

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 975**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06807777 .5**

96 Fecha de presentación: **08.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1945760**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Factor proteico que aumenta la productividad, nuevas líneas celulares y sus usos**

30 Prioridad:
08.11.2005 EP 05110453
14.12.2005 US 750156 P

73 Titular/es:
PROBIOGEN AG
GOETHESTRASSE 54
13086 BERLIN, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.05.2012

72 Inventor/es:
SANDIG, Volker;
JORDAN, Ingo y
BRUNDKE, Elisabeth

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.05.2012

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 380 975 T3

DESCRIPCIÓN

Factor proteico que aumenta la productividad, nuevas líneas celulares y sus usos.

- 5 La presente invención proporciona un método para preparar un virus objetivo no adenoviral o proteínas objetivo utilizando una línea celular de expresión potente que presenta integrado de manera estable en su genoma un gen que codifique una proteína PIX.

Antecedentes de la invención

- 10 Los productos biofarmacéuticos de las células eucarióticas son parte integrante de la medicina moderna. No obstante, el incremento de la productividad y de la seguridad son parámetros importantes que aún siguen requiriendo una importante optimización. El obstáculo más fundamental en los esfuerzos orientados hacia la optimización es el sustrato celular en sí mismo. Un transgén que pueda introducirse en las líneas celulares ya
15 liberado para su uso en procesos biofarmacéuticos para incrementar los rendimientos de productos a partir de dichas células manipuladas resulta extremadamente valioso.

- Los adenovirus son virus no envueltos (desnudos) con ADN de doble cadena, que infectan un amplio espectro de animales. Entre los miembros mejor caracterizados se encuentra el serotipo 5 del adenovirus humano (Ad5). El virus
20 es una causa frecuente de los síntomas del resfriado común, y la infección suele producirse en la infancia.

- Los adenovirus son susceptibles de ser sometidos a manipulación genética, y los adenovirus incompetentes para replicación, incluyendo el Ad5 (número de orden GenBank para la secuencia: AC_000008) se utilizan como vectores en la terapia génica y para la vacunación terapéutica. Con el fin de obtener virus incompetentes para la replicación,
25 amplias regiones del ADN genómico son sustituidas por secuencias no virales. Las funciones virales ausentes serán suministradas in trans mediante líneas de células huésped transfectadas de forma estable con genes que se hayan eliminado del vector. Uno de los sistemas anteriores que se desarrollaron consta de vectores adenovirales suprimidos en la región reguladora E1 producidos en las líneas celulares, con el suministro de las proteínas E1 correspondientes.

- 30 La línea celular más común para este propósito es la línea celular 293. Esta línea se generó en 1977 mediante transfección de ADN genómico adenoviral fragmentado en células primarias humanas (Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59-74 (1977)), bastante antes de que se reconociera que los adenovirus podían servir como vectores de la terapia génica. Posteriormente, se observó que la línea celular resultante contenía los nucleótidos 1 a 4344 del ADN genómico (Louis et al., Virology 233, 423-429 (1997)), que incluye la región E1; esta caracterización puso de
35 manifiesto que la región E1 puede utilizarse para immortalizar y transformar células primarias.

- Junto a la región E1 se encuentra el gen de pIX ("proteína 9", nucleótidos 3609 a 4031 en el ADN genómico). El promotor de pIX está alojado en el componente E1B de la región E1. Un mecanismo, denominado oclusión del
40 promotor, permite la expresión de pIX en un momento posterior-anterior en el ciclo de infección viral, en el momento de la aparición de la replicación del ADN viral con un número creciente de ADN viral (Fessler y Young, J. Virol. 72, 4049-4056 (1998)). Aunque el gen esté presente en los 4344 nucleótidos integrados en 293 células, la expresión pIX no puede detectarse ni siquiera con métodos sensibles de etiquetado radiactivo (Spector et al., J. Virol. 36, 860-871 (1980)).

- 45 Tal y como se ha descrito anteriormente, se han generado vectores adenovirales deficientes de replicación mediante la eliminación de la región E1 del genoma viral. Los productos E1 son fundamentales para la replicación viral y, por tanto, la función de la región E1 tiene que proporcionarse in trans a través de transgenes E1 estables en la célula empaquetadora del adenovirus (como la línea celular 293). Debido a la proximidad con la región E1, el gen pIX provocaba una recombinación frecuente entre los vectores adenovirales suprimidos y la región E1 en el genoma
50 huésped. Este episodio de recombinación generaba adenovirus competentes para la replicación (RCA), una importante contaminación en las preparaciones del vector. Para suprimir esta posibilidad de recombinación, el pIX fue eliminado del genoma del adenovirus. Durante el transcurso de estos experimentos, se reconoció que el pIX estabiliza el cápside del adenovirus con respecto a la tensión térmica y estérica incrementando la interacción de los principales elementos constituyentes, los hexones (Colby y Shenk, J. Virol. 39, 977-980 (1981); Ghosh-Choudhury et al., EMBO J. 6, 1733-1739 (1987)). Morfogénesis en ausencia de virus sensibles a la temperatura con
55 rendimientos pIX que no pueden suministrar moléculas de ADN genómico más grandes que el 105% de los 35938 pares de bases de tipo salvaje. Para seguir permitiendo una capacidad de empaquetado normal y una estabilidad térmica, la proteína pIX se introdujo de forma estable o episomal en las líneas celulares, previstas como células empaquetadoras para vectores de adenovirus (Krougllakand Graham, Hum. Gene Ther. 6, 1575-1586 (1995); Carovokryi, C. and Leppard, K.N., J. Virol. 69, 6627-6633 (1995) WO 99/57296 e Imler et al., Gene Therapy 3, 75-84 (1996)).

- 60 Asimismo, con el reconocimiento de que el pIX decora la superficie de los viriones, se han generado proteínas de fusión pIX para ampliar la gama huésped de vectores de adenovirus o de seguir a la morfogénesis y a la migración intracelular de partículas de virus (revisado por Parks, Mol. Ther. 11, 19-25 (2005)).

Aunque es claramente una proteína estructural, la pIX también tiene implicaciones como proteína reguladora para la replicación de adenovirus. Se parte de la base de que la PIX funciona como un transactivador de la transcripción para aumentar la expresión E1A, una función posiblemente ejercida incluso como viroquinas por la proteína PIX entrante procedente del cápside en la fase de infección (revisado por Parks, Mol. Ther. 11, 19-25 (2005)). La PIX, junto con la proteína anterior E4 Orf3, también se describe como elemento de interacción con inclusiones subnucleares, denominados cuerpos PNL (Puvion-Dutilleul et al., Exp. Cell. Res. 218,9-16 (1995); Leppard y Everett, J. Gen. Virol. 80,997-1008 (1999)). Estos son conjuntos dinámicos de entre 250 nm y 500 nm de tamaño, que se pretende que estén implicados en la regulación de la diferenciación celular (Wang et al., Science 279, 1547-1551 (1998)), en el control de la apoptosis (Quignon et al., Nature Gen. 20, 259-265 (1998)) y en la respuesta a la infección viral (Moller y Schmitz, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 51, 295-300 (2003)).

Debido a sus efectos pleotrópicos, se introdujo la proteína PIX en líneas celulares para examinar si ésta aumenta la proliferación celular o las propiedades de producción de productos biofarmacéuticos que no están relacionados con adenovirus ni con vectores adenovirales. Existe una necesidad general de factores que modulen estas propiedades en las líneas celulares establecidas.

Por ejemplo, los virus atenuados (debilitados) son unos candidatos prometedores en lo que a vacunas se refiere: en el momento de su inoculación, imitan una infección natural, pero proporcionan más tiempo para que el sujeto vacunado pueda desarrollar la respuesta inmune de protección deseada. Con un número creciente de pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, debido a la infección por el VIH), es deseable contar con cepas altamente atenuadas. Mientras que las cepas atenuadas aún siguen su camino hacia provocar la infección (normalmente benigna), las cepas altamente atenuadas son bloqueadas a nivel celular incluso en ausencia de un sistema inmune funcional. Un método utilizado con frecuencia para establecer y mantener la atenuación es hacer que los virus pasen a diferentes tejidos huésped. Por ejemplo, los virus del sarampión y de las paperas destinados a la vacunación humana pasan a células primarias, ya sea en huevos con embriones de pollo o en cultivos derivados de éstos. Una nueva generación de vacunas está basada en poxvirus altamente atenuados que también dependen de las células primarias de pollo para su producción. Por tanto, una línea celular que pueda reemplazar las células primarias de pollo y que, al mismo tiempo, pueda protegerse a sí misma (incluso con menor eficacia) frente a una infección viral provocada por manipulaciones secundarias, como la introducción del transgén PIX, proporciona un sustrato altamente deseable.

Para otros propósitos, puede resultar preferida una línea celular de un mamífero (en vez de una de un ave). Estas líneas celulares preferidas ya existen, y han superado el examen de las autoridades sanitarias en lo que respecta a la seguridad y a los riesgos provocados por los productos biofarmacéuticos derivados. También en este caso es altamente deseable una segunda manipulación (como la introducción del transgén PIX) para incrementar el espectro de aplicaciones o eficiencias de producción disponibles sin comprometer las características de seguridad.

