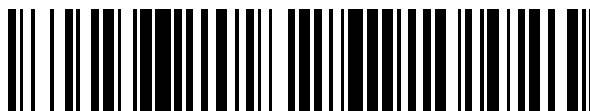


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 278**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/FR2012/051791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12753763 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2737072**

54 Título: **Sistema de baculovirus para expresión de un vector de terapia génica**

30 Prioridad:

27.07.2011 FR 1156878

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

03.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GALIBERT, LIONEL;
MERTEN, OTTO-WILHELM y
JACOB, AURÉLIEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 278 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

Sistema de baculovirus para expresión de un vector de terapia genética

Los virus adenoasociados recombinantes (o rAAV, para recombinant Adeno Associated Virus en inglés) se consideran en la actualidad los vectores virales más prometedores en terapia genética. Sin embargo, su producción a gran escala sigue siendo un factor limitante para el desarrollo de este tipo de terapias. Por lo tanto se han desarrollado sistemas de producción que explotan la capacidad de los baculovirus para infectar células de insecto con el fin de superar este problema, y por razones de bioseguridad (Urabe et ál., 2002; Hum. Gén. Ther. 13: 1935-1943; documento US 20030148506; documento US 20040197895). De acuerdo con el protocolo propuesto originalmente, una infección de las células de insecto con 3 baculovirus diferente era necesaria para proporcionar los genes auxiliares *rep* y *cap* y la construcción que comprende el vector AAV recombinante que contiene el transgén requerido para formar la partícula de virus recombinante. Una simplificación de este sistema consiste en la integración de los genes *rep* y *cap* en un baculovirus único dando como resultado un sistema de producción que utiliza 2 baculovirus (bac *rep/cap* y bac-transgén) (Smith et ál., 2009; Mol. Ther. 17: 1888-1896). Además, el grupo de Sergei Zolotukhin (Aslanidi et ál., 2009; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 206: 5059-5064 y documento WO 2010/114948) ha desarrollado recientemente líneas celulares Sf9 transformadas de manera estable con los genes *rep* y *cap*. Con una línea celular de ese tipo, la infección con un solo baculovirus (que comprende en su genoma el gen terapéutico de interés flanqueado por ITR de un AAV) podría permitir la obtención de un AAV recombinante. Sin embargo, este sistema tiene varios inconvenientes. Por un lado, la generación de clones celulares es tediosa y los clones obtenidos a menudo se caracterizan por una inestabilidad genética que da como resultado una ventana de explotación limitada en el tiempo. Además, se ha observado una alta frecuencia de empaquetamiento de ADN extraño que no coincide con el vector de interés (secuencias de *rep*, *cap* y de genes de resistencia a un antibiótico), lo que plantea un problema significativo en términos de bioseguridad. Por lo tanto, los clones de este tipo son inadecuados para la producción de lotes de vectores destinados a un uso clínico.

Todos los baculovirus utilizados en los estudios mencionados anteriormente incluyen la inserción del gen de interés (tanto si se trata de los genes *rep* y/o *cap* como del gen terapéutico de interés) en el sitio de clonación de polihedrina del genoma de baculovirus. Este sitio se elige clásicamente debido a los altos niveles de expresión susceptibles de ser obtenidos a partir de este locus. Este sitio también se usa en el sistema desarrollado por Luckow et ál., (1993; J. Virol. 67:4566-4579) en donde se inserta un origen de replicación bacteriana, un gen de resistencia a kanamicina y un sitio de clonación mediante recombinación « Tn7 ». Este sistema se denomina bácmido. Sin embargo, la utilización de este único locus constituye un factor limitante, en particular si se desea poder expresar varias secuencias heterólogas de un único baculovirus. Es en este contexto en el que Noad et ál., (2009) compararon el locus clásico - polihedrina (Tn7 del bácmido, presente en el sitio de la polihedrina) - a diferentes sitios de clonación potenciales e identificaron 7 locus adicionales (*ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56*) en el genoma de AcMNPV permitiendo una fuerte expresión de genes heterólogos (Noad et ál., 2009; BMC Molecular Biology 10: 87; documento WO 2010/055292). También se ha mostrado que diferentes genes de clonados en varios de estos locus se pueden expresar de forma simultánea a partir del mismo genoma. Sin embargo, Noad et ál., no mostraron si estos locus alternativos eran eficaces para la producción de AAV recombinante o cualquier otro vector viral recombinante, lo que no era evidente teniendo en cuenta la complejidad de estos vectores virales y las dificultades principales encontradas clásicamente durante su producción.

40 Compendio de la invención

De manera sorprendente, los inventores han podido mostrar que los AAV recombinantes se pueden producir gracias a un baculovirus único.

Por lo tanto, la invención se refiere a un genoma de baculovirus recombinante que comprende secuencias heterólogas que codifican el conjunto de los compuestos necesarios para la producción de un vector viral heterólogo (es decir, los componentes trópicos del vector y su genoma) insertados en locus elegidos entre el grupo que consiste en genes no esenciales del baculovirus que se pueden sustituir con una secuencia de interés sin modificar el funcionamiento del baculovirus.

La invención se refiere en particular a un genoma de baculovirus recombinante que comprende:

- uno o varios casetes de expresión de los genes *rep* y *cap* de AAV necesarios para la producción de un vector AAV, y
- un genoma recombinante de un vector AAV (en lo sucesivo también denominado genoma heterólogo),

dichos casetes de expresión y dicho genoma recombinante de un vector AAV siendo insertados en uno o varios locus elegidos entre el grupo que consiste en los locus *egt*, *polihedrina*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*, *p10* y *p94*,

dicho genoma recombinante de un vector AAV siendo insertado en un locus diferente al o los locus utilizados para los genes *rep* y *cap* de AAV. De acuerdo con una variante, dichos genes *rep* y *cap* están contenidos en un casete de expresión único, en particular en orientación inversa, siendo dicho casete insertado de forma más particular en el

locus *egt*. En un modo particular de realización, dicho genoma recombinante de un vector AAV se inserta a nivel del locus de *polihedrina*.

5 Los genomas de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención se pueden obtener en particular a partir del baculovirus AcMNPV. Además, el genoma de baculovirus recombinante de la invención también puede tener como característica ser deficiente para los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*.

El genoma de AAV puede comprender un gen heterólogo que codifica una proteína, un ARN de interferencia o un ARN antisentido, en particular terapéutico (para permitir la producción de un vector viral de terapia genética).

De acuerdo con un modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante es un báculo recombinante.

10 Además, la invención se refiere a un baculovirus recombinante que tiene como genoma un genoma de baculovirus recombinante, en particular un báculo, de acuerdo con la invención.

Además la invención se refiere a un método para producir un baculovirus recombinante, que comprende el cultivo de una célula procariota que contiene el báculo recombinante definido en la presente solicitud en condiciones adaptadas para la producción de un baculovirus.

15 La invención también proporciona una célula eucariota o procariota que contiene el genoma de baculovirus recombinante descrito, o infectada por el baculovirus recombinante de la invención. Dicha célula puede ser en particular una célula de mamífero (por ejemplo una célula HEK293) o una célula de insecto obtenida a partir de las líneas de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni* (por ejemplo las células Sf21, Sf9, TN 5B1-4 o High Five).

20 Además la invención se refiere a un método para producir un AAV recombinante que comprende la puesta en cultivo del baculovirus recombinante que comprende las secuencias necesarias para la producción de los compuestos proteicos y genéticos de un AAV, con una célula, en particular una célula de insecto (por ejemplo una célula Sf9, Sf21, TN 5B1-4 o High Five), susceptible de ser infectada por dicho baculovirus, en condiciones que permiten la infección de la célula por el baculovirus y la producción de dicho AAV recombinante.

Leyendas de las figuras

25 **Figura 1.** Sistema Monobac para la producción de vectores rAAV.

El báculo de AcMNPV ser inactivo para los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*. El casete de expresión de los genes de AAV, *rep2* y *cap8*, se insertó en el genoma del báculo en el locus ecdiesterioideo de la UDP-glucosiltransferasa (*egt*), dejando de ese modo el sitio de transposición tn7 del báculo libre para la inserción genoma de AAVr. Un solo baculovirus permite de ese modo producir partículas de AAVr en células de insectos.

30 **Figura 2.** Estudio del efecto del locus para la expresión de los genes de AAV *rep2* y *cap8*.

La expresión de las proteínas de AAV Rep2 y Cap8 fue seguida por transferencia de Western a partir de baculovirus que expresan estas proteínas desde el casete de expresión insertado en el sitio Tn7 del báculo o en el locus *egt*, 3 días después de la infección de las células Sf9. La estandarización de la expresión de las proteínas se sigue midiendo la expresión de la proteína de baculovirus P35.

35 Monobac C1 y C2: Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT).

Δ CCP-SR660 C1 y C2: Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (Tn7).

WT-SR660 C1: AcbacWT.

T+ AAV8 volumen: control positivo de producción de AAV8-mSeAP.

Δ CC Δ p10: báculo que sufre delección de los genes de *catepsina*, *quitinasa* y *p10*.

40 Acbac: báculo obtenido a partir de AcMNPV.

Figura 3. Estudio del efecto del locus para la expresión de los genes de AAV *rep2* y *cap8*.

La expresión de las proteínas de AAV Rep2 y Cap8 fue seguida por transferencia de Western a partir de baculovirus que expresan estas proteínas desde el casete de expresión insertado en el sitio Tn7 del báculo o en el locus *egt*, 3 días después de la infección de las células Sf9. La estandarización de la expresión de las proteínas se sigue midiendo la expresión de la proteína de baculovirus P35.

45 midiendo la expresión de la proteína de baculovirus P35.

Monobac C1 y C2: Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT).

Monobac Seap C1 y C2: Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT)-mSeAP (Tn7).

T+ AAV8 volumen: control positivo de producción de AAV8-mSeAP.

