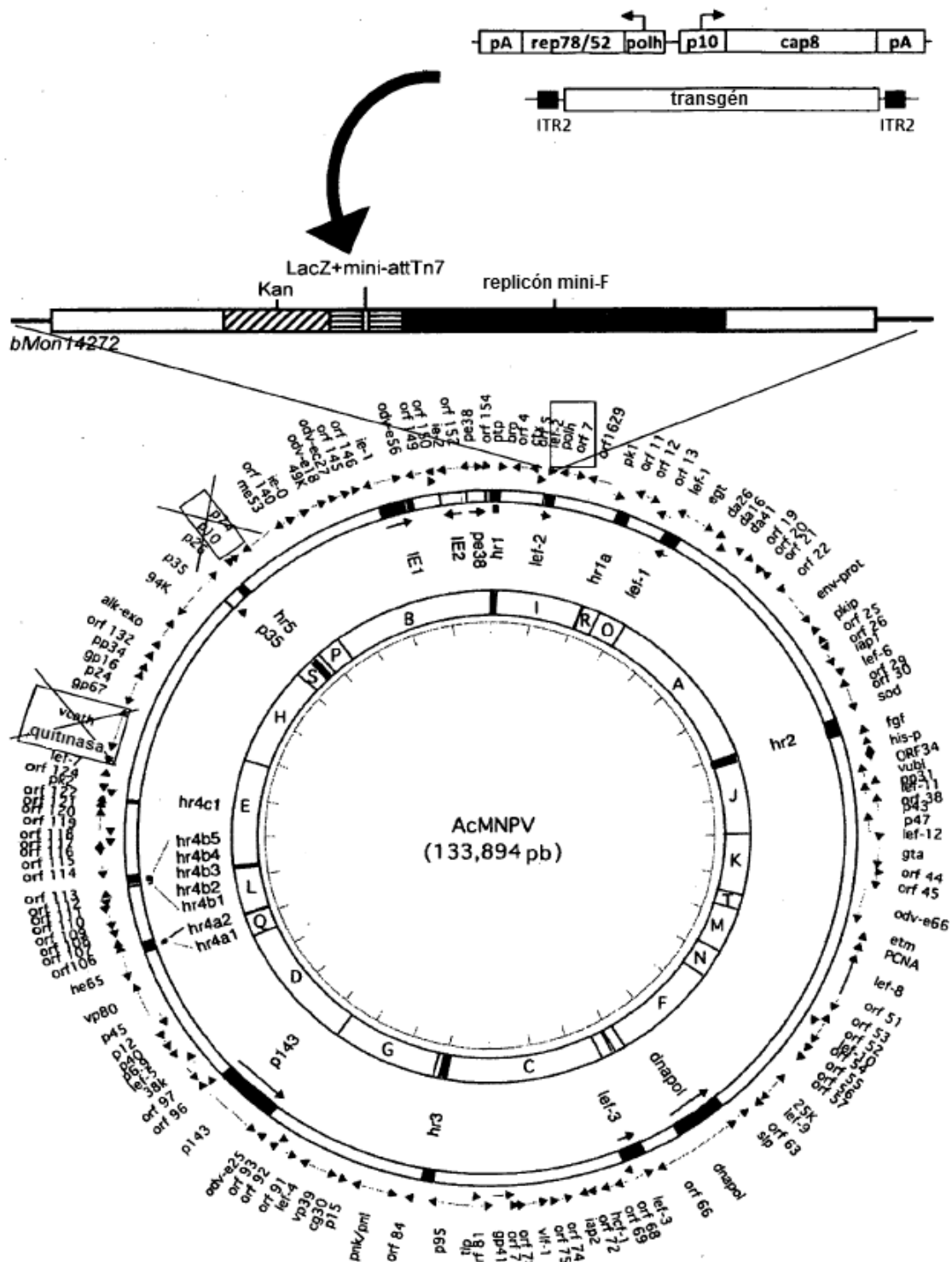


Figura 1

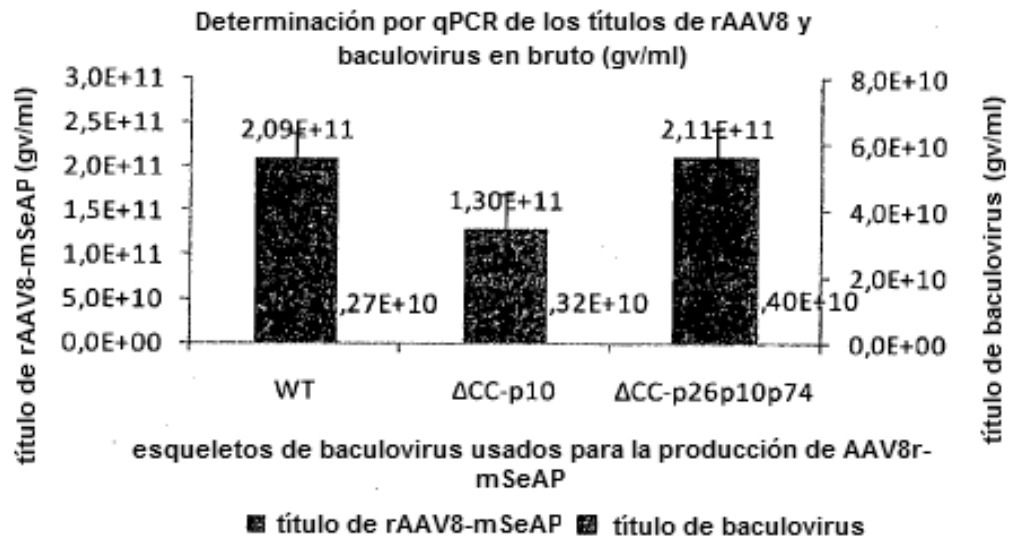


Figura 2ª

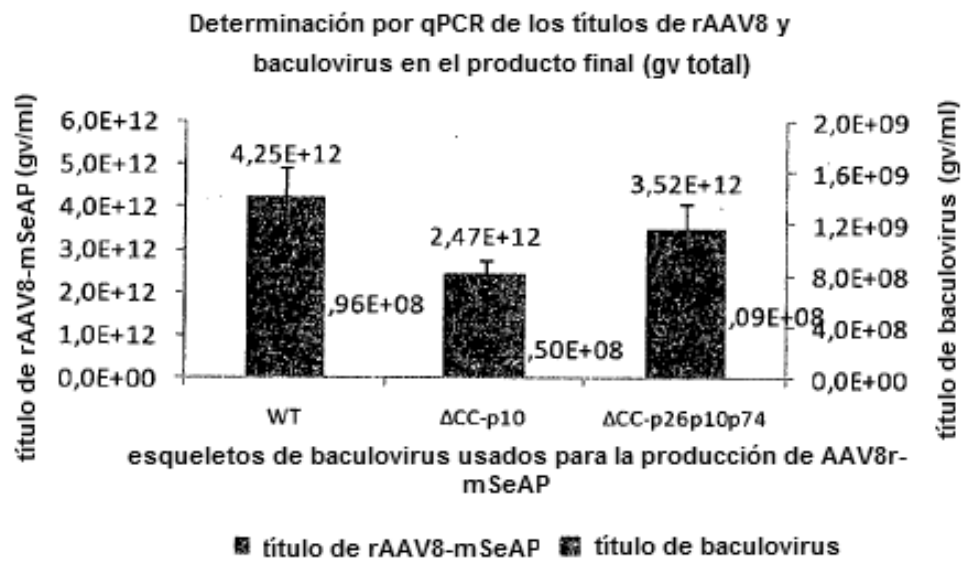


Figura 2B