Sumario de la invención

Al preparar líneas celulares transfectadas de forma estable con proteínas pIX génicas adenovirales (o una fusión química análoga de éstas), observamos inesperadamente que la PIX ejerce un efecto fenotípico en las células de aves y de humanos. En el caso de las células de aves, esto resulta especialmente sorprendente, puesto que éstas no pueden ser infectadas por adenovirus humanos, y los adenovirus (como el CELO o el adenovirus tipo 8 de ave de corral) no codifican ningún homólogo de la PIX (Ojkicand Nagy, J. Gen. Virol. 81,1833-1837 (2000)). Además, pudimos observar que la presencia estable de PIX incrementa la susceptibilidad de la célula ante la inducción mediante análogos de ARN de doble cadena, posiblemente a través de un receptor 3 de tipo Toll. Probablemente en este contexto, también observamos de forma inesperada que la presencia de la proteína PIX aumenta el rendimiento de poxvirus altamente atenuados en células huésped de aves. Puesto que las células infectadas por el virus de la varicela sufrían menos inducción provocada por análogos de ARN de doble cadena, es posible que hayamos encontrado una interacción entre la proteína PIX y los genes antiinterferón del poxvirus que no se ha descrito previamente. También pudimos observar un sorprendente incremento en el rendimiento del producto proteaginoso (no sólo virus) liberado por una línea celular transfectada de forma estable.

Así pues, la presente invención proporciona:

(1) un método para preparar un virus objetivo no adenoviral o una o más proteínas objetivo, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) cultivar una célula de expresión que pueda obtenerse mediante la infección o la transfección de una célula huésped, tras haber integrado de forma estable en su genoma una codificación génica para una PIX de adenovirus y haber expresado dicha proteína PIX con dicho virus objetivo, o bien con un vector con secuencias de ácido nucleico que codifiquen dicha (o dichas) proteína objetivo (donde el virus objetivo no adenoviral no contenga dicha proteína PIX y la(s) proteína(s) objetivo difiera(n) de dicha proteína PIX);

(b) aislar el virus objetivo o la(s) proteína(s) objetivo.

(2) una forma de realización preferida del punto (1) anterior, donde dicha proteína PIX aumenta la productividad de la célula en la producción de un virus que no contenga dicha proteína PIX y en la producción de una proteína que difiera de dicha proteína reguladora;

(3) una forma de realización preferida de los puntos (1) y (2) anteriores, donde la PIX de adenovirus se suministra como proteína de fusión con un receptor de ácido retinoico alfa, preferentemente una proteína de fusión con la secuencia que se muestra en la SEC ID n.º: 4 o fusionada con un GFP y con el contenido de una NLS, preferentemente una proteína de fusión con la secuencia mostrada en la SEC ID n.º: 23;

(4) una forma de realización preferida de los puntos (1) a (3) anteriores, donde la célula huésped y la de expresión es una célula de vertebrado, incluyendo células de mamíferos y de aves; preferentemente, la célula del mamífero será una célula derivada del cerebro humano, mientras que la célula de ave será una célula derivada de la retina de pato o derivada de los somitas de pato;

(5) una forma de realización preferida de las secuencias (1) a (4) anteriores, donde la célula huésped y de expresión se deriva de un cerebro humano, preferentemente de un cerebro fetal humano, y más preferentemente será una célula NC5T11; dicha célula será portadora una secuencia de ácido nucleico que codifique la PIX de adenovirus y, preferentemente, dicha proteína PIX estará codificada por un ácido nucleico mostrado en la SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3 o SEC ID n.º: 22;

(6) una forma de realización preferida del punto (5) anterior, donde la célula huésped es una célula NC5T11 n.º 34, mientras que la célula de expresión se deriva de la célula NC5T11#34, la cual está depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2744;

(7) una forma de realización preferida de los puntos (1) a (4) anteriores, donde la célula huésped y de expresión es una célula de ave, preferentemente derivada de la retina o de los somitas de pato, la cual llevará una secuencia de ácido nucleico que codifique la PIX de adenovirus y, preferentemente, dicha proteína PIX estará codificada por un ácido nucleico mostrado en la SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3 o SEC ID n.º: 22;

(8) una forma de realización preferida del punto (7) anterior, donde la célula huésped es una célula CR.PIX (17a11b), mientras que la célula de expresión se deriva de la célula CR.PIX (17a11b), la cual está depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2749;

(9) una célula de expresión inmortalizada de vertebrado para producir un virus objetivo 375.5.2011 tal y como se define en los puntos (1) a (8) anteriores, y preferentemente la expresión se ajustará a lo definido en los puntos (5) a (8) anteriores, donde la célula de expresión haya integrado de forma estable en su genoma un gen adecuado a la PIX de adenovirus, exprese de forma estable dicha PIX y haya sido infectada o transfectada con un virus objetivo no adenoviral o con un vector portador de secuencias de ácido nucleico que codifican dicho virus;

(10) el uso de la célula de expresión tal y como se define en el punto (7) anterior para preparar un virus objetivo 5.5.2011.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: historia de la línea celular NC5T11. A: neuroesferas de células primarias desarrolladas en condiciones libres de suero. B: monocapa de células primarias desarrollada en DMEM/F12 con un 5% de FCS. C: enfoque sobre primarias dos semanas después de la transfección con p79. Las flechas indican el límite entre las células primarias y las inmortalizadas. D: cultivo adherente homogéneo de células inmortalizadas en DMEM/F12 con un 5% de FCS. E: cultivo de suspensión de NC5T11 en tubos agitadores en EXcell VPRO.

Figura 2: Inmunofluorescencia que detecta E1A y E1B en NC5T11. Tras la fijación con metanol, las células fueron tratadas con anticuerpos de rata, dirigidos contra E1A y E1B 55k respectivamente, seguidos por anticuerpos rojo de Texas antirrata conjugados. Tal y como se muestra en la figura 2, todas las células de la muestra presentan una tinción nuclear típica del E1A y una tinción citoplásmica en el caso del E1B. Tras la fijación con metanol, las células fueron tratadas con anticuerpos de rata, dirigidos contra E1A y E1B 55k respectivamente, seguidos por anticuerpos rojo de Texas antirrata conjugados. Tal y como se muestra aquí, todas las células de la muestra presentan una tinción nuclear típica del E1A y una tinción citoplásmica en el caso del E1B.

Figura 3: productividad específica de clones aat seleccionados. Los clones celulares de NC5T11 transfectados con C55 y seleccionados con puromicina fueron sembrados de acuerdo con una concentración de 7×10^4 células en placas de 12 pocillos; el número de la célula y el título aat se determinaron los días 1, 2 y 3 tras la siembra, y se calculó la productividad máxima específica de célula por día.

Figura 4: análisis de expresión de NC5T11puro#8 en el cultivo de lotes del agitador. Las células se sembraron en 12 ml de EXCELL VPRO en una concentración de 6×10^4 células/ml en tubos agitadores de polipropileno de 50 ml (TPP, Suiza), sometidos a rotación con un radio de 1 cm y una velocidad de 160 rpm. Las muestras de 200 μ l se tomaron los días 4, 7, 9, 11, 15, 18 y 21. La densidad y la viabilidad celular se determinaron tras la tinción con azul de tripano, utilizando un hemocitómetro.

Figura 5: detección del ADNc del pIX-RARA mediante PCR en un grupo de clones. Se generó un grupo de clones con el gen pIX-RARA a partir de la célula NC5T11puro#8 mediante transfección con F67 y selección con higromicina. El ARN se extrajo utilizando un equipo de extracción de ARN (Machery Nagel, Alemania), mientras que el ADNc se sintetizó utilizando transcriptasa inversa AMV (Invitrogen). Los ADNc para el fragmento de pIX solo o para todo el gen pIX-RARA se amplificaron con cebador 1, 1 y 164 respectivamente.

Figura 6: detección de las secuencias de los pIX como parte de la proteína de fusión en subclones resistentes a la higromicina de NC5T11puro#8 y NC5T11(#34, 35, 36, 37, 38) mediante PCR. El ADN se aisló de los clones de las células cultivados en 6 pocillos mediante lisis en SDS, seguida de la extracción de fenol y la precipitación. El ADN se amplificó con cebadores 1 y 2 para 28 ciclos.

Figura 7: la estabilidad de los genes pIX-RARA y pIX en células NC5T11 transfectadas de forma estable se determinó en relación con el E1B: E1A+E1B y pIX-RARA fueron introducidos en transfecciones separadas y en genes E1, y se han mantenido ante la ausencia de selección durante > 2 años, por lo que se considera que están integrados de forma estable. El ADN genómico fue aislado de los clones celulares seleccionados en 2 momentos: inmediatamente después de parada para la selección de higromicina (pronto); después de 2 meses ante la ausencia de presión derivada de la selección (tarde). Los niveles de SDN en el PIX y el E1B fueron determinados mediante PCR en tiempo real.

Figura 8: retardo en el crecimiento inducido por el tratamiento RA en clones recombinantes de pIX-RARA de las células NC5T11 y NC5T11puro#8. Las células fueron sembradas de acuerdo con una concentración de 2×10^5 en placas de 6 pocillos, en presencia y en ausencia de 6 μ g/ml de ácido retinoico. Las fotos que muestran un retardo en crecimiento de los clones tratados #12 y #34 tratados con RA, pero no en la NC5T11, fueron tomadas 4 días después de la siembra mediante una imagen de contraste de fases, con un aumento de 4x.