Figura 4. Productividad de AAVr.

La productividad de AAVr en el sistema monobac se evaluó. Los resultados se presentan en titulación de AAVr (vg/ml - vector de genoma/ml). Se utilizaron 4 replicados por experimento, la barra de error representa la distancia tipo.

Figura 5. Productividad de AAVr después de purificación mediante inmunoafinidad.

La productividad de AAVr en el sistema monobac se evaluó después de purificación. Los resultados se presentan en titulación de AAVr (vg/ml - vector de genoma/ml).

Figura 6. Perfil proteico de los vectores AAVr purificados.

El perfil proteico de los vectores AAVr se evaluó después de purificación mediante inmunoafinidad. Se analizaron 5 x 10¹⁰ vg de AAVr por SDS-PAGE coloreado con azul de Coomassie.

(1) AAV8-mSeAP producido con los baculovirus de tipo silvestre. 1^{er} baculovirus bacWT-rep2/cap8 (Tn7), 2^o baculovirus bacWT- mSeAP. (2) AAV8-mSeAP producido con los baculovirus que sufrieron delección para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*. 1^{er} baculovirus bacΔCCΔp10-rep2/cap8 (Tn7), 2^o baculovirus bacΔCCΔp10- mSeAP. (3) AAV8-mSeAP producido con los baculovirus que sufrieron delección para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*. 1^{er} baculovirus bacΔCCΔp10-rep2/cap8 (EGT), 2^o baculovirus bacΔCCΔp10- mSeAP. (4) AAV8-mSeAP producido con el baculovirus que sufrió delección para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*. Un solo baculovirus utilizado bacΔCCΔp10-rep2/cap8 (EGT)-mSeAP (Tn7).

Descripción detallada de la invención

La producción de un vector viral, en particular un vector viral de terapia genética, necesita la expresión en una misma célula de numerosos compuestos del vector viral. Por ejemplo, en el caso de la producción de un AAV recombinante en una célula de insecto, es necesario producir en la célula:

- un genoma recombinante de AAV Que comprende una ITR (para Inverted Terminal Repeat en inglés) en la posición 5', y un casete de expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés (al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés bajo el control de un promotor eficaz para la expresión de dicho gen en una célula diana que se define a continuación, y una ITR en la posición 3';

y

- los productos de los genes *rep* y *cap* de AAV.

Los inventores han desarrollado un sistema de expresión de baculovirus para facilitar la producción de vectores virales, en el sentido de que un baculovirus único se utiliza para infectar las células hospedadoras producidas del vector viral.

La presente solicitud se refiere en particular a un genoma de baculovirus recombinante que comprende uno o varios casetes de expresión de los componentes proteicos necesarios para la producción de un vector viral heterólogo, y un genoma recombinante de un vector viral heterólogo (o genoma heterólogo), dichos casetes de expresión y dicho genoma heterólogo siendo insertados en uno o varios locus elegidos entre el grupo que consiste en los genes no esenciales del baculovirus que se pueden sustituir con una secuencia de interés sin modificar el funcionamiento del baculovirus.

En el contexto de la presente invención, los "genes no esenciales del baculovirus" se definen como genes que se pueden inactivar por eliminar del genoma del baculovirus, sin modificar su capacidad de desarrollarse en cultivo de células de insecto. Estos genes son genes que intervienen de forma específica en la producción de los ODV (Occlusion Derived Virus) o de los genes necesarios para la manipulación del insecto hospedador en el entorno, pero no necesaria en la escala de células de insecto en cultivo (Cohen et ál., 2009; Virologica Sinica 24 : 359-414). En el contexto de la presente invención, el o los locus se elige o eligen entre el grupo que consiste en los locus *polihedrina*, *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*, dicho locus siendo más particularmente el locus *egt*.

En el contexto de la presente divulgación, por "vector viral heterólogo" se hace referencia a un vector viral que no es un baculovirus. El vector viral heterólogo puede ser en particular un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, en particular un lentivirus o un espumavirus, etc. De forma más específica, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación es susceptible de ser utilizado para la producción de cualquier tipo de vectores virales destinados a su utilización para introducir una secuencia de nucleótidos heteróloga en una célula, un tejido u organismo, en particular un vector viral de objeto terapéutico en el ser humano o en el animal (vector de terapia genética).

En el contexto de la presente invención, por "casete de expresión" se hace referencia a una combinación de elementos necesarios para la expresión de uno o varios genes. Por lo tanto un casete de expresión contiene un promotor adaptado para una expresión en una célula hospedadora, en particular una célula eucariota, de forma más particular una célula de insecto, y una secuencia de poliadenilación. El experto en la materia tiene a su disposición
5 varios casetes de expresión en células eucariotas (en particular de insecto o de mamífero).

Como se ha mencionado anteriormente, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación se puede destinar a la producción de cualquier tipo de vectores virales, en particular vectores virales de terapia genética. Por ejemplo, el genoma de baculovirus recombinante puede comprender uno o varios casetes de expresión de proteínas virales necesarias para la producción de un virus adenoasociado, un adenovirus, un
10 retrovirus, en particular un lentivirus o un espumavirus, etc. Los genes necesarios para la producción de tales partículas virales son bien conocidos por el experto en la materia, que sabrá adaptar el presente genoma de baculovirus recombinante al vector viral en particular que desea producir (Bagnis, Merten, Mezzina (guest editors) 2005 : Advanced methods for industrial production, purification, and characterization of gene vectors. *Gène Ther* 12 (S1): 1-177).

De acuerdo con un modo preferente de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación también comprende un genoma recombinante de vector viral de terapia genética, dicho genoma recombinante de vector viral de terapia genética insertado en un locus del genoma de baculovirus tal como se ha descrito anteriormente. El genoma recombinante de vector viral de terapia genética insertado en el genoma de baculovirus dependerá por supuesto del vector viral de terapia genética a producir *in fine*. Por último,
20 para la producción de un AAV, el genoma recombinante de vector viral de terapia genética será un genoma recombinante de AAV que comprende una ITR en la posición 5', al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés bajo el control de un promotor eficaz en la célula diana del AAV recombinante producido, y una ITR en la posición 3'. Para la producción de un lentivirus, el genoma recombinante de vector viral de terapia genética será un genoma de lentivirus que comprende una LTR en la posición 5', un sitio principal donante de corte empalme, una señal de empaquetamiento que cubre la parte en la posición 5' del gen Gag, el elemento de respuesta a Rev (RRE), el aceptor de corte y empalme de envoltura, al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés bajo el control de un promotor eficaz en la célula diana del lentivirus recombinante producido, y una LTR en la posición 3', en particular una LTR en la posición 3' modificada en vista de la generación de vectores SIN (lentivirus autoinactivante - Self-INactivating).
25

De acuerdo con la invención, el genoma de baculovirus recombinante que se describe es un genoma de baculovirus para la producción de un vector AAV.
30

En este sentido, la invención se refiere a un genoma de baculovirus recombinante que comprende uno o varios casetes de expresión de los genes *rep* y/o *cap* de AAV, dichos uno o varios casetes de expresión siendo insertados en un locus elegidos entre el grupo que consiste en los locus *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56*, *p10* y *p94* del genoma de baculovirus. Este genoma de baculovirus recombinante también contiene un genoma recombinante de AAV en un locus elegido entre los locus de *polihedrina*, *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56*, *p10* y *p94* del genoma de baculovirus, dicho genoma recombinante de AAV siendo insertado en un locus diferente al o los locus utilizados para los genes *rep* y *cap* de AAV.
35

En un modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención comprende al menos un casete de expresión de los genes *rep* y/o *cap* de AAV en un locus elegido entre el grupo que consiste en los genes no esenciales del baculovirus que se pueden sustituir con una secuencia de interés sin modificar el funcionamiento del baculovirus. Dicho al menos un casete de expresión de los genes *rep* y/o *cap* de AAV se puede incluir en particular en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*, en particular en el locus *egt*.
40

En otro modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención comprende además un genoma recombinante de AAV. El locus de inserción del genoma recombinante de AAV se elige en particular entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* et *odv-e56*. De acuerdo con un modo particular de realización, el locus elegido para el genoma recombinante de AAV es un locus diferentes del o de los locus elegidos para el o los casetes de expresión de *rep* y/o *cap*. De acuerdo con un modo preferente de realización, el genoma recombinante de AAV se inserta en el locus de *polihedrina* (En particular a nivel del sitio de recombinación Tn7).
45
50

De acuerdo con un primer modo preferente de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención comprende:

- un genoma recombinante de AAV en el locus de *polihedrina*, y

- un casete de expresión de los genes *rep/cap* de AAV En un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*, en particular el locus *egt*.
55

De acuerdo con un segundo modo preferente de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención comprende:

- un genoma recombinante de AAV en el locus *p94*,

- un casete de expresión de los genes *replcap* de AAV en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p10* y *odv-e56*, en particular el locus *egt*.

5 Los casetes de expresión de los genes *rep* y *cap* se eligen en particular en función del Jean de interés a expresar a partir del AAV recombinante producido y del tipo de células a transducir con dicho AAV. El experto en la materia es capaz de seleccionar y producir los casetes de expresión adecuados basándose en sus conocimientos generales. A modo de promotores particulares, se pueden mencionar los promotores de baculovirus precoces/tardíos tales como *gp64*, o promotores de baculovirus muy tardíos tales como los promotores de los genes de polihedrina (P_{Ph}) y *p10* (P_{p10}), si el baculovirus está destinado a infectar células de insecto. Los promotores muy precoces como IE1 (Immédiate Early 1) también se pueden utilizar en el contexto de la invención, con posibilidad de funcionar en células de mamíferos por ejemplo. A modo de secuencias de poliadenilación, se pueden mencionar en particular las secuencias de poliadenilación de la triptófano hidroxilasa (Tph), o de las secuencias de poliadenilación de genes de baculovirus.