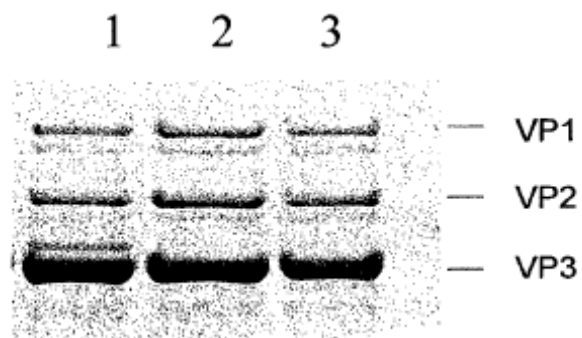


Figura 3A

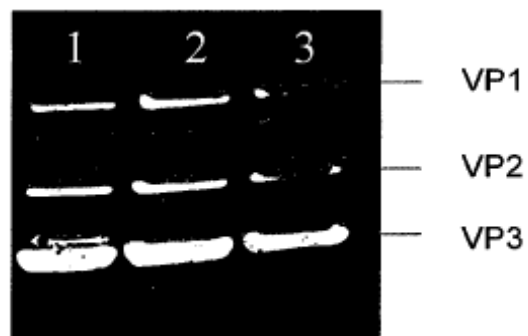


Figura 3B

Evaluación *in vivo* de AAV8-mSeAP producido usando