Figura 9: PIXRARA evita la inhibición de la replicación de los virus mediante interferón. Las células NC5T11 y NC5T11 n.º 34 fueron infectadas con EMCV, un virus sensible al interferón, de acuerdo con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,004 en células tratadas con interferón beta. Los lisados de las células estaban sujetos a valoración mediante la formación de placas en células A549.

Figura 10: análisis de expresión de la línea celular NC5T11puro#8 que expresa alfa-1-antitripsina del vector C55 y los subclones #10, 12 y 14 de éste, con el vector F67 (pEFpIX-RARA) además del C55. Las células se sembraron en EXCELL VPRO (JRH Biosciences) en una concentración de 6×10^4 células/ml en tubos agitadores de polipropileno de 50 ml (TPP, Suiza), con un volumen total de 12 ml y sometidos a rotación con un radio de 1 cm y una velocidad de 160 rpm.

Figura 11: expresión de PIX en células CR de la retina de un pato. Panel izquierdo: reacción PCR frente al gen PIX en ADN genómico de células pIX. Carga de gel de izquierda a derecha: 1 marcador kb (Invitrogen); PCR en ADN genómico de CRpIX; control sin patrón; control positivo con plásmido utilizado en la transfección de CRpIX. Panel derecho: prueba Western Blot para la detección de proteína pIX en células CRpIX. Línea 1: 293 células; línea 2: proteína pIX en células CRpIX.

Figura 12: mantenimiento estable del transgén PIX en células de retina de pato. Panel superior izquierdo: MCX y DXS son alícuotas independientes de un clon CRpIX cultivado durante > 3 meses en paralelo y sin selección. Transcurridos tres meses, se utilizó el PCR TaqMan para contar los números de copia de E1B y del transgén PIX en MCX y DXS. Puesto que el transgén E1B se mantiene independiente del PIX, la proporción de los dos genes es una indicación de mantenimiento del transgén PIX. La proporción no cambió entre MCX y DXS. Además, la proporción de ARNm del PIX con respecto al ARNm del E1B tampoco cambió, y el ARNm del PIX superaba al del E1B, lo cual indica la expresión del PIX. Panel derecho: Las células MCX y CR.HS parentales (negativas en PIX) fueron cultivadas con o sin presión selectiva de higromicina durante 2 semanas (indicadas por la barra negra en el eje x). En varios momentos, el ADN genómico fue aislado (indicado por "A", "B" y "C") y sometido a cuantificación TaqMan (inferior izquierda). Mientras que las células parentales murieron a causa de la higromicina, las células MCX sobrevivieron. La proporción de transgenes permaneció constante, lo cual indica de nuevo un mantenimiento estable del transgén PIX también en presencia de una presión selectiva. El tiempo de duplicación de las células parentales es de aproximadamente 32 h, pero sólo de 41 horas para las células MCX.

Figura 13: efecto PIX sobre la replicación de MVA en células CS. Las células CS y CSplX fueron infectadas con MVA y estudiadas en términos de replicación del MVA 48 y 72 horas después de la infección.

El rendimiento del MVA era notablemente mayor en las células CS positivas en PIX. Asimismo, tal y como se desprende de forma evidente en la microimagen de contraste de fases, el efecto citopático aparecía retardado para las células CSplX a 48 horas. No obstante, ambos cultivos son susceptibles a los virus en niveles similares, puesto que la lisis completa resulta evidente a las 72 horas tras la infección.

Figura 14: efecto de PIX sobre la replicación de MVA en células CR. Las células CR y CRplX en suspensión fueron infectadas con diversas multiplicidades y de acuerdo con diferentes densidades de células de siembra. El rendimiento del MVA se evaluó transcurridas 48 horas desde la infección, y se muestra en el eje y.

El tamaño de las burbujas muestra las densidades de las células de siembra. Las burbujas llenas muestran valores para las células CRplX, mientras que las blancas muestran los valores para las células parentales. En todas las configuraciones, el PIX confiere un claro incremento en los niveles de amplificación del MVA.

Figura 15: distribución subcelular de la PIX-GFP en células de pato. La PIX etiquetada con GFP aparece en algunos puntos citoplásmicos brillantes y en la tinción citoplasmática difusa, que excluye en gran medida al núcleo. Otros clones muestran una tinción citoplasmática difusa más sólida, así como una acumulación más intensa justo fuera del núcleo.

Figura 16: distribución subcelular de variantes de la PIX-GFP en células CHO. Para investigar los cambios inducidos de la distribución de la PIX en las células se generaron variantes de fusión, incluyendo la inserción de un lugar de localización nuclear (NLS) y la fusión con respecto al receptor de ácido retinoico alfa, una proteína celular que ya contiene un NLS. Se muestran células CHO transfectadas de forma transitoria con plásmidos de expresión para las variantes de la PIX-GFP.

Figura 17: efecto de inducción de interferón en presencia de PIX. Las células CSplX y CRplX fueron tratadas con poli I: poli C, un conocido inductor de respuesta del interferón I, y se compararon con las células parentales. Las células CSplX reaccionaron con mayor sensibilidad al poli I:poli C que las células CS. Las células CRplX y CR reaccionaron de forma comparable y en menor escala que las células CS.

Figura 18: efecto de la infección del MVA y de la inducción de interferón en presencia de PIX-GFP. Las células CSp9GFP y CRp9GFP fueron tratadas con poli I:poli C e infectadas con MVA de acuerdo con una MOI de 0,1, tal y como se indicó. Una vez más, las células derivadas de las CS reaccionaron con mayor fuerza ante la inducción del interferón. Sorprendentemente, los cuerpos PIX brillantes parecen descender en número en el momento de la inducción o la infección en ambas líneas celulares, mientras que la intensidad de señal general de la PIX-GFP se incrementa. Además, el efecto de la inducción poli I:poli C se mejora en el momento de la infección paralela con MVA, tal y como indica el mayor número de células CS que siguen siendo adherentes 22 horas después del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

El método de la forma de realización (1) de la invención utiliza una célula de expresión que ha integrado en su genoma un gen que codifica la proteína pIX y que presenta las siguientes propiedades:

1. Modula la transcripción y, especialmente si está unida a los moduladores o reguladores adecuados, también influye sobre el crecimiento celular.
2. Mejora la productividad de la línea celular en lo que respecta a la producción de un virus que no contenga dicha proteína PIX (es decir, la proteína PIX no es un sustituto del 5.5.2011 para una proteína eliminada en el virus) y/o en relación con la producción de una proteína que difiera de dicha proteína reguladora.

Según una forma de realización de la invención, la proteína reguladora heteróloga es la proteína pIX del serotipo 5 del adenovirus, mientras que en otras formas de realización la proteína se obtiene a partir de un adenovirus con un serotipo diferente.

Las proteínas de fusión son particularmente preferidas, a saber, proteínas de fusión que cuenten, por lo menos, con un primer dominio que conste de una proteína PIX tal y como se ha definido anteriormente en la presente memoria y, por lo menos, con un segundo dominio que conste de una proteína o de un péptido que actúe como modulador de transcripción. En una forma preferida de realización de la invención, dicho modulador de transcripción es un factor de transcripción que incluye el receptor de ácido retinoico alfa, que puede estar presente en forma completa o incompleta (es decir, truncada). El modulador también puede ser un péptido de tránsito que incluya secuencias NLF, como por ejemplo la que se muestra en la SEC ID n.º: 21. Según la invención, los primer y segundo dominios están unidos entre sí mediante enlace covalente, ya sea directamente o a través de un vinculador de péptidos. Los vinculadores de péptidos adecuados incluyen estructuras flexibles e hidrofílicas, como poli gli-ser.

Los términos "célula" y "línea celular", tal y como se utilizan en la siguiente descripción detallada, hace referencia a células de expresión/líneas celulares de expresión y a células huésped/líneas celulares huésped.

Según la invención, resulta preferido que la proteína PIX aparezca expresada en la célula en una cantidad de por lo menos 1 pg/μg de proteína celular, y preferentemente en una cantidad de por lo menos 10 pg/μg de proteína celular, de tal forma que su expresión puede determinarse mediante la prueba Western Blott.

En la célula de la PIX, la proteína estará preferentemente bajo el control de un promotor homólogo o heterólogo estable. Los promotores adecuados son los promotores celulares constitutivos o variantes de éstos, como el promotor de elongación de translocación humana de factor 2. Una variante concreta del promotor de elongación de translocación humana de factor 2 utilizado en la invención presenta la secuencia mostrada en la SEC ID n.º: 12. La secuencia que aparece representa una versión "corta" del promotor, ubicado en el cromosoma humano 19:3,935,325-3,936,638 (estructura del genoma humano, mayo de 2004), y proporciona una expresión estable de nivel medio. Para una expresión más fuerte, debe utilizarse una versión "más larga" del promotor ubicado en el cr19: 3,935,349-3,938,957 (estructura del genoma humano, mayo de 2004).

Según la invención, la célula es una célula de vertebrado, incluyendo células de mamíferos y de aves. Las células de mamíferos adecuadas son células humanas, y entre las células de roedores se incluyen las de los ratones, ratas, hámster, etc. Según la invención, las células especialmente preferidas procedentes de mamíferos son las células derivadas del cerebro humano, particularmente del cerebro fetal humano, o bien una célula NSO o Sp2/0 de ratón, así como una célula BHK o CHO. Las células adecuadas de las aves son las células procedentes de patos, pollos, codornices y gansos. Las células de aves especialmente preferidas, según la invención, son células derivadas de una célula procedente de la retina o de los somitas de un pato.