15 Los genes *rep* y *cap* se pueden seleccionar de acuerdo con el tipo de AAV recombinante en el que se desea la producción. Se pueden elegir entre los genes *rep* y *cap* de AAV de cualquier serotipo. Los genes *rep* y *cap* pueden estar incluidos en casetes de expresión diferentes o en un casete único. De acuerdo con un modo preferente de realización, un casete de expresión único se utiliza para la expresión de los genes *rep* y *cap*. de acuerdo con una variante de realización, el casete de expresión de los genes *replcap* de AAV comprende dichos genes en orientación inversa. Estos genes en orientación inversa pueden estar en particular cada uno bajo el control de promotores de baculovirus diferentes, en particular promotores muy tardíos diferentes. Por ejemplo, los promotores muy tardíos en cuestión pueden corresponder en particular a los promotores de baculovirus P_{p10} y P_{ph} . De acuerdo con un modo de realización particularmente preferente, el casete de expresión de *rep* y *cap* se produce y se inserta en el genoma de baculovirus recombinante de la invención de acuerdo con los procedimientos que se describen en Smith et ál., 2009; Mol. Ther. 17: 1888-1896. De acuerdo con un modo particular, el casete de expresión corresponde al que se describe en los ejemplos que siguen a continuación, permitiendo la expresión de los productos de los genes *rep2* y *cap8*, y por lo tanto la producción de vectores de AAV recombinantes de tipo rAAV8, que comprenden proteínas de cápside del AAV8, y por lo tanto que presentan el tropismo de este serotipo particular. Este casete de expresión se introduce preferentemente en el genoma de baculovirus por transposición, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en el campo, en particular utilizando el sistema de Bac a Bac comercializado por la compañía Invitrogen.

30 De acuerdo con un modo particular de realización, el casete de expresión de los genes *rep/cap* de AAV se inserta en el locus *egt*, en particular de acuerdo con el método que se describe en los ejemplos.

35 Le genoma recombinante de AAV comprende una ITR (para Inverted Terminal Repeat en inglés) en la posición 5', al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés bajo el control de un promotor eficaz en la célula diana del AAV recombinante producido, y una ITR en la posición 3'. Las ITR se pueden obtener a partir de cualquier serotipo de AAV conocido por el experto en la materia.

40 Por "secuencia de nucleótidos heteróloga de interés", se hace referencia a una secuencia de nucleótidos que no es un gen de baculovirus o un gen de AAV y que, cuando se expresa en una célula de interés (también denominada "célula diana"), permite obtener un efecto deseado. La secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar en particular una proteína, un ARN de interferencia, un ARN anti sentido, un microARN o ARNsn. El efecto deseado puede corresponder en particular a la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga en células o tejidos de un paciente. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos heteróloga se puede administrar en particular con el fin de obtener un efecto terapéutico. En este sentido, el AAV recombinante producido se podrá utilizar como vector de terapia genética. La secuencia de nucleótidos heteróloga también podrá permitir la producción de una proteína terapéutica, por ejemplo una proteína deficiente en una enfermedad, o un ARN de interferencia en células que necesitan la disminución de la expresión de una proteína anómala, o un ARNsn (ARN nuclear pequeño) implicado en la eliminación de un exón mutado responsable de la no funcionalidad de una proteína.

50 La célula diana corresponde a cualquier célula en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga puede tener interés, en particular terapéutico. El promotor presente en el genoma de AAV será por lo tanto un promotor que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga en la célula diana. Este promotor puede ser constitutivo, inducible o específico de una célula o de un tejido particular.

Por supuesto, el experto en la materia está familiarizado con los conceptos de la terapia genética y adaptar a los elementos constitutivos de la presente invención a sus necesidades.

55 El genoma de baculovirus recombinante también puede comprender cualquier secuencia de AAV que permita una mejora de la candidata de la calidad del AAV recombinante. En este sentido se puede mencionar la inserción, en uno de los locus mencionados anteriormente, del gen que codifica la proteína AAP (o Assembly Activating Protein en inglés - Sonntag et ál., Proc Natl Acad Sci USA. 1 de junio de 2010; 107 (22): 10220-5).

De acuerdo con una segunda variante de la invención, el genoma de baculovirus recombinante que se describe es un genoma de baculovirus para la producción de un vector lentiviral.

En este sentido, la presente divulgación también se refiere a un genoma de baculovirus recombinante que comprende uno o varios casetes de expresión de los genes *gag/pol*, *rev* de lentivirus (por ejemplo, que proviene de VIH-1) y/o *env* elegido entre el tropismo deseado, pero de preferencia la proteína G que proviene del virus de la estomatita vesicular (VSV-G), dichos uno o varios casetes de expresión siendo insertados en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56*, *p10* y *p94* del genoma de baculovirus. Este genoma de baculovirus recombinante también contiene de preferencia un genoma recombinante de lentivirus en un locus elegido entre los locus de *polihedrina*, *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *odv-e56*, *p10* y *p94* del genoma de baculovirus, dicho genoma recombinante de lentivirus siendo insertado en un locus diferente del o de los locus utilizados para los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env*.

En un modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende al menos un casete de expresión de los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env* en un locus elegido entre el grupo que consiste en los genes no esenciales del baculovirus que se pueden sustituir con una secuencia de interés sin modificar el funcionamiento del baculovirus. Dicho o al menos un casete de expresión de los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env* se pueden incluir en particular en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*.

En otro modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende además un genoma recombinante de lentivirus. El locus de inserción del genoma recombinante de lentivirus se elige en particular entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *egt*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*. De acuerdo con un modo particular de realización, el locus elegido para el genoma recombinante de lentivirus es un locus diferente del o de los locus elegidos para el o los casetes de expresión de *gag/pol*, *rev* y/o *env*. De acuerdo con un modo preferente de realización, el genoma recombinante de lentivirus se inserta en el locus de *polihedrina* (en particular a nivel del sitio de recombinación Tn7).

De acuerdo con un primer modo preferente de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende:

- un genoma recombinante de lentivirus en el locus de *polihedrina*, y
- un casete de expresión de los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env* en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p94*, *p10* y *odv-e56*.

De acuerdo con un segundo modo preferente de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la presente divulgación comprende:

- un genoma recombinante de lentivirus en el locus *p94*,
- un casete de expresión de los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env* en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus de *polihedrina*, *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2*, *p10* y *odv-e56*.

Los casetes de expresión de los genes *gag/pol* y *rev* de lentivirus así como el gen *env* se eligen en particular en función del gen de interés a expresar a partir del lentivirus recombinante producido y del tipo de células a transducir con dicho lentivirus. El experto en la materia es capaz de seleccionar y producir los casetes de expresión adecuados basándose en sus conocimientos generales. A modo de promotores particulares, se pueden mencionar los promotores de baculovirus precoces/tardíos tales como gp64, o promotores de baculovirus muy tardíos tales como los promotores de los genes de *polihedrina* (P_{Ph}) y *p10* (P_{p10}), si el baculovirus está destinado a infectar células de insecto. Los promotores muy precoces como IE1 (Immédiate Early 1) también se pueden utilizar en el contexto de la invención, con posibilidad de funcionar en células de mamíferos por ejemplo. A modo de secuencias de poliadenilación, se pueden mencionar en particular las secuencias de poliadenilación de la triptófano hidroxilasa (Tph), o de las secuencias de poliadenilación de genes de baculovirus.

Por "secuencia de nucleótidos heteróloga de interés", se hace referencia a una secuencia de nucleótidos que no es un gen de baculovirus o un gen del lentivirus y que, cuando se expresa en una célula de interés (también denominada "célula diana"), permite obtener un efecto deseado. La secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar en particular una proteína, un ARN de interferencia, un ARN anti sentido, un microARN o ARNsn. El efecto deseado puede corresponder en particular a la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga en células o tejidos de un paciente. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos heteróloga se puede administrar en particular con el fin de obtener un efecto terapéutico. En este sentido, el lentivirus recombinante producido se podrá utilizar como vector de terapia genética. La secuencia de nucleótidos heteróloga también podrá permitir la producción de una proteína terapéutica, por ejemplo una proteína deficiente en una enfermedad, o un ARN de interferencia en células que necesitan la disminución de la expresión de una proteína anómala, o un ARNsn (ARN nuclear pequeño) implicado en la eliminación de un exón mutado responsable de la no funcionalidad de una proteína.

La célula diana corresponde a cualquier célula en la que la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga pueda tener un interés, en particular terapéutico. Por lo tanto, el promotor presente en el genoma de lentivirus será un promotor que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos heteróloga en la célula diana. Este promotor puede ser constitutivo, inducible o específico de una célula o de un tejido en particular.

Por supuesto, el experto en la materia está familiarizado con los conceptos de la terapia genética y adaptar a los elementos constitutivos de la presente invención a sus necesidades.

El genoma de baculovirus recombinante se puede obtener a partir de cualquier baculovirus que comprenda el locus de *polihedrina* (o equivalente), y al menos uno o varios de otros locus que se al mencionado anteriormente (o uno o varios locus equivalentes).