esqueletos de baculovirus modificados

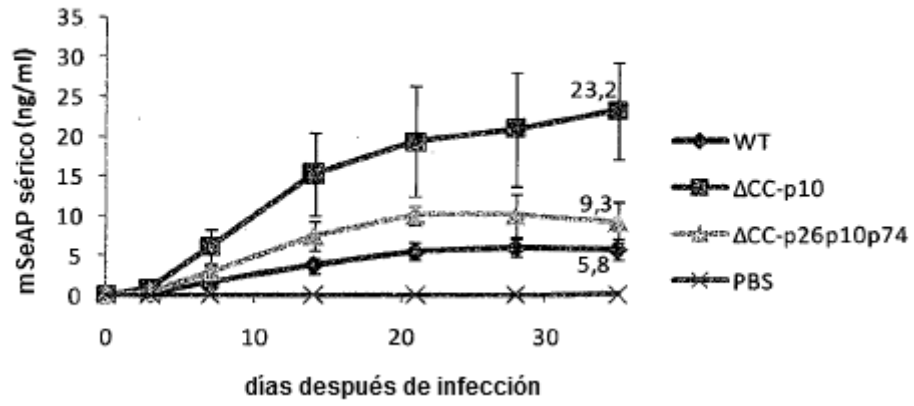


Figura 4^a



Figura 4B

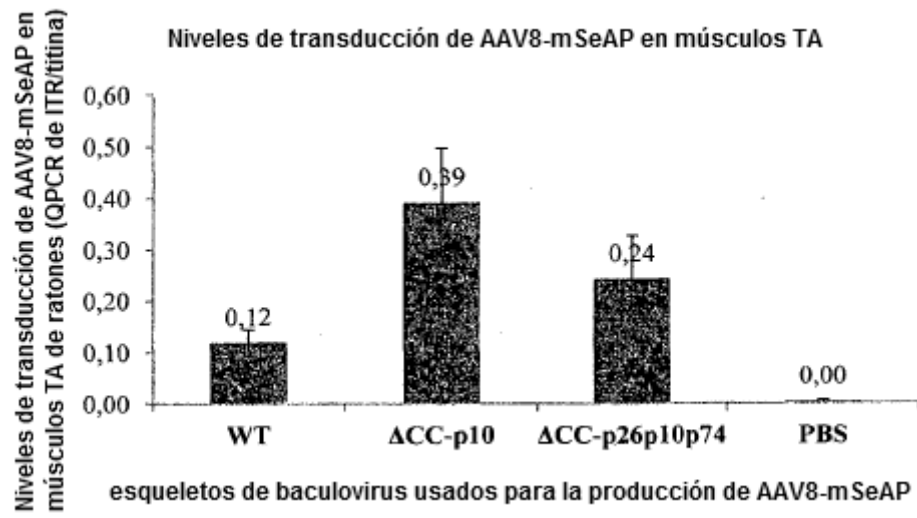


Figura 4c