Por otra parte, la célula de la invención puede obtenerse a partir de una célula primaria o de una célula previamente inmortalizada. Además, la célula puede transportar genes (virales) inmortalizadores adicionales, incluyendo una proteína E1 de un adenovirus, como la proteína E1 del mastadenovirus grupo C, tipo 5, y similares. Según la presente invención, resulta especialmente preferido que la célula traslade, además, el gen E1A y/o E1B del adenovirus mostrado en la SEC ID n.º: 5.

La célula utilizada en el método de la forma de realización (1) de la invención puede ser portadora además de secuencias funcionales, como por ejemplo secuencias necesarias para su aplicación como célula de expresión, como secuencias de marcador de selección, sitios donadores/aceptores de empalme y/o secuencias de reconocimiento de recombinasa, que permiten la integración de una secuencia de ácido nucleico objetivo para poder ser expresada en la célula, etc.

La "infección", "transfección" y "transformación" llevadas a cabo en el método de las formas de realización(1), (10) y (12) de la invención podrán llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia. Los métodos mencionados pueden incluir fases de selección adecuada, aislamiento y expansión, si fuera necesario.

En el método de la forma de realización (1), el virus objetivo incluye virus de tipo salvaje, mutados o eliminados, virus adaptados al frío o atenuados, cepas para vacuna, vectores virales con gen(es) heterólogo(s), vectores virales como lentivirus, poxvirus, virus adenoasociados (aav), herpesvirus y flavivirus.

Además, en el método de la forma de realización (1), la proteína o proteínas objetivo incluyen anticuerpos, proteínas recombinantes como eritropoyetina, alfa-1-antitripsina, factores VIII y IX de coagulación de la sangre e interferones, antígenos virales como HA y NA de la gripe y, además, proteína M, HBV-S, proteína G del herpes y G de la rabia, hormonas peptídicas y similares. Aunque el método permite la producción de células que pueden presentar una expresión contemporánea de más de una proteína objetivo, se prefiere particularmente que codifique sólo una proteína objetivo.

El cultivo y el aislamiento del método de la forma de realización (1) de la invención pueden llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia. Dicho método, además, puede incluir etapas de purificación estándar, así como etapas de modificación posteriores del virus objetivo o de la(s) proteína(s) objetivo(s).

En lo que respecta a las formas de realización preferidas de las líneas celulares de expresión y líneas celulares huésped de la forma de realización (9), se hace referencia a la detallada exposición proporcionada anteriormente en la presente memoria en relación con la forma de realización (1).

La línea celular NCST11#34 fue depositada en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, MascheroderWeg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, el 4 de noviembre de 2005, con el número de registro DSM ACC2744. La línea celular CR.PIX (17a11 b) fue depositada en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, MascheroderWeg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, el 24 de noviembre de 2005, con el número de registro DSM ACC2749.

La invención se explicará con mayor detalle a partir de los siguientes ejemplos, proporcionados a título no limitativo de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: desarrollo de la línea celular NC5T11

La línea celular se desarrolló a partir de una combinación de células de cerebro fetal mediante inmortalización con genes 5 E1 A y B de adenovirus mediante transfección no viral.

Se tomó una muestra de tejido de la zona periventricular del cerebro de un feto tras un aborto inducido. Se diseccionó con tijeras y se homogeneizó por aspiración con una pipeta para cultivo tisular en un medio de cultivo neuronal basado en DEMEM/F12, con un contenido de 20 ng/ml de hFGF (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.), 20 ng/ml de hEGF (Invitrogen), 1x N2 de suplemento (Invitrogen) y 8 µg/ml de heparina (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Las células se sedimentaron a 200 g durante 3 min. La viabilidad de éstas se evaluó utilizando azul de tripano y yoduro de propidio mediante un citómetro de flujo (BD Biosciences, Jose, CA 95131, EE.UU.). La viabilidad fue del 75%. $0,5 \times 10^6$ células fueron sembradas en frascos T25. Las células se incubaron a 37°C y un 5% de CO₂. Las células formaron neuroesferas en el día 5 del cultivo. Las neuroesferas se muestran en la figura 1 A. El día 6, las células fueron transferidas a DMEM/F12 con un suplemento del 5% de FCS para permitir la unión y estimular la proliferación. Las células formaron una monocapa homogénea, tal y como se muestra en la figura 1B, y fueron objeto de pasaje con arreglo a la proporción 1:5 una vez a la semana. Este cultivo de células neurales primarias fue denominado NC5.

Tras 2 semanas en un medio que contenía suero, las células fueron transfectadas con el vector p79 en placas de 6 pocillos subconfluentes utilizando Effectene (Qiagen, 40724 Hilden, Alemania) como reactivo de transfección, de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El plásmido p79 contiene los siguientes elementos: el pBluescript (Stratagene, EE.UU.) hace las veces de esqueleto de plásmido, en el que el marcador de resistencia a la ampicilina fue sustituido por el gen de resistencia a la kanamicina impulsado por un promotor bacteriano, que permite el crecimiento y la selección en E.coli. El vector contiene un fragmento de adenovirus salvaje tipo 5 (SEC ID n.º: 5), que contiene los marcos de lectura abiertos para el E1A (variantes de empalme 13S y 12S, con o sin el dominio CR3 respectivamente) y el E1B 55k y 19k, así como secuencias en dirección ascendente con respecto al E1A. El gen E1A es precedido por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (ratón). Las secuencias de adenovirus son seguidas por la señal de poliadenilación procedente del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple, que sirve como sustitución de la señal de poliadenilación del E1B. Los elementos se obtuvieron a partir de los respectivos organismos o procedentes de plásmidos de donantes mediante PCR; se clonaron utilizando técnicas convencionales de ADN recombinado y se verificaron mediante secuenciación. Dos días después, las células de transfección fueron tripsinizadas y trasladadas a una placa de 10 cm. Dos semanas después, se habían formado focos de pequeñas células con una elevada proporción núcleo/citoplasma y límites claramente distinguibles (figura 1C) en las células transfectadas, pero no en las tratadas de forma simulada. A partir de la 11.^a transfección, se aislaron ocho focos independientes con tripsina utilizando cilindros de clonación (Corning, EE.UU.), se sembraron en pocillos de una placa de 24 pocillos y se expandieron mediante placas de 12 pocillos y placas de 6 pocillos a frascos T25. Todos los focos aislados contenían dos tipos de células: pequeñas células con bordes definidos y fibroblastos extendidos como células.

Tres semanas después de la transfección, 15 clones adicionales se hicieron visibles en la transfección T11, algunos de los cuales podían haberse originado a partir de células restantes de los clones primarios ya aislados.

Los clones T11a.1 y T11a.6 mostraron el crecimiento más rápido, y fueron criopreservados en DMEM/F12, un 10% de DMSO y un 25% de suero 8 semanas después de la transfección. En este momento, todos los clones seguían conteniendo una parte de células con citoplasma amplio, que se asemejaba al fenotipo primario. No obstante, con una relación de separación de 1:5 en los casos del T11a.1 y el T11a.6, crecieron de forma desmedida y se eliminaron aproximadamente 3 meses después de la transfección. Se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia para asociar la morfología modificada con la expresión del E1A y el E1B. Tras la fijación con metanol, las células fueron tratadas con anticuerpos de rata, dirigidos contra E1A y E1B 55k respectivamente, seguidos por anticuerpos rojo de Texas antirrata conjugados. Tal y como se muestra en la figura 2, todas las células de la muestra presentan una tinción nuclear típica del E1A y una tinción citoplásmica en el caso del E1B.

Tres meses después de la transfección, los clones T11a. 1 y T11a.6 fueron trasladados al medio libre de suero ProPER (Cambrex, Bélgica) sembrando $1,6 \times 10^6$ células tras un tratamiento con tripsina. Las células eran recogidas por centrifugación, y el medio se cambiaba mediante centrifugación una vez a la semana. La población de células sobrevivió, pero incluso seis meses después de la transfección las células seguían mostrando poca viabilidad y crecieron con un elevado tiempo de duplicación de 60-80 h.

Cuando las células fueron trasladadas de nuevo al DMEM/F12 con un 5% de FCS tras 3 meses en medio ProPER, se había formado un cultivo homogéneo y altamente viable para ambos clones, con un tiempo de duplicación de 40

horas. El T11a.1 fue seleccionado como el clon celular más sólido para experimentos posteriores, y recibió el nombre de NC5T11 (fig. 1D)

Ejemplo 2: establecimiento del clon NCST11puro #8

La producción de proteínas en una línea celular depende de la eficiencia de los métodos de transfección y selección. La idoneidad de los marcadores de selección utilizados habitualmente, como G418, puomicina, higromicina, blasticidina, MTX o histidina para el NC5T11 era desconocida. En una primera fase de evaluación se comprobaron diferentes reactivos de transfección disponibles en el mercado, como Lipofectamine (Invitrogene), Eugene (Roche, Alemania), Polyfect (Qiagen) y Effectene, de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. El plásmido pEGFP-N1 (Clontech, EE.UU.), que expresa el gfp procedente del promotor del CMV humano, se utilizó para determinar la eficacia de la transfección pasajera. La mayor eficacia se obtuvo con Effectene (Qiagen), con el cual se alcanzó un 20-50% dependiendo de la densidad celular al aplicarla sobre células adherentes con crecimiento en DMEM/F12 con un 10% de FCS.