De acuerdo con un modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la invención es un bÁcrido. En el contexto de la presente invención, un "bÁcrido" es un genoma de baculovirus que comprende elementos genéticos que permiten el mantenimiento y la amplificación de un genoma de baculovirus en una célula procariota. En particular puede comprender un origen de replicación bacteriana, un gen de selección, en particular un gen de resistencia a un antibiótico tal como la kanamicina, y un sitio de clonación mediante recombinación tal como de « Tn7 » insertados en un locus de baculovirus tal como el locus de *polihedrina*. De acuerdo con una variante, el bÁcrido recombinante de acuerdo con la invención comprende un origen de replicación, un gen de resistencia a la kanamicina y un sitio de clonación mediante recombinación de Tn7 en el locus de *polihedrina* (en particular el bÁcrido AcMNPV que se describe en Luckow et ál., 1993; J. Virol. 67: 4566-4579). Por lo tanto, el genoma de baculovirus recombinante puede corresponder a una secuencia capaz de replicarse en células de insecto y en un organismo procariota tal como *E. coli*. En particular, se puede utilizar cualquier genoma de baculovirus que comprenda una construcción de ADN que permita el mantenimiento del genoma en un organismo procariota, en particular un replicón de BAC. De acuerdo con un aspecto preferente, el genoma de baculovirus de la invención se obtiene a partir de un esqueleto de AcMNPV o SpliNPV. La posición de los locus genéticos *ctx*, *egt*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56* en la secuencia de referencia de AcMNPV (número de registro NC001623) se describen en particular en la tabla 1 de la solicitud internacional WO 2010/055292. Con respecto a los locus genéticos *p94* y *p10*, su posición se presenta en la Figura 1 (secuencia de referencia AcMNPV - número de registro NC001623).

De acuerdo con un modo particular de realización, el genoma de baculovirus recombinante se obtiene a partir de AcMNPV y comprende una delección de los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*. Por lo tanto, de acuerdo con este modo de realización, la invención se refiere a un genoma de baculovirus de AcMNPV recombinante desprovisto de los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10* y que comprende un casete de expresión de los genes *replcap* de AAV en un locus elegido entre el grupo que consiste en los locus *egt*, *polihedrina*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*, *p10* y *p94*, en particular el locus *egt*.

En una variante de este modo de realización, el bÁcrido comprende además un genoma recombinante de AAV en el locus de *polihedrina* (Tn7 del bÁcrido).

En otra variante de este modo de realización, el genoma de baculovirus comprende además un genoma recombinante de AAV en el locus *p94*.

La delección de los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10* en el esqueleto del baculovirus permite una producción altamente eficaz de vectores AAV, permitiendo una reducción de la degradación proteolítica, en particular de las proteínas VP1 y VP2, y por lo tanto un aumento de la capacidad de infección y de la eficacia *in vivo*. La delección de estos genes se puede realizar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. De forma más particular se utilizará el método que se describe en los ejemplos realizando el proceso de recombinación homóloga (Datsenko y Wanner, 2000; Proc Natl Acad Sci USA. 97 (12): 6640-6645) en bacterias *E. coli* que contienen el bÁcrido a modificar (en particular el bÁcrido AcMNPV que se describe en Luckow et ál., 1993; J. Virol. 67: 4566-4579).

De acuerdo con un modo particular de realización, los genes *qui/v-cat* (nucleótidos 105282-107954 de acuerdo con el mapa genético de AcMNPV (Ayres et ál., 1994)) y *p10* (nucleótidos 118839-119121) se someten a delección.

De acuerdo con una variante del modo de realización que comprende una delección de los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*, la delección del gen *p10* no va acompañada por una delección del promotor del gen *p10*. En otras palabras, el genoma de baculovirus recombinante deficiente para los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10* comprende un promotor P_{p10} funcional (que corresponde a los nucleótidos 118739-118836 del mapa genético de AcMNPV).

De acuerdo con otra variante del modo de realización que comprende una delección de los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*, la delección del gen *p10* va acompañada por una delección de los genes *p26* y *p74* adyacentes. De acuerdo con un aspecto particular de este modo de realización, la delección de los genes *p26*, *p10* y *p74* corresponde a los nucleótidos 118044-121072 del mapa genético de AcMNPV (Ayres et ál., 1994).

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a la un baculovirus recombinante que comprende un genoma que corresponde al genoma de baculovirus que se ha descrito anteriormente. De acuerdo con un modo preferente de realización, un baculovirus recombinante comprende un genoma que corresponde al bÁcrido recombinante que se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para producir un baculovirus de acuerdo con la invención, que comprende el cultivo de una célula procariota que contiene el bÁcrido recombinante que se ha definido anteriormente en condiciones adaptadas para la producción de un baculovirus. Estas condiciones son bien conocidas por el experto en la materia (Smith et ál., 2009, mencionado anteriormente; Luckow et ál., 1993, mencionado anteriormente).

5

De acuerdo con un cuarto aspecto, la invención se refiere a una célula eucariota o procariota que contiene el genoma de baculovirus que se ha definido anteriormente. En particular la célula puede ser una célula eucariota de mamífero o de insecto, en particular una célula de insecto que ha sido infectada por un baculovirus recombinante tal como se ha definido anteriormente.

10 Entre las células de insecto, serán preferentes las células obtenidas a partir de las líneas de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*, por ejemplo las células Sf21, Sf9, High five o TN 5B1-4. Entre las células de mamífero, en particular se podrá mencionar la línea HEK293, conocida por ser susceptible de ser infectada por un baculovirus. En este último caso, el promotor o promotores presentes en el casete de expresión de los genes *rep* y *cap* se adaptará o adaptarán para una expresión en células de mamífero. En particular se puede mencionar el promotor de CMV y otros promotores bien conocidos en la materia.

15

De acuerdo con un quinto aspecto, la invención se refiere además a un método para producir un vector viral, en particular de terapia genética, que comprende la puesta en cultivo del baculovirus recombinante que se ha definido anteriormente con una célula, en particular una célula de insecto o una célula de mamífero, en condiciones que permiten la infección de la célula por el baculovirus y la producción de dicho vector viral.

20 Con respecto a la producción de los vectores con envoltura (tales como los vectores retrovirales), se trata de una célula de mamífero (por ejemplo, una célula HEK293).

El método de acuerdo con la invención es un método para producir un AAV recombinante que comprende la puesta en cultivo del baculovirus recombinante y se ha definido anteriormente con una célula, en particular una célula de insecto (por ejemplo, una célula Sf21, Sf9, High five o TN 5B1-4), susceptible de ser infectada por dicho baculovirus, en condiciones que permiten la infección de la célula por el baculovirus y la producción de dicho AAV recombinante. Por lo tanto, es posible producir un AAV recombinante a partir de una infección con un baculovirus único. Las condiciones particulares, no limitantes, de producción de un AAV recombinante de acuerdo con la invención se describen en particular en los ejemplos. Por supuesto, el experto en la materia es capaz de adaptar estas condiciones de producción basándose en sus conocimientos generales (Smith et ál., mencionado anteriormente).

25

30 Gracias a este método, se obtiene una producción de AAV recombinante al menos 5 veces superior a la obtenida con un sistema que necesita una infección con dos baculovirus tal como el sistema descrito por Smith et ál.

30

De acuerdo con otro modo particular de realización, en el presente documento se describe un método para la producción de un lentivirus recombinante, que comprende la puesta en cultivo del baculovirus recombinante que se ha definido anteriormente con una célula de mamífero (por ejemplo una célula HEK293), susceptible de ser infectada por dicho baculovirus, en condiciones que permiten la infección de la célula por el baculovirus y la producción de dicho lentivirus recombinante.

35

Los ejemplos que siguen a continuación se proporcionan para ilustrar la invención.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS:

40 Secuencias

Tabla 1: secuencias de cebadores

Cebador	Secuencia de la posición 5' a la posición 3'	Utilización*
EGT-lox-F	TTACGGTCGTC AAGCCAAACTGTTGCGTATTCAACTAAAATTATTGCG GTAATATCACTACCGTTCGIATAGCATACATTATACGAAGTTATAATAGG AACTTCATTTAAATGGCGC (SEQ ID NO:1)	inserción de rep2 / cap8 en el bÁcrido AcMNPV al nivel del locus EGT (11634-12486)

Cebador	Secuencia de la posición 5' a la posición 3'	Utilización*
EGT-SV40-R	TCCCGGCTTCCAAGGCCTCGTCGCTCGATTGTAGTCCGCCCTTGC GTAATAA ACGCCGCCATTTTTATGACGCAGCACGG CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG (SEQ ID NO:2)	inserción de rep2 / cap8 en el bácmido AcMNPV al nivel del locus EGT
EGT-Control	ATGACTATTCTCTGCTGGC (SEQ ID NO:3)	Verificación
EGT-Control 150R	ATTGGCCGTGTTTCCTAC (SEQ ID NO:4)	Verificación
M13 PUC F	CCAGTCACGACGTTGTAAAACG (SEQ ID NO:5)	Verificación de los bácmidos transpuestos
M13 PUC R	AGCGGATAACAATTCACACAGG (SEQ ID NO:6)	Verificación de los bácmidos transpuestos
Genta	AGCCACCTACTCCCAACATC (SEQ ID NO:7)	Verificación de los bácmidos transpuestos
CC-KO-F	CCGCTGTTGAAACAATATTTTATAATACCCGTTTATAGTTAACAATGTCG GCAGCGTCTATGGCCATAGGAATAGGGCCTACCGTTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:8)	inactivación de los genes de quitinasa/catepsina nt 105771-107700
CC-KO-R	CCGCTGTTGAAACAATATTTTATAATACCCGTTTATAGTTAACAATGTCG GCAGCGTCTATGGCCATAGGAATAGGGCCTACCGTTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:9)	inactivación de los genes de quitinasa/catepsina nt 105771-107700
quitinasa-105625F	CGCGGCCGTACATGGCGACGCCA (SEQ ID NO:10)	Verificación
catepsina-107849R	GTTTTTAAAGGTCCAATATGGAATG (SEQ ID NO:11)	Verificación
p10-KO-F	TGTATATTAATAAAATACTATACTGTAAATTACATTTTATTACAATCT ACCGTTTCGTATAGCATACTATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:12)	inactivación de la secuencia que codifica p10 (del codón de inicio al codón de parada) nt 118839 - 119121
P10-KO-R	GAATCGTACGAATATTATAAAACAATTGATTTGTTATTTTAAAAACGATTT ACCGTTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT (SEQ ID NO:13)	inactivación de la secuencia que codifica p10 (del codón de inicio al codón de parada) nt 118839 - 119121
p10-118725-F	CCGGGACCTTTAATTCAACCAACA (SEQ ID NO:14)	Verificación
p10-119259-R	CAGCATTTGTTATACACAGAACT (SEQ ID NO:15)	Verificación

* Clasificación de acuerdo con Ayres et ál., Virology. 1 de agosto de 1994; 202 (2): 586-605.

Delección de genes del baculovirus

La delección de la *catepsina* y de la *quitinasa* en el bácmido AcMNPV de tipo silvestre se realizó a partir de la cepa DH10Bac de *E. coli* que contenía el bácmido AcMNPV (Luckow et ál., 1993, véase anteriormente) y se transformó por pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000, PNAS Vol 97 (12) páginas 6640-6645). Un producto de PCR necesario para la inactivación de los genes de *catepsina/quitinasa* se generó por medio de los cebadores CC-KO-F y CC-KO-R (tabla 1). La inactivación de los genes se realizó siguiendo el método descrito por Marek et ál., 2011 y se evaluó utilizando los cebadores quitinasa-105625F y catepsina-107849R (tabla 1). La supresión del gen marcador *CAT* del bácmido de *catepsina/quitinasa* nulo (Acbac Δ C Δ cat) se realizó de acuerdo con el método descrito por Marek et ál., (Marek et ál., 2011, Biotechnol Bioeng, Vol 108 (5) páginas 1056 -67) y se verificó mediante PCR y secuenciación,

utilizando los cebadores que se han mencionado anteriormente. La inactivación de la secuencia codificante *p10* en Acbac Δ CC Δ cat se realizó de la misma manera, generando un producto de PCR con los cebadores p10-KO-F/p10-KO-R (tabla 1). La verificación de la inactivación correcta del gen se realizó mediante PCR y secuenciación con el par de cebadores p10-118725-F/ p10-119259-R (tabla 1). La última inactivación del gen permite la producción del

5

Inserción del casete rep2/cap8 en el locus egt del b́acmido de AcMNPV

La inserción del casete de expresión de los genes de AAV *rep2* y *cap8* en el locus *egt*, se realizó en el genoma del b́acmido, ya inactivado para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*. El casete de expresión *rep2/cap8* se amplificó por PCR desde el plásmido pSR660, gracias a los cebadores EGT-lox-F y EGT-SV40-R. La inserción de este producto de PCR en el genoma del b́acmido se realizó siguiendo el método descrito por Marek et ál., 2011. En resumen, el casete de expresión *rep2/cap8* se acopló a un gen de resistencia al antibiótico Cloramfenicol, bordeado por las secuencias de *lox66* y *lox71* (Suzuki et ál., 2005; appl Environ Microbiol. 71 (12) 8472-8480). A continuación estos dos elementos genéticos permiten la eliminación de este gen de resistencia, por la acción de la Cre recombinasa, que a continuación se puede utilizar para encadenamientos sucesivos de deleciones o de inserciones de genes en el genoma del b́acmido. El casete que se ha descrito anteriormente se amplifica a continuación por PCR gracias a los cebadores EGT-lox-F y EGT-SV40-R. Este producto de PCR se purificó sobre gel de agarosa y se trató con la enzima de restricción DpnI. A continuación se utiliza para transformar por vía química bacterias competentes que contienen el b́acmido, ya inactivado para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*, el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner 2000). La expresión de los genes del operón Red del fago lambda codificados por el plásmido pKD46 se induce mediante la adición de L-arabinosa a un 0,1 % (Masa/Volumen). Las bacterias recombinantes resistentes al Cloramfenicol se analizaron por PCR para verificar la inserción del casete de expresión de *rep2/cap8* en el genoma del b́acmido ya inactivado para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*, en el locus *egt* se verificó por PCR utilizando los cebadores EGT-Control 150F y EGT-Control 150R (Tabla 1). Esta inserción permitió la obtención del b́acmido Monobac-Acbac Δ CC Δ p10-rep2cap8 (EGT)

10

15

20

25

Inserción del casete rep2/cap8 y del genoma recombinante de AAVr en el b́acmido en el sitio Tn7.

Las bacterias DH10b de *E. coli* que contienen ya sea el b́acmido Acbac Δ CC Δ p10, o el b́acmido Monobac-Acbac Δ CC Δ p10-rep2cap8 (EGT) se transformaron con el plásmido pMON7124 (Luckow et ál., 1993). En estas bacterias, así como en las bacterias DH10bac que contienen el b́acmido Acbac de tipo silvestre (Luckow et ál., 1993), se insertaron mediante recombinación (Luckow et ál., 1993), ya sea el genoma recombinante de AAV que codifica el gen indicador de la *fosfatasa alcalina secretada de murino* (o *murine secreted alkaline phosphatase* (mSeAP) en inglés) bajo el control del promotor de CMV y rodeada de las ITR de AAV; ya sea el casete de expresión de los genes de AAV *rep2* y *cap8*. Estas recombinaciones se realizaron respectivamente a partir de los plásmidos pFBD-mSeAP y pFBD-SR660. Estas recombinaciones permitieron generar los b́acmidos:

30

35

- AcbacWT-rep2/cap8 (Tn7); Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (Tn7) que permite la expresión de los genes *rep2* y *cap8* desde el sitio Tn7.

- AcbacWT-mSeAP (Tn7); Acbac Δ CC Δ p10-mSeAP (Tn7) que contiene el genoma de AAVr que codifica el gen mSeAP en el sitio Tn7 del b́acmido.

- Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (EGT)mSeAP (Tn7) que permite la expresión de los genes *rep2* y *cap8* desde el sitio *egt* y que contiene el genoma de AAVr que codifica el gen mSeAP en el sitio Tn7 del b́acmido.

40

- Por último, el b́acmido Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (EGT) permite la expresión de los genes *rep2* y *cap8* desde el locus *egt* pero que no ha recibido el genoma recombinante de AAVr-mSeAP en el sitio Tn7.

Línea celular, baculovirus y producción de AAVr

Las células Sf9 se mantienen a 27 °C en medio SF900II (Invitrogen) en matraces giratorios con varilla de agitación Bellco un litro. Los baculovirus se generan siguiendo el protocolo de Bac a Bac de Invitrogen, y a continuación se amplifican en cultivos en suspensión de células Sf9, en matraces giratorios con varilla de agitación Bellco de 100 ml. Para producir los vectores AAVr, las células Sf9 se infectan con uno o dos baculovirus que codifican los genes de AAV, *rep2* y *cap8*, y que contienen el casete mSeAP del genoma de AAVr. Por lo tanto 70 ml de células Sf9 a una densidad de 10⁶ células/ml se infectan a una MOI de 0,1 para producir los vectores AAVr. 96 horas después de la producción, se retira una alícuota para efectuar las valoraciones de los vectores AAVr, el resto se conserva a -80 °C.

45

50

Purificación y caracterización de los vectores AAVr.

Los vectores AAVr se purifican desde el conjunto del cultivo celular en una columna de inmutafinidad de AVB Sepharose (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones de Smith et ál., 2009. Los vectores AAVr purificados se analizan (5 x 10⁺¹⁰ vg) sobre gel de poliacrilamida « SDS-PAGE » (sistema NuPAGE de Invitrogen). Después de la migración el gel se colorea con azul de Coomassie.

55

Determinación de las titulaciones en genomas virales de los vectores AAVr.

5 Con el fin de determinar la titulación de genomas virales (vg) de los vectores AAVr producidos, se realiza una extracción de ADN directamente desde el conjunto del cultivo celular, o bien desde las muestras de ensayo de vectores AAVr purificados. Esta extracción se realiza utilizando el sistema MagNA Pure DNA y el kit de volumen pequeño de NA viral (MagNA Pure 96, Roche). Una PCR cuantitativa en tiempo real se realiza a continuación, con cebadores que hibridan las ITR del AAV. La cuantificación absoluta se realiza con respecto a un plásmido de referencia que contiene las recetas amplificadas mediante PCR cuantitativa y por lo tanto se conoce el número de copias. Las titulaciones se realizan en el mismo momento, sobre la misma placa y en las mismas condiciones y con un operador independiente, con el fin de reducir al máximo la variabilidad experimental.

10 Detección de las proteínas mediante Transferencia de Western

15 Las muestras de ensayo de cultivo que contienen dos vectores AAVr o muestras de ensayo purificadas, se analizan mediante transferencia de Western con el fin de detectar la presencia de las proteínas VP y de las proteínas Rep de AAV. La revelación de las proteínas se realiza siguiendo el método desarrollado por LI-COR, con un aparato Odyssey y el software Odyssey 2.1. Los anticuerpos primarios utilizados son, el clon B1 anti VP IgG1 de ratón (Progen) para la detección de las proteínas VP y el clon 303.9 de ratón de anti Rep IgG1 (Progen) para la detección de las Rep. Estos anticuerpos se utilizan respectivamente a una dilución de 1/250^o y 1/100^o en un tampón « tampón de bloqueo de Sistema de formación de imágenes con infrarrojos », LI-COR. Los anticuerpos secundarios de cabra utilizados se dirigen contra los anticuerpos primarios y se acoplan al fluorocromo « Colorante 680 » de LI-COR. La proteína de baculovirus P35 también se detecta mediante un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario acoplado al « Colorante 800 » de LI-COR.

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias observadas para las titulaciones de AAVr obtenida durante la producción se analizó. Un ensayo de Fisher se realizó con el fin de determinar la igualdad de las dos varianzas. A continuación se realizó un ensayo de Student. Para estos análisis se usó el software Excel.

25 RESULTADOS

Generación de un baculovirus expresa, en el locus *egt*, los genes de AAV *rep2* y *cap8*.