Para comprobar los genes del marcador de selección, se construyeron vectores de expresión con el gen humano alfa-1-antitripsina (aat) bajo el control del promotor del CMV humano, seguido por la señal de la hormona del crecimiento bovino PolyA y el respectivo marcador de selección controlado por un promotor débil. Más específicamente, para comprobar la selección de puomicina, se utilizó el vector C55, que contiene el gen de resistencia a la puomicina, impulsado por el promotor del PGK humano y seguido por la señal de poliadenilación temprana de SV40.

Posteriormente, las células de transfección se sembraron en DMEM/F12 con un 5% de FCS y con un contenido de 0,75 µg/ml de puomicina, y se seleccionaron durante 3 semanas con un cambio de medio semanal. Se generó un conjunto de clones y se verificó la expresión mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo policlonal anti-alfa-1-antitripsina de cabra (Innogenetics, EE.UU.) seguido por un anticuerpo secundario de conejo anticabra etiquetado con biotina y con un conjugado de estreptavidina-rojo de Texas.

Para aislar clones de células individuales, se sembraron 10.000 células del conjunto de clones en una placa de 15 cm. Tras 4 semanas, los clones fueron aislados utilizando cilindros de clonación (Corning), y los clones #1, 2, 7, 8, 9 y 10 fueron analizados para determinar la expresión aat. Más específicamente, las células se sembraron de acuerdo con una concentración de 7×10^4 células en placas de 12 pocillos, y se determinó el número de células y la expresión aat. Los niveles calculados de productividad específica celular se recogen en la figura 3. El clon NC5T11puro #8 muestra una productividad específica por encima de 100pg/ célula-día, y fue seleccionado para desarrollos posteriores.

Ejemplo 3: cambio del NC5T11 y del NC5T11puro #8 al medio de producción y análisis de expresión en el cultivo de lotes del agitador

La velocidad de crecimiento tanto del NC5T11 como del NC5T11puro #8 en el medio ProPER (Cambrex) se redujo aproximadamente a la mitad en comparación con el medio con contenido de suero. Por tanto, se comprobó Xcell VPRO (JRH Biosciences) como alternativa. La adaptación se llevó a cabo mediante la siembra directa de $4,5 \times 10^6$ células en 5 ml de EXCELL VPRO en un frasco T25. Transcurridas 2 semanas, el crecimiento celular se reanudó y se estableció una relación de separación de 1:3. Como siguiente etapa, ambos clones se adaptaron al crecimiento en presencia de tensión de cizallamiento. Las células se sembraron en 12 ml de EXCELL VPRO en una concentración de 6×10^4 células/ml en tubos agitadores de polipropileno de 50 ml (TPP, Suiza), sometidos a rotación con un radio de 1 cm y una velocidad de 160 rpm. Tras repetidos pasajes, se llevaron a cabo análisis del lote para determinar las densidades celulares máximas y la acumulación de producto durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario. Se hicieron las siguientes observaciones: el clon NC511puro mostró una alta viabilidad, que se mantuvo por encima del 70% hasta el día 18. La densidad celular máxima no superaba el 1×10^6 . La acumulación de productos continuó durante la fase estacionaria (fig. 5). Se concluyó como necesario el desarrollo de medios específicos o una mejora celular adicional para así lograr una elevada densidad celular comparable a la obtenida con células CHO. Posiblemente, esto desembocará en un notable incremento en los títulos del producto.

Ejemplo 4: construcción de la proteína de fusión pIX-RARA y vectores de integración tanto para pIX-RARA como para pIX

Las secuencias PIX y del receptor de ácido retinoico alfa (RARA) del adenovirus se obtuvieron mediante PCR a partir del adenovirus de tipo 5 y del ADN genómico humano respectivamente, utilizando cebadores.

1. AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT (SEQ ID n.º : 6)
2. AATGGTGGCAACCGCATTGGGAGGGGAGG (SEQ ID n.º: 7) para PIX y
3. CCAATGCGGTTGCCACCATGAGACCCAGA (SEQ ID n.º: 8)
4. AAGGAGCGCTGGCGAGGGCTGTGTCCAT (SEQ ID n.º: 9) para RARA.

Ambos fragmentos se amplificaron por separado. Un solapamiento entre los cebadores 2 y 3 permitió conectar ambos fragmentos mediante PCR utilizando los cebadores 3 y 4. El gen de fusión se clonó en el vector pEFpromhyg, y proporcionó la secuencia pEFpIXRARA. Este vector contiene el promotor del factor 2 de elongación humano, ubicado en chr 19:3,935,325-3,936,638 (estructura del genoma humano, mayo de 2004; SEC ID n.º: 12).
 5 Contiene elementos ascendentes y el primer intrón del gen EF2. El codón de inicio natural del EF2, ubicado a 5' con respecto al primer intrón, fue suprimido por mutagénesis. En el vector, pEFpromhyg, la secuencia del EF2 es seguida por el único lugar de restricción (AfeI) utilizado para la inserción de pIX-RARA. Un sitio interno de unión al ribosoma tras el sitio del AfeI permite la expresión del gen de resistencia a la higromicina como un segundo marco de lectura abierto en un ARN unido con pIX-RARA. Esta configuración actúa como elemento de respaldo de la
 10 expresión pIX-RARA en todas las células resistentes a la higromicina.

El gen para wt pIX fue amplificado utilizando cebadores AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT (SEQ ID n.º: 10) y ACCGAGCGCTTGTTTAAACCGCATTGG (SEQ ID n.º: 11), y se integró en el sitio Afe del pEFpromhyg en lugar del pIX-RARA para generar pEFpIX.

Ejemplo 5: modificación de las líneas celulares NCST11 y NC5T11 puro n.º 8 con el gen PIX y la proteína de fusión PIX-receptor de ácido retinoico

Los clones de células NC5T11 y NC5T11puro #8 fueron elaborados para su transfección en placas de 6 pocillos mediante la siembra de $1,3 \times 10^6$ células/pocillo en DMEM/F al 12,5% de FCS. El plásmido F67 (pEFpIXRARA) y el plásmido F76 (pEFpIX) se linealizaron con la enzima de restricción Asp700 (Roche) y se transfectaron tras la precipitación de etanol mediante Effectene (Qiagen): el ADN se mezcló con 16 µl de potenciador y en 200 µl de amortiguador EC. Tras 2 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 18 µl de Effectene, y se permitió la
 20 formación de liposomas durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió de acuerdo con un volumen de 1 ml de cultivo sobre células sembradas hasta una confluencia del 80% en placas de 6 pocillos el día anterior. La alta eficacia de la transfección se confirmó con una transfección paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, EE.UU.). Un día después de cambiar el medio de transfección a DMEM/F12 con el 10% de FCS y 75 ó 100 µg/ml (NC5T11) y 50 µg/ml (NC5T11puro #8), se añadió higromicina. El medio de
 25 selección fue sustituido dos veces por semana. Tras 18 días, 15-20 clones claros se hicieron visibles en cada uno de los pocillos. Los grupos de clones fueron tratados con tripsina, y se continuó la selección durante dos semanas más. Los grupos de clones se comprobaron para determinar la expresión de PIXRARA mediante RTPCR. Con el cebador 2 se detectó una fuerte señal en la mayor parte de grupos de clones, mientras que con los cebadores 1 y 4 se detectó una señal más débil. Para aislar clones de células individuales, se sembraron 10.000 y 1.000 células del conjunto de clones en placas de 15 cm. Transcurridas 4 semanas, los clones fueron aislados mediante cilindros de
 30 clonación (Coming). En el caso de los clones derivados de la transfección del F76, se aplicó una estrategia diferente. Los grupos de clones fueron tratados con tripsina, transferidos a un tubo agitador de 50 ml en EXCELL VPRO con un contenido de 75 µg/ml de higromicina y, tras 2 semanas de cultivo en suspensión, 2000 células viables fueron mezcladas con una matriz de clones de 12 ml (Genetix, Reino Unido), sembradas en una placa de seis pocillos (Greiner; 2 ml/pocillo) y sometidas a una recolección automatizada de las colonias (clonepixFL, Genetics, Reino Unido). Los clones derivados de la célula NC5T11puro #8 recibieron números comprendidos entre el 10 y el 21. Los clones originados a partir de la célula NC5T11 recibieron números entre el 34 y el 45, y los clones transfectados con pEF2PIX fueron denominados NC5T11PIXA- NC5T11PIXE. Los clones fueron comprobados para determinar la
 35 presencia del vector respectivo mediante PCR. En la figura 6 se recoge una prueba inicial utilizando los cebadores 1 y 2. Todos los clones con una señal positiva experimentaron un cambio de orientación hacia el crecimiento en ExCELL VPRO. La readaptación se llevó a cabo mediante la siembra directa de $4,5 \times 10^5$ células en 5 ml de EXCELL VPRO en un frasco T25. Tras 6 semanas en cultivo estacionario, las células fueron trasladadas a tubos agitadores de polipropileno de 50 ml (TPP, Suiza), con una densidad de siembra de 6×10^4 células/ml en EXCELL VPRO, con un volumen total de 12 ml y sometidas a rotación, con un radio de 1 cm y una velocidad de 160 rpm. Los clones #10, 12, 14 (NC5T11puro #8pIXRARA); 34, 43 (NC5T11 pIXRARA); y NC5T11PIXB y NC5T11PIXC fueron seleccionados
 40 por tener la más alta viabilidad en presencia de tensión de cizallamiento. Los clones #34, 43 y NC5T11PIXC fueron clonados de nuevo y analizados para determinar la estabilidad del ADN integrado. La estabilidad se evaluó determinando la proporción de genes entre PIX y E1B, puesto que E1A+E1B y pIXRARA fueron introducidos en transfecciones diferentes, y los genes E1 fueron introducidos y se han mantenido en ausencia de selección durante > 2 años, por lo que se les considera integrados de forma estable. El ADN genómico fue aislado de los clones
 45 celulares seleccionados en 2 momentos: inmediatamente después de parada para la selección de higromicina (pronto); después de 2 meses ante la ausencia de presión derivada de la selección (tarde). Los niveles de ADN PIX y E1B se determinaron mediante PCR en tiempo real (ABI 7000, CYBR Green) en 2 concentraciones de ADN. En la figura 7 se muestran ejemplos de esta evaluación. El vector pEF2PIXRARA se mantiene de forma estable en los subclones #34 y 43, con aproximadamente 0,4-0,6 copias de PIXRARA por E1B. El clon NCST11PIXC contiene
 50 originalmente 4 copias de pIX por E1B. Este número se reduce a la mitad durante el transcurso del experimento.