30 Para insertar los genes de AAV *rep2* y *cap8* en el genoma del báculo de AcMNPV, se utilizó un genoma de báculo ya modificado. Los inventores han mostrado previamente que la utilización de un báculo inactivado para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10* reducía la proteólisis de la cápside de AAVr para ciertos serotipos. Por lo tanto la inserción de los genes de AAV *rep2* y *cap8* en el locus *egt* se realizó en el báculo Acbac Δ CC Δ p10, siguiendo la metodología desarrollada por Marek et ál., 2011 (Figura 1.). Esta inserción se verificó por PCR y secuenciación. Dio lugar a la creación del báculo Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT). Este báculo siempre dispone del sitio clásico de clonación mediante recombinación, el Tn7 (Luckow et ál., 1993), en el que se pudo insertar el genoma de AAVr que expresa el gen de la mSeAP y generando de ese modo la construcción Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT)SeAP (Tn7). De forma paralela se generaron controles de báculos, con la inserción, en el sitio Tn7, del genoma de AAVr o del casete de expresión de los genes de AAV *rep2* y *cap8*. Estos controles de báculos se generaron sobre un fondo genético modificado o sobre el fondo genético inactivado para los genes de *quitinasa*, *cathepsina* y *p10*.

40 Después de recombinación, los ADN de báculo se extrajeron y se purificaron siguiendo el protocolo de Bac a Bac (Invitrogen) y la ausencia de báculo no recombinante se verificó por PCR. Los báculos se transfectar o no en las células Sf9, se purificaron sobre placa mediante periodo de lisis y se amplificaron. Entre todas las construcciones no se observó ninguna diferencia en términos de titulación de baculovirus (pfu/ml).

La inserción de los genes de AAV *rep2* y *cap8* en el locus *egt* permite su expresión

45 En primer lugar, la capacidad de generar el baculovirus Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT) en células Sf9, sin modificar la titulación viral, confirma la posibilidad de insertar un casete de inserción genética del locus *egt* sin modificar la viabilidad del baculovirus, como fue observado anteriormente por Noad et ál., 2009.

50 El nivel de expresión de las proteínas se puede modificar siguiendo el sitio de inserción de la gente en el genoma del baculovirus (Noad et ál., 2009). Por lo tanto el locus *egt* se eligió para insertar el casete de expresión *rep2/cap8* sobre la base de una equivalencia de expresión en comparación con la expresión dirigida desde el sitio Tn7 (Noad et ál., 2009).

Como se observa en la figura 2, las proteínas Rep y VP de AAV se expresan a niveles comparables, tanto si el casete de expresión se insertan el locus *egt* como en la construcción Acbac Δ CC Δ p10-*rep2cap8* (EGT) (Figura 2, MB C1 y C2) o en el sitio Tn7 para las construcciones de Acbac Δ CC Δ p10 y AcbacWT (Figura 2, Δ CCP-SR660 C1 y C2; WT-SR660 C1 y C2).

Después de la inserción del genoma de AAVr mSeAP en el sitio Tn7 del bácmido (Acbac Δ CC Δ p10- rep2cap8 (EGT)SeAP (Tn7)), la expresión de los genes *rep2* y *cap8* permanece equivalente a la observada para este mismo baculovirus que no contiene el genoma del AAVr (Figura 3).

La producción de AAVr par un solo baculovirus mejora la productividad celular

- 5 Se realizaron producciones de AAVr en matraces giratorios con varilla de agitación en condiciones idénticas. A continuación se determinaron las titulaciones de AAVr y se indican en la figura 4. La producción clásica con 2 baculovirus (Smith et ál., 2009) utilizando los baculovirus AcbacWT-rep2/cap8 (Tn7) y AcbacWT-mSeAP (Tn7) permite a los inventores o tener una titulación de $1,44 \times 10^{10}$ vg/ml de AAVr. La producción equivalente utilizando esta vez los baculovirus inactivados para los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10*, Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (Tn7) y Acbac Δ CC Δ p10-mSeAP (Tn7) permite obtener titulaciones de $2,23 \times 10^{10}$ vg/ml. Estos resultados son del mismo orden de magnitud que los obtenidos para producciones realizadas con el genoma del bácmido no modificado. Con el fin de verificar el efecto en el locus del desplazamiento del casete de expresión *rep2/cap8* del sitio Tn7 al locus *egt*, se realizaron producciones con el baculovirus Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (EGT) y el baculovirus Acbac Δ CC Δ p10- mSeAP (Tn7). La titulación obtenida es de $4,63 \times 10^{10}$ vg/ml de AAVr, es decir una duplicación de la titulación obtenida en comparación con las producciones en las que el casete *rep2/cap8* se inserta en el sitio Tn7 ($p = 0,005$). Este resultado muestra un efecto del locus positivo para la producción de AAVr cuando el casete de expresión *rep2/cap8* se inserta en el locus *egt* en lugar del sitio Tn7. Por último, la producción de AAVr utilizando un solo baculovirus,
- 10 Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (EGT)-mSeAP (Tn7) condujo a un $9,4 \times 10^{10}$ vg/ml permitiendo de ese modo un aumento de un factor de 6,5 ($p = 0,006$) de la productividad en comparación con la producción de AAVr realizada con dos baculovirus AcbacWT-rep2/cap8 (Tn7) y AcbacWT-mSeAP (Tn7). Después de la purificación de los vectores producidos, siempre se encuentra un factor de aumento de 4 a favor de la producción de AAVr realizado con un solo baculovirus, Acbac Δ CC Δ p10-rep2/cap8 (EGT)-mSeAP (Tn7), en comparación con la producción de AAVr realizada con dos baculovirus AcbacWT-rep2/cap8 (Tn7) y AcbacWT-mSeAP (Tn7) (Figura 6).
- 15 Además, el análisis del perfil proteico de los vectores AAV recombinantes purificados muestra la desaparición de bandas de degradaciones de la cápside de AAV recombinante asociadas a la actividad de Catepsina de baculovirus (Figura 6). Estas bandas son visibles para los vectores de AAV producido con el baculovirus de tipo silvestre (Figura 6, pista 1). Estas bandas de degradación ya no se presentan en los vectores de AAV recombinante producidos con los baculovirus para los que los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10* se eliminan del genoma del baculovirus (Figura 6 pistas 2; 3; 4). Esta disminución de la degradación de los vectores de AAV recombinante se asocia a un aumento de la capacidad de infección *in vivo* para estos vectores.
- 20
- 25
- 30

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genethon

<120> SISTEMA DE BACULOVIRUS PARA EXPRESIÓN DE UN VECTOR DE TERAPIA GENÉTICA

5 <130> B1215PC00

<160> 15

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 1
 ttacggtcgt caagcccaaa ctgtttgcgt attcaactaa aacttattgc ggtaatatca 60
 ctaccgttcg tatagcatac attatacga gttataatag gaacttcatt taaatggcgc 120

<210> 2
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador

30 <400> 2
 tcccggcttc caaggcctcg tcgctcgatt gtagtccgcc ttgcgtaata aacgccgcca 60
 ttttttatg acgcagcacg gcagacatga taagatacat tgatgagttt g 111

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <400> 3
 atgactattc tctgctgc 19

45 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 attggccgtg ttcctac 18

55 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

60

ES 2 666 278 T3

<220>
 <223> cebador

5 <400> 5
 ccagtcacga cggtgtaaaa cg 22

<210> 6
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 6
 agcggataac aatttcacac agg 23

<210> 7
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 7
 agccacctac tccaacatc 20

<210> 8
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 8
 ccgctgttga aacaatattt tataatacc tgtttatagt taacaatgtc ggcagcgtct 60

40 atggccatag gaatagggcc taccgttcgt ataatgatg ctatacgaag ttat 114

<210> 9
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 9
 ccgctgttga aacaatattt tataatacc tgtttatagt taacaatgtc ggcagcgtct 60

50 atggccatag gaatagggcc taccgttcgt ataatgatg ctatacgaag ttat 114

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

60 <400> 10
 cgcgccgta catggcgacg ccca 24

ES 2 666 278 T3

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 10 <400> 11
 gttttaaag gtccaatag gaatg 25

 <210> 12
 <211> 84
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 20 <400> 12
 ttgtatatta attaaaatac tataactgtaa attacatttt attacaatc taccgttcgt 60
 atagcataca ttatacgaag ttat 84

 <210> 13
 <211> 84
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> cebador

 <400> 13
 gaatcgtacg aatattataa aacaattgat ttgttatttt aaaaacgatt taccgttcgt 60
 ataatgtatg ctatacgaag ttat 84

 35 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador

 <400> 14
 45 ccgggacctt taattcaacc caaca 25

 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> cebador

 <400> 15
 55 cagcattgt tatacacaca gaact 25

REIVINDICACIONES

1. Genoma de baculovirus recombinante que comprende:
 - uno o varios casetes de expresión de los genes *rep* y *cap* de AAV necesarios para la producción de un vector AAV, y
- 5 - un genoma recombinante de un vector AAV,
dichos casetes de expresión y dicho genoma recombinante de un vector AAV siendo insertados en uno o varios locus elegidos entre el grupo que consiste en los locus *egt*, *polihedrina*, *ctx*, *39k*, *orf51*, *gp37*, *iap2* y *odv-e56*, *p10* y *p94*, dicho genoma recombinante de un vector AAV siendo insertado en un locus diferente al o los locus utilizados para los genes *rep* y *cap* de AAV.
- 10 2. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, dichos genes *rep* y *cap* estando contenidos en un casete de expresión único, en particular en orientación inversa, estando dicho casete insertado más particularmente en el locus *egt*.
3. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, el o los casetes de expresión de los genes *rep* y *cap* de AAV comprendiendo un promotor de baculovirus muy tardío, tal como el promotor del gen de *polihedrina* o el promotor del gen *p10*.
- 15 4. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, dicho genoma recombinante de un vector AAV siendo insertado al nivel del locus de *polihedrina*.
5. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:
 - dicho genoma de baculovirus se obtiene a partir de AcMNPV; y/o
- 20 - en el que los genes de *quitinasa*, *catepsina* y *p10* se someten a delección.
6. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en el que el genoma recombinante de AAV comprende un gen heterólogo que codifica una proteína, un ARN de interferencia o un ARN antisentido, en particular terapéutico.
7. Genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, dicho genoma de baculovirus recombinante siendo un bÁcmido.
- 25 8. Baculovirus recombinante que contiene un genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a modo de genoma.
9. Método para producir un baculovirus recombinante, que comprende el cultivo de una célula procariota que contiene el bÁcmido recombinante definido en la reivindicación 7 en condiciones adaptadas para la producción de un baculovirus.
- 30 10. Célula eucariota o procariota que contiene el genoma de baculovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o célula eucariota infectada con el baculovirus recombinante de la reivindicación 8, dicha célula siendo en particular una célula de insecto obtenida a partir de las líneas de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*, por ejemplo las células Sf21, Sf9, TN 5B1-4 o High Five.
- 35 11. Método para producir un virus AAV recombinante, que comprende la puesta en cultivo de un baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 8 con una célula, en particular una célula de insecto (por ejemplo una célula Sf9, Sf21, TN 5B1-4 o High Five), susceptible de ser infectada por dicho baculovirus, en condiciones que permiten la infección de la célula por el baculovirus y la producción de dicho virus AAV recombinante.
- 40 12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la puesta en cultivo de un baculovirus único que comprende en su genoma el conjunto de los elementos necesarios para la producción de dicho AAV recombinante.