Ejemplo 6: crecimiento del NC5T11 pX-RARA dependiente del ácido retinoico

El ácido retinoico (RA) es un inductor de la diferenciación celular. La diferenciación suele estar asociada a un crecimiento celular reducido. La respuesta ante el RA depende de la expresión del receptor retinoico alfa, un factor de transcripción activado por RA. El RA tiene un gran efecto sobre la PML (leucemia promielocítica), revirtiendo el fenotipo transformado mediante la detención del crecimiento.

Tal y como se muestra en la figura 8, el tratamiento de RA con una concentración de 6 µg/ml no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del NC5T11 ni del clon NC5T11puro #8 con expresión de alfa-1-antitripsina. No obstante, el crecimiento de los clones 14 (NC5T11puro #8pIXRARA) y 34 (NC5T11 pIXRARA) se detuvo mediante un tratamiento con 6 µg/ml durante 5 días en un cultivo adherente en DMEM/F12 con un 5% de FCS.

Ejemplo 7: PIXRARA evita la inhibición de la replicación de los virus mediante interferón

Las células NC5 T11 y NC5T11 #34 fueron sembradas en placas de 6 pocillos de acuerdo con una concentración de $8,0 \times 10^5$ células/pocillo en DMEM/F12 con un 5% de FCS. Transcurridas 12 horas, se añadió interferón beta (rebif 44 de Serono) a los pocillos, en una concentración de 1 y 8 UI/ml. Transcurridos 30 minutos, las células tratadas con interferón y las células de control tanto de la NC5 T11 como de la NC5T11 n.º 34 estaban infectadas con el virus de la encefalomiocarditis (EMCV), con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,004. Transcurridas 24 horas, se recogieron los cultivos y se congelaron a -80°C para fraccionar las células. Esta suspensión se descongeló y se aclaró mediante centrifugación, con 800 x g durante 10 min. Los lisados fueron sometidos a titulación de virus por análisis de placas sobre células A549: resumiendo, las células A549 se sembraron en placas de 24 pocillos y crecieron hasta alcanzar la confluencia, fueron incubadas durante 30 minutos con lisados aclarados diluidos entre 10 y 2×10^5 veces, cubiertos con agarosa de baja gelificación tipo VII al 0,2% en RPMI con un 10% de FCS e incubados a 37°C durante 24 h. La capa de agarosa fue aspirada, las células se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS durante 20 min. a 20°C, se lavaron con agua y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente con solución Kristallviolett al 1% en etanol al 50% para así contar las placas de virus. Los resultados que se muestran en la figura 9 demuestran que la replicación del EMCV es bastante ineficaz en células NC5T11, y que es altamente sensible al tratamiento con interferón antes de la infección. A 8 UI/ml no existe ningún virus viable que pueda recuperarse del cultivo. Por el contrario, la replicación del virus en la NC5T11 #34 sólo resulta ligeramente afectada por el tratamiento con interferón. Además, incluso ante la ausencia de IFN exógeno, se observa un número superior de títulos para la NC5T11 #34. Los fenómenos muestran procesos de vacunación modelo habituales, puesto que muchas cepas de vacunación inducen una respuesta IFN en células productoras con una vía IFN intacta; la infección en una multiplicidad de infección (MOI) baja preferida en procesos de producción puede provocar la secreción de IFN, lo cual puede desembocar en un bloqueo de la replicación de virus de células que no se habían infectado inicialmente. Por tanto, la expresión de PIX puede permitir una mayor producción de virus titulados, empezando por una MOI baja.

Ejemplo 8: simulación de producción de proteínas mediante pIX-RARA

La NCST11puro #8pIXRARA con el vector F67 y la alfa-1-antitripsina se compararon con el clon inicial NC5T11puro #8 en su capacidad de producir alfa-1-antitripsina en un ensayos de los lotes del agitador. Las células se sembraron en EXCELL VPRO (JRH Biosciences) en una concentración de 6×10^4 células/ml en tubos agitadores de polipropileno de 50 ml (TPP, Suiza), con un volumen total de 12 ml y sometidos a rotación con un radio de 1cm y una velocidad de 160 rpm. El cultivo continuó hasta el día 22. Además de las células en suspensión, se formó un anillo de grupos de células adheridos a la pared del tubo. Las células de estos grupos conservaron una viabilidad superior al 70% a lo largo del proceso. Debido a que la disociación de estos grupos mediante tripsina o acutasa (PAA) no tuvo éxito, no se determinó la cinética de crecimiento ni las densidades celulares máximas. Las muestras se tomaron los días 9, 13 y 22, mientras que los títulos se determinaron mediante el análisis ELISA para la cuantificación de alfa-1-antitripsina. En la figura 10 se muestran los resultados.

Ejemplo 9: generación de células de retina de pato que expresan pIX

La línea celular CR, derivada de células primarias procedentes de retina de pato e inmortalizada de acuerdo con las directrices de riesgo definidas, está descrita en otro documento (solicitud de patente WO05042728, plásmido 60E-células de retina transfectadas). Las células fueron cultivadas en medio DMEM:F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.) complementado con suero fetal bovino al 5% (Biochrom AG, 12213 Berlín, Alemania) a 39°C y un 7,5% de CO₂. Para el pasaje, las células fueron brevemente tratadas con TrypLE Express (Invitrogen). El plásmido 76F pEFPIXI se linealizó con las enzimas de restricción Ssp I y Xmn I (ambas de New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, EE.UU.), y se purificó de acuerdo con una concentración de 400 ng/µl por cromatografía de afinidad (equipo de extracción de gel de Qiagen, 40724 Hilden, Alemania). 5µl (2 µg) del ADN purificado fueron transfectados en células CR con los reactivos Effectene (Qiagen): el ADN se mezcló con 16 µl de potenciador y en 200 µl de amortiguador EC. Tras 2 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 18 µl de Effectene y se permitió la formación de liposomas durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió de acuerdo con un volumen de 1 ml de cultivo sobre células sembradas hasta una confluencia del 80% en placas de 6

pocillos el día anterior. La alta eficacia de la transfección se confirmó con una transfección paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, EE.UU.).

Los cultivos transfectados de pIX se trasladaron a frascos T75 para su expansión tres días después de la transfección, y la selección se inició con 25 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). El medio fue sustituido una vez por semana con higromicina B, con un aumento de concentración hasta los 50 Ng/ml. Transcurridas tres semanas, un total de cuatro grandes focos habían sobrevivido, y se procedió a sembrarlos de nuevo en un frasco T25: las células fueron liberadas con TrypLE y recogidas con 100 x g durante 10 min., suspendidas de nuevo en medio nuevo y vertidas en un frasco T25.

Cuatro semanas después de la transfección, las células de un cultivo subconfluyente en un frasco T25 fueron liberadas con TrypLE en 5 ml de DMEM:F12 con un 5% de FCS. 2 ml de esta solución se mezclaron con el medio n.º 63032-1000M (JRH Biosciences, KS 66215, EE.UU.), un medio libre de componentes derivados de animales y destinado al mantenimiento de los cultivos en suspensión. Se añadió higromicina B a razón de 50 µg/ml. El ADN genómico fue aislado a partir de 2 ml del cultivo y sometido a PCR con respecto al transgén pIX mediante los cebadores V293 y V294. El control negativo fue facilitado a través de una reacción paralela sin ADN, mientras que el control positivo se efectuó mediante una reacción paralela con el plásmido 76F. El producto PCR esperado que se recoge en la figura 11 (panel izquierdo) pone de manifiesto la inserción estable del transgén pIX en las células CR, denominadas "CRpIX".

La expresión de la proteína PIX fue confirmada mediante la prueba Western Blott: 6x10⁵ células fueron fraccionadas mediante ebullición (20 mM de Tris, pH 7,4, 300 mM de NaCl, Na-desoxicolato al 1%, Triton® X-100 al 1%, SDS al 0,1%), y la proteína se separó mediante electroforesis en gel para ser trasladada posteriormente a una membrana de nailon. La PIX se detectó con el anticuerpo primario pIX (un generoso regalo del Dr. W. Seidel, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Alemania), y posteriormente reaccionó con un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo anterior y etiquetado con fosfatasa alcalina.