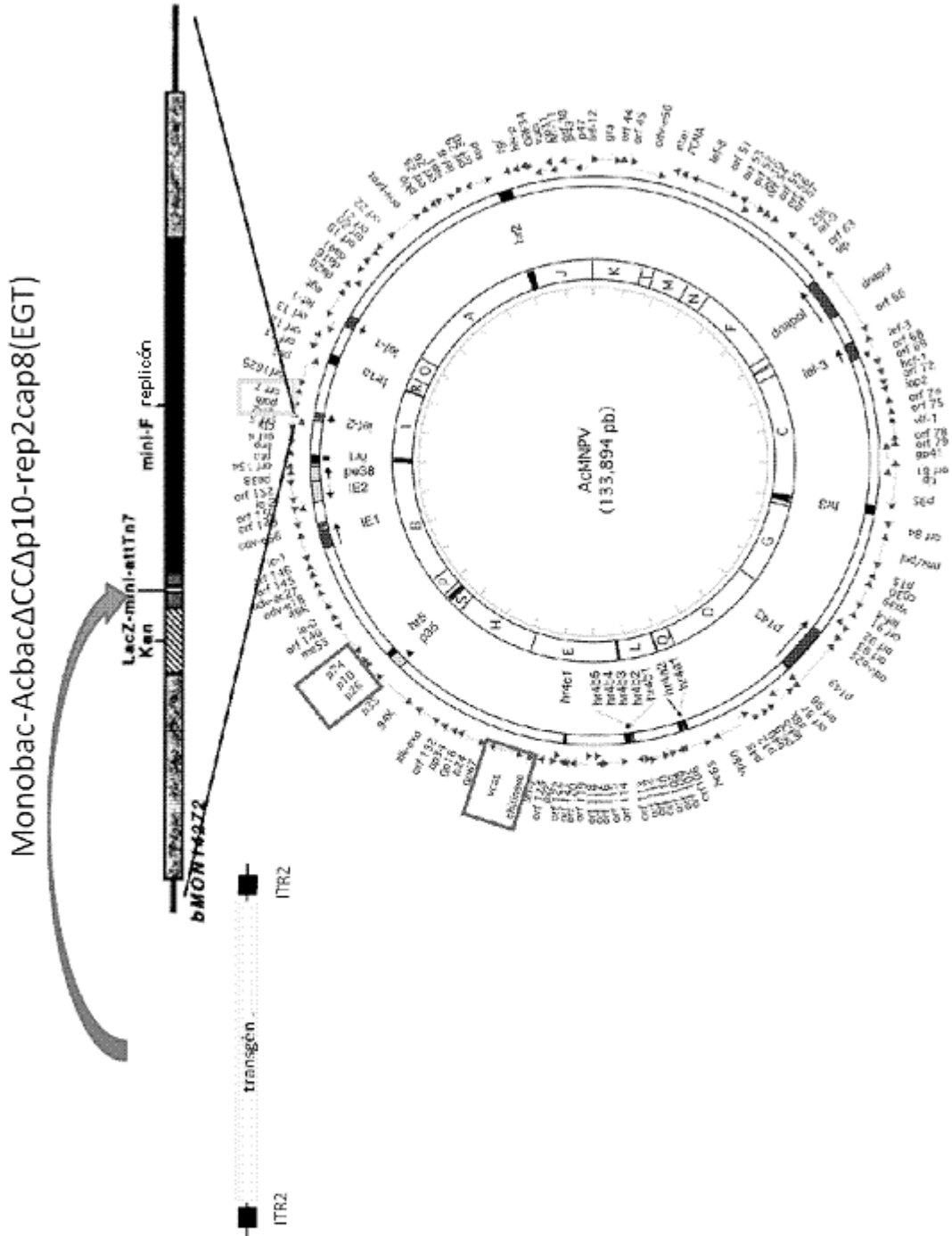


Figura 1

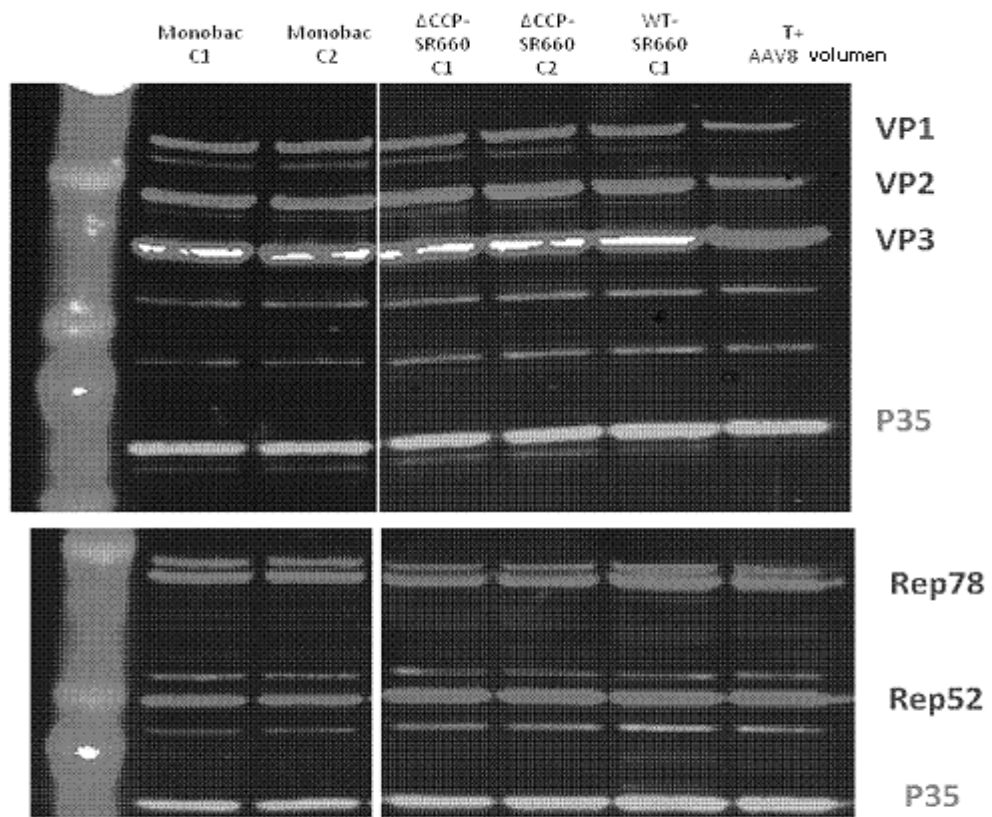


Figura 2

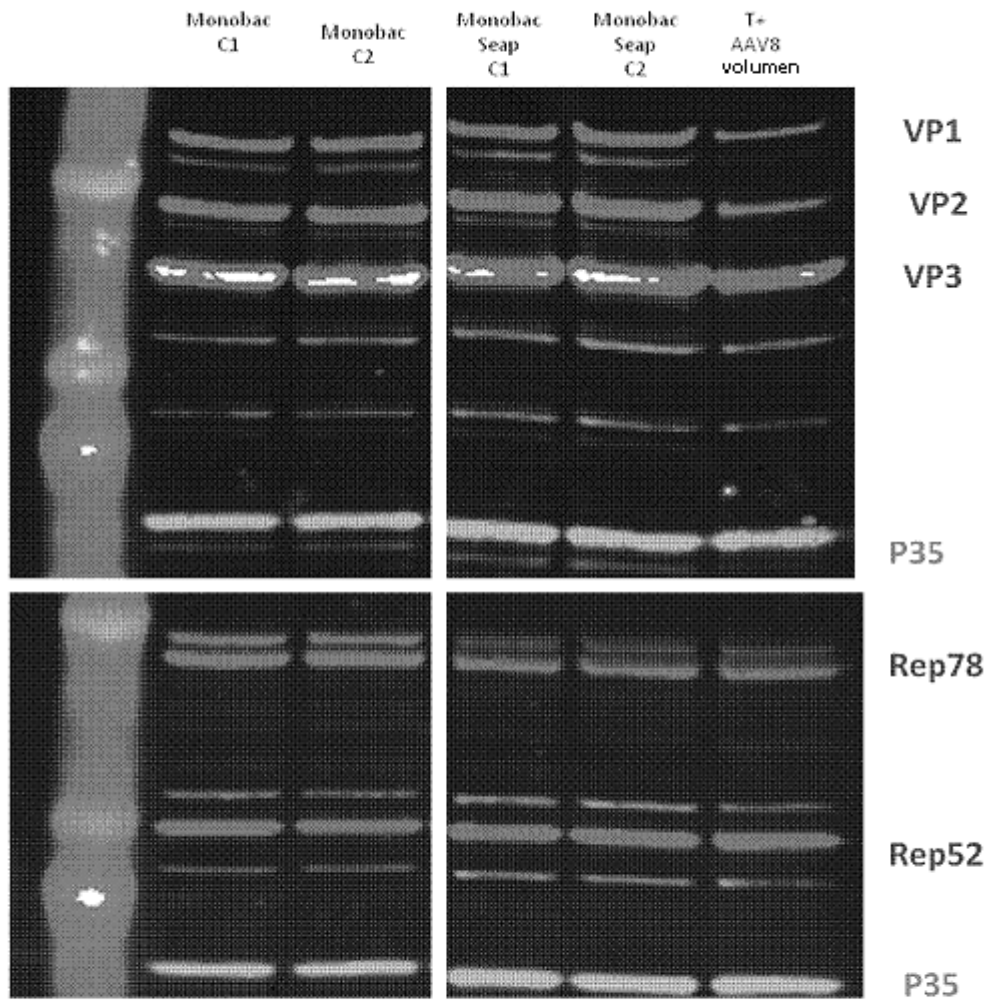


Figura 3

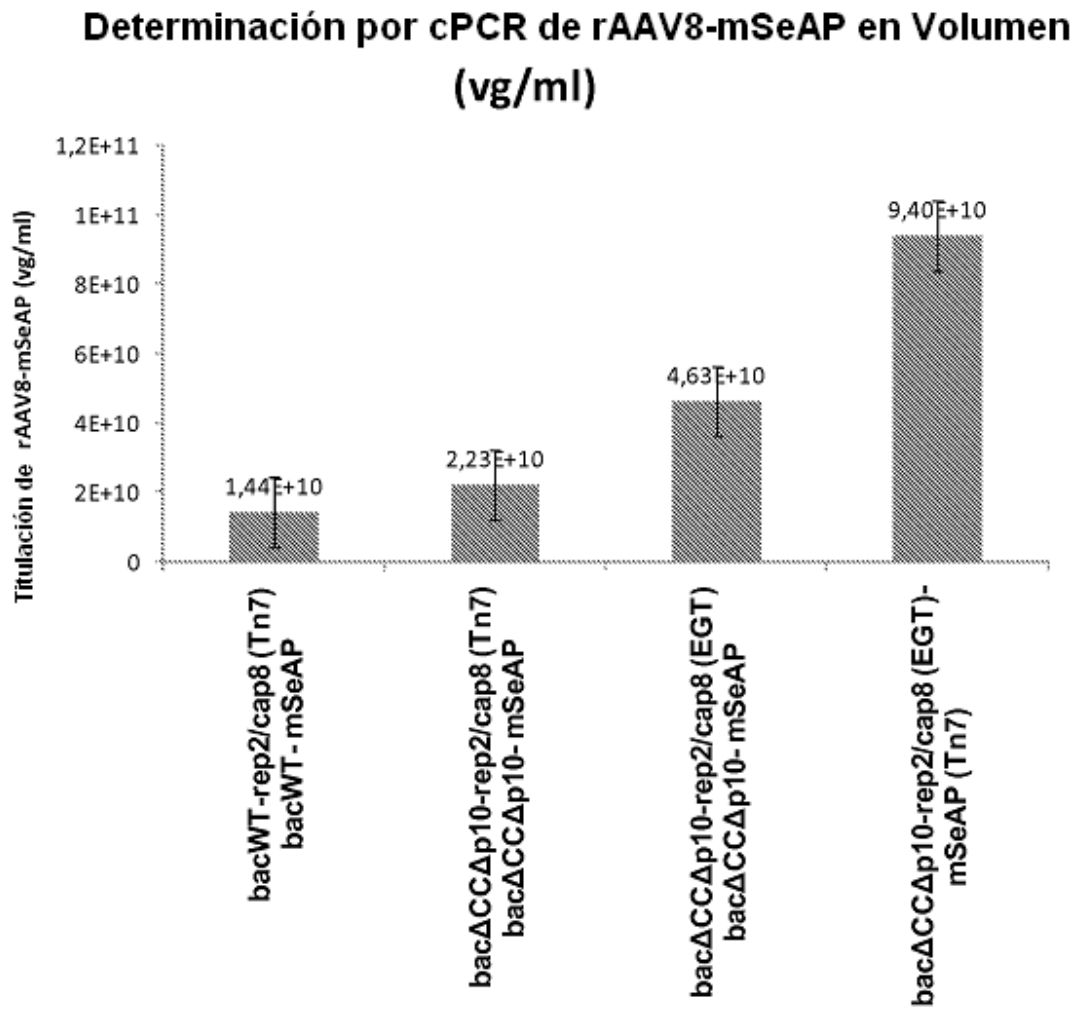


Figura 4

Determinación por cPCR de rAAV8-mSeAP en muestras purificadas (vg/ml)

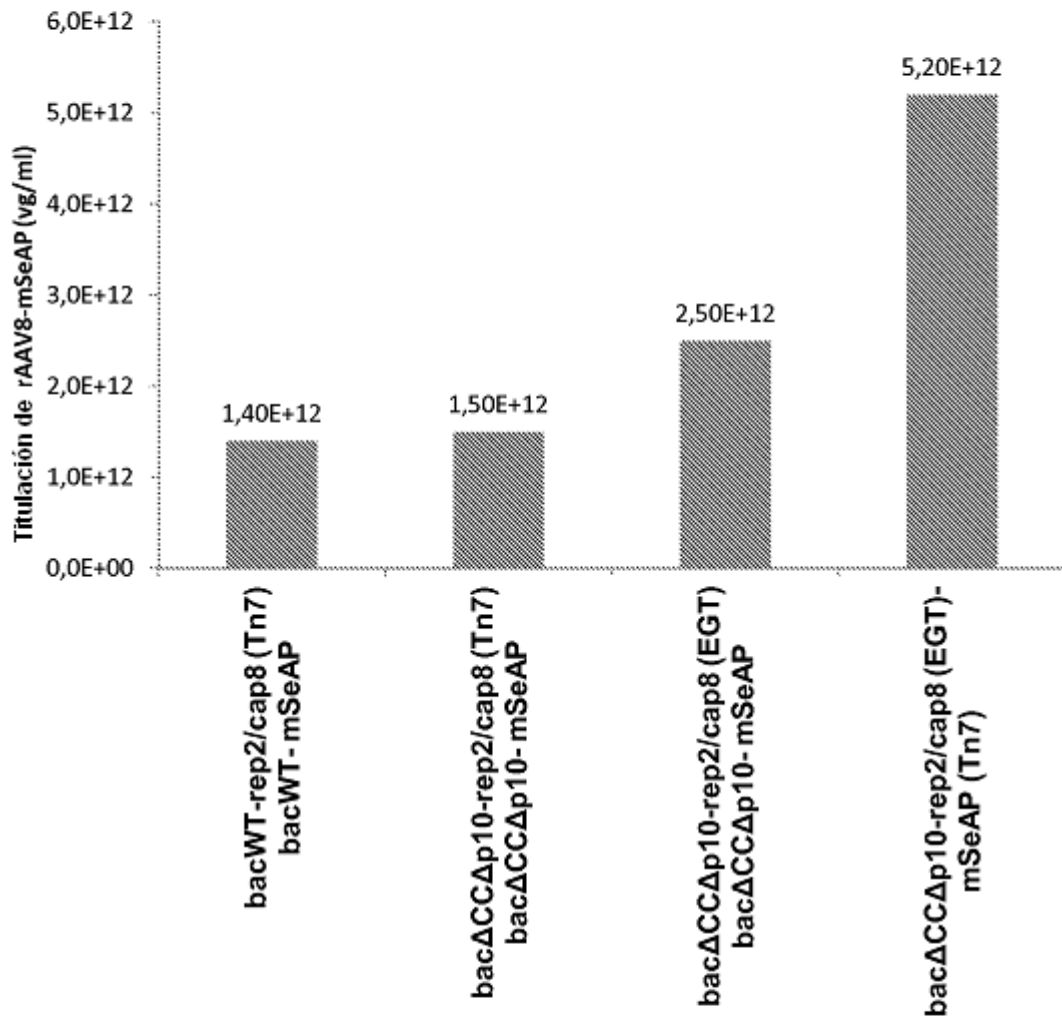


Figura 5

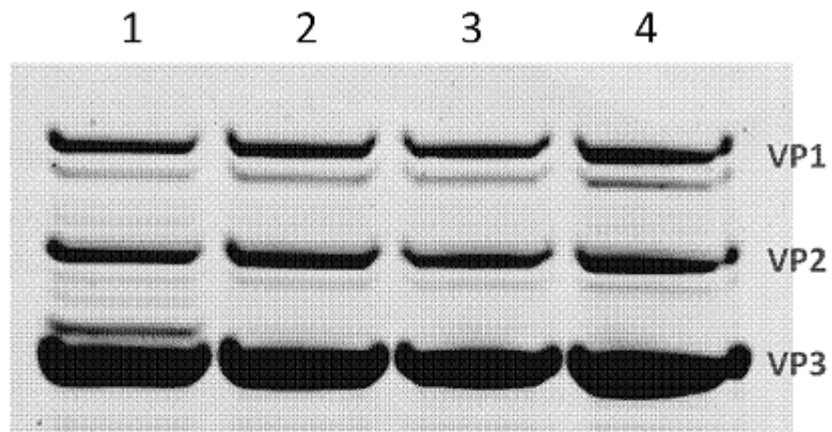


Figura 6