La señal del tamaño esperado de la figura 11 (panel derecho) confirma la expresión de la pIX en células CRpIX. No existía ninguna señal en el control negativo de 293 células preparadas en una reacción paralela.

Las células fueron cultivadas en el medio #63032-1000M para dos pasajes adicionales, y posteriormente fueron trasladadas al medio #14561-1000M (también de JRH Biosciences) para otros dos pasajes adicionales. Todos los medios de JHR estaban suplementados mediante 1 x con Glutamax I (Invitrogen) y 100 µg/ml de higromicina B.

Con el segundo pasaje en el medio n.º 14561-1000M, una pequeña fracción (aproximadamente 2% de un cultivo en suspensión de 5 ml) volvió a suspenderse de forma meticulosa en medio DMEM:F12 con FCS y a verterse en una placa de Petri de 15 cm de diámetro. Transcurridos 6 días, once focos fueron retirados a cavidades individuales de una placa de 12 pocillos y conservados en medio DMEM:F12 con FCS. Para el traslado de los clones, el medio fue aspirado y los discos de clonación (Sigma, MO, EE.UU.) remojados en TrypLE, aplicado brevemente y de forma directa sobre los clones y, posteriormente, trasladado a las cavidades llenas de medio. Los clones individuales se expandieron para llevar a cabo experimentos adicionales y para determinar las propiedades de crecimiento.

Para analizar el mantenimiento de la PIX en las células transfectadas de forma estable, se procedió a aislar el ADN genómico de 1x10⁶ células con el equipo QIAamp DNA Blood (Qiagen), y el número de moléculas E1B y PIX se determinó en 25 ng y 50 ng de ADN genómico en una reacción ABI 7000 TaqMan mediante la química de detección de SYBR Green (ABI). Los cebadores utilizados para la cuantificación fueron gTggTTgCTTCATgCTAgTg ((SEC ID n.º:13) y TCTTCAGCAgTgACAgTTg (SEC ID n.º:14) para E1B, ACCTACgAgACCgTgTCTg (SEC ID n.º:15) y gAgCCgTCAACTgTCATC (SEC ID n.º:16) para PIX. Puesto que el E1B fue introducido de forma independiente y debe mantenerse para que las células sobrevivan, este gen hace las veces de marcador interno para normalizar el número de copias PIX y la fuerza de la expresión génica.

La figura 12 pone de manifiesto un mantenimiento estable del transgén PIX en células CR en suspensión, incluso ante la ausencia de presión de selección. También demuestra que las células positivas en PIX experimentan un descenso en la velocidad de crecimiento. Se pudo observar de forma sistemática una reducción en la proliferación de todas las células (de aves y de humanos) en el momento de la transfección estable con un plásmido con expresión PIX, lo cual demuestra un impacto de la proteína PIX sobre la bioquímica de la célula huésped. Además, se aprecia una tendencia en las células CR adherentes y positivas en PIX que consiste en evitar el crecimiento en capas confluyentes (aumento de la inhibición del contacto).

Ejemplo 10: generación de células de somitas de pato que expresan pIX

La línea celular CS es obtenida a partir de de somitas embrionales, que también se describen en la solicitud de patente W005042728. La generación de células CS positivas en PIX se llevó a cabo en paralelo al procedimiento anteriormente descrito para la línea CR. Al contrario que en el caso del CRpIX, no se establecieron cultivos en suspensión para el CSpIX. La dependencia estricta del anclaje es una característica de las células CS. Una célula que no experimente proliferación en suspensión puede considerarse menos tumorigénica, puesto que el potencial

para desarrollar metástasis resulta notablemente perjudicado. La proteína PIX no cambia esta propiedad en las células CS. Por tanto, aunque tenga un efecto pleotrópico, esta proteína parece no afectar al fenotipo de transformación. Esta observación respalda el supuesto de que la PIX puede aplicarse de forma segura en los procesos biofarmacéuticos.

Ejemplo 11: efecto PIX sobre la replicación de MVA en células CS

Las células CS transfectadas de forma estable para la expresión PIX y las células CS parentales como referencia se sembraron en una placa de 6 pocillos de acuerdo con una concentración de 2×10^6 células/cavidad, y se infectaron con MVA de acuerdo con una MOI de 0,1 el día siguiente. Las imágenes para documentar las diferencias en el avance del CPE se tomaron a las 48 y a las 72 horas tras la infección. El rendimiento del virus en el sobrenadante 48 horas tras la infección y el rendimiento completo (sobrenadante junto con gránulo de célula lisada) 72 horas tras la infección se determinaron en un ensayo con microfoco. En la figura 13 se muestran los resultados: la presencia de PIX en las células CS parece demorar la aparición del CPE a las 48 horas tras la infección en comparación con la referencia parental. A las 72 horas tras la infección, ambos cultivos están completamente lisados, lo que sugiere que las diferencias en el alcance del CPE no se deben a una mezcla de células refractarias de MVA y susceptibles a dicho MVA en la población de CS.PIX.

Según los datos de los que se dispone, nunca se ha comprobado ninguna célula positiva en PIX para determinar un virus diferente al adenovirus cognado.

Ejemplo 12: efecto de PIX sobre la replicación de MVA en células CR

El efecto positivo de la proteína PIX también se cuantificó en las células CR. Al contrario que en las células CS, las células CR están adaptadas a la suspensión. Los cultivos en suspensión se prefieren para muchas aplicaciones industriales. Por este motivo, determinamos el efecto PIX en un sistema con estas características en contraposición a un cultivo adherente.

En el caso de las células CR, el efecto de respaldo de la PIX no es tan pronunciado como en las células CS, aunque se pueden observar de forma sistemática altos niveles de títulos relativos al MVA. Los rendimientos del MVA se optimizaron en una serie de experimentos, y se determinó que eran mayores 48 horas después de la infección en densidades celulares medias. La figura 14 muestra una comparación del clon en suspensión CR.HS (seleccionado a partir de varios clones como la línea celular con mayores rendimientos del MVA) y de la línea celular PR.MCX PIX(+). El eje de abscisas indica la MOI (0,01, 0,05 ó 0,1, respectivamente), mientras que el de ordenadas indica la rotura, y el tamaño de las burbujas indica las densidades celulares ($8, 2$ ó $0,8 \times 10^6$ células/ml, respectivamente). La rotura es la relación del virus saliente (o rendimiento) con respecto al virus entrante (el inóculo depende del número de células y de la MOI) y, por tanto, es una medida de la eficacia de la amplificación. En todas las configuraciones, las líneas celulares PIX(+) superan a la línea PIX(-) en rendimiento.

Ejemplo 13: exclusión nuclear de la PIX

Se generó un gen de fusión PIX-GFP para comprobar la distribución de la proteína PIX en las células madre y para superar una actividad de unión débil del anticuerpo disponible: el plásmido 76F pEFPIXI fue tratado con las enzimas de restricción Acc I y Dra I, y los extremos fueron redondeados mediante polimerasa Klenow (todo procedente de New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, EE.UU.). Fuera del complejo patrón de bandas, el fragmento deseado de 447 pb que contiene la secuencia de codificación de la PIX fue aislado mediante la extracción de gel de agarosa (equipo de extracción de gel de Qiagen, 40724 Hilden, Alemania). La enzima de restricción del Dra I reconoce el corte de la secuencia "ttTAAa" tras el último residuo de timidina, donde el triplete central "TAA" es el codón finalizador del marco de lectura abierto de la PIX. Por tanto, el fragmento de 447 pb está desprovisto de un codón finalizador. La fusión de este fragmento de acuerdo con el gen del EGFP en el plásmido pEGFP-N1 abierto con Sma I (también de New England Biolabs) genera un gen de fusión continua de la PIX seguido del EGFP. El plásmido resultante fue denominado p9GFP, mientras que la proteína de fusión expresada se denominará PIX-GFP en este texto.

Las células CS y CR fueron transfectadas con p9GFP y seleccionadas con $300 \mu\text{g/mL}$ de geneticina (Invitrogen) para una expresión estable de la PIX-GFP. En el transcurso de 2 semanas se observaron dos poblaciones con diferente expresión PIX-GFP: una población presentaba normalmente entre 2 y 5 puntos brillantes de PIX-GFP en el citoplasma, mientras que la otra población tenía una expresión más uniforme de PIX-GFP en el citoplasma y una acumulación más difusa de la señal GFP en una región próxima al núcleo. En ambos casos, los núcleos celulares aparecían como una región oscura, lo que apunta la posibilidad de que ninguna o muy pocas proteínas quiméricas acceden al núcleo. En la figura 15 se muestran ejemplos representativos de ambos tipos de clones en CRpIXGFP.

De acuerdo con este resultado, se encuentra una secuencia de exportación nuclear en el marco de lectura abierto de la PIX mediante la aplicación del algoritmo de búsqueda NetNES (Cour et al., Protein Eng. Des. Sel. 17, 527-536 (2004)) a la secuencia primaria de la PIX. El NES identificado por este programa es 313-GCACAAATTGGATTCTTTGACCCGGGAAGTT-342 (SEQ ID n.º: 17) (traducido: AQLDSLREL; SEC ID n.º: 18).

Según los datos de los que se dispone, esta es la primera vez que se ha descrito una señal con estas características en la proteína PIX. En cambio, en la bibliografía especializada no se ha descrito una secuencia de localización nuclear (NLS) para la PIX, y no se puede detectar una señal con estas características (por ejemplo, utilizando el algoritmo suministrado por la Columbia University en <http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pi>).

Por tanto, la localización citoplásmica de la PIX-GFP en las células de pato concuerda con la secuencia primaria de la PIX.

Ejemplo 14: variantes de fusión de la PIX GFP

La sorprendente exclusión nuclear de la PIX GFP fue investigada mediante constructos adicionales de fusión de la PIX. A partir del constructo p9GFP, anteriormente descrito, se derivó un plásmido de expresión PIX-GFP-NLS mediante la inserción de los oligonucleótidos sintéticos i185 e i186. Estos oligonucleótidos fueron desnaturalizados a 80°C durante 5 min., y se permitió que se hibridaran en 10 mM de MgCl₂ a través de un enfriamiento gradual hasta alcanzar la temperatura ambiente para proporcionar:

5'-GATGTACAAAGATCCGAAGAAGAACCGCAAAGGTTAACGCGGCCGCAC-3' (SEQ ID n.º:19)

3'-CTACATGTTTCTAGGCTTCTTCTTGCGTTTCCAATTGCGCCGGCGTG-5' (SEQ ID n.º:20)

Este oligonucleótido de doble cadena fue digerido con BsrG I y Not I, e insertado en los mismos sitios del p9GFP. Traducido, la inserción añade una secuencia NLS (PKKNRK; SEC ID n.º: 21) a la proteína de fusión PIX-GFP que se asemeja a la NLS del virus 40 de los simios. Un nuevo sitio Hpa I introducido con esta inserción sirve como marcador de diagnóstico para confirmar la clonación satisfactoria. El plásmido resultante es denominado p9 GFP-NLS; la proteína expresada PIX-GFP-NLS y la codificación del marco de lectura abierto para la proteína PIX-GFP-NLS se muestran en las SEC ID n.º: 23 y 22, respectivamente.

Una proteína de fusión PIX-RARA con etiqueta GFP fue generada mediante la amplificación PCR de un fragmento con contenido de PIXRARA y con cebadores EBR 44A (5'-GGATCCTTCCTCCTCGGGCGGGTGT-3'; (SEQ ID n.º: 24), V293 (5'-AAC-CAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT 3'; SEC ID n.º: 25) y plásmido n.º 67F pEF PIX RARA NEO como patrón. El amplicón de 1926 pb fue tratado mediante el polinucleótido quinasa e insertado en el pEGFP-C2 (Clontech), linealizado con EcoR I y redondeado con la enzima Klenow (todas las enzimas de New England Biolabs). El plásmido resultante se denomina p9 GFP RARA, y la proteína expresada PIX GFP RARA.

La figura 16 muestra la distribución intracelular de las diversas proteínas con etiqueta GFP en las células CHO transfectadas de forma transitoria.

Ejemplo 15: PIX e interferón

Muchos virus inducen la respuesta inmunitaria celular innata a través del TLR-3 (receptor 3 de tipo Toll). El TLR-3 reconoce el ARN de doble cadena, un patrón distintivo de la replicación viral. Entre las funciones del TLR-3 se encuentra la activación del NFkB y del interferón de tipo I (Alexopoulou et al., Nature 413, 732-738 (2001)). El interferón actúa de mediador en un estado antiviral en la célula huésped. Se examinó el efecto de la inducción del interferón a través de un ARN artificial de doble cadena, poli I:poli C (ácido polinosínico-policidílico, Sigma). Sorprendentemente, las células CR y CRpIX mostraron muy poca sensibilidad poli I:poli C, mientras que las células CS respondieron claramente al inductor. Inesperadamente, las células CS positivas en PIX respondieron más rápido y en menores concentraciones que las células CS parentales (fig. 17). Según los datos de los que se dispone, en la bibliografía especializada actual no se ha descrito ninguna conexión entre la PIX y el interferón.

El efecto de respaldo de la PIX en relación con el MVA era más intenso en las células CS que en las células CR, mientras que las células CS respondían al sustituto del ARN de doble cadena mejor que las células CR. Es conocido que el MVA induce al interferón y que este virus también está provisto de proteínas que mitigan la respuesta de dicho interferón. De esta forma, se determinó el efecto del inductor poli I:poli C sobre el MVA en células CRp9GFP y CSp9GFP. La figura 18 sugiere que las células infectadas por MVA sufren menos como consecuencia de la inducción poli I:poliC que las células de control sin infectar. Esta observación concuerda con el hecho de que el MVA induce la respuesta inmune celular innata e interfiere en ésta, además de conectar con la observación inesperada respecto a que la PIX procedente de un adenovirus humano en células de ave coopera con proteínas antivirales de un poxvirus altamente atenuado para aumentar el rendimiento de este último virus.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Probiogen

<120> Factor proteico que aumenta la productividad, nuevas líneas celulares y sus usos.

<130> 062069wo

<150> EP05110453.7<151> 2005-11-08

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 423

<212> ADN

<213> Adenovirus tipo 37

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(423)

<400> 1

atg agc acc aac tcg ttt gat gga agc att gtg agc tca tat ttg aca	48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
1 5 10 15	

acg cgc atg ccc cca tgg gcc ggg gtg cgt cag aat gtg atg ggc tcc	96
Thr Arg Met Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser	
20 25 30	

agc att gat ggt cgc ccc gtc ctg ccc gca aac tct act acc ttg acc	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	

tac gag acc gtg tct gga acg ccg ttg gag act gca gcc tcc gcc gcc	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	

gct tca gcc gct gca gcc acc gcc cgc ggg att gtg act gac ttt gct	240
Ala Ser Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	

ttc ctg agc ccg ctt gca agc agt gca gct tcc cgt tca tcc gcc cgc	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	

gat gac aag ttg acg gct ctt ttg gca caa ttg gat tct ttg acc cgg	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	

gaa ctt aat gtc gtt tct cag cag ctg ttg gat ctg cgc cag cag gtt	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	

tct gcc ctg aag gct tcc tcc cct ccc aat gcg gtt taa	423
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val	
130 135 140	

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Adenovirus tipo 37

<400> 2

ES 2 380 975 T3

Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
20 25 30

Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
35 40 45

Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
50 55 60

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
65 70 75 80

Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
85 90 95

Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
100 105 110

Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
115 120 125

Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val
130 135 140

<210> 3
<211> 1635
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> fusion protein pIX-RARA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1635)

<400> 3
atg agc acc aac tcg ttt gat gga agc att gtg agc tca tat ttg aca 48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
1 5 10 15
acg cgc atg ccc cca tgg gcc ggg gtg cgt cag aat gtg atg ggc tcc 96

ES 2 380 975 T3

Thr	Arg	Met	Pro	Pro	Trp	Ala	Gly	Val	Arg	Gln	Asn	Val	Met	Gly	Ser	
			20					25					30			
agc	att	gat	ggc	cgc	ccc	gtc	ctg	ccc	gca	aac	tct	act	acc	ttg	acc	144
Ser	Ile	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Thr	
		35					40					45				
tac	gag	acc	gtg	tct	gga	acg	ccg	ttg	gag	act	gca	gcc	tcc	gcc	gcc	192
Tyr	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	
	50					55					60					
gct	tca	gcc	gct	gca	gcc	acc	gcc	cgc	ggg	att	gtg	act	gac	ttt	gct	240
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	
65					70				75					80		
ttc	ctg	agc	ccg	ctt	gca	agc	agt	gca	gct	tcc	cgt	tca	tcc	gcc	cgc	288
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg	
			85					90						95		
gat	gac	aag	ttg	acg	gct	ctt	ttg	gca	caa	ttg	gat	tct	ttg	acc	cgg	336
Asp	Asp	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Asp	Ser	Leu	Thr	Arg	
			100				105						110			
gaa	ctt	aat	gtc	gtt	tct	cag	cag	ctg	ttg	gat	ctg	cgc	cag	cag	gtt	384
Glu	Leu	Asn	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gln	Val	
		115				120						125				
tct	gcc	ctg	aag	gct	tcc	tcc	cct	ccc	aat	gcg	gtt	gcc	acc	att	gag	432
Ser	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Ala	Val	Ala	Thr	Ile	Glu	
	130					135					140					
acc	cag	agc	agc	agt	tct	gaa	gag	ata	gtg	ccc	agc	cct	ccc	tcg	cca	480
Thr	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	
145					150				155						160	
ccc	cct	cta	ccc	cgc	atc	tac	aag	cct	tgc	ttt	gtc	tgt	cag	gac	aag	528
Pro	Pro	Leu	Pro	Arg	Ile	Tyr	Lys	Pro	Cys	Phe	Val	Cys	Gln	Asp	Lys	
			165					170						175		
tcc	tca	ggc	tac	cac	tat	ggg	gtc	agc	gcc	tgt	gag	ggc	tgc	aag	ggc	576
Ser	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Ser	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	
		180				185							190			
ttc	ttc	cgc	cgc	agc	atc	cag	aag	aac	atg	gtg	tac	acg	tgt	cac	cgg	624
Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Ile	Gln	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Thr	Cys	His	Arg	
		195				200						205				
gac	aag	aac	tgc	atc	atc	aac	aag	gtg	acc	cgg	aac	cgc	tgc	cag	tac	672
Asp	Lys	Asn	Cys	Ile	Ile	Asn	Lys	Val	Thr	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr	
	210					215					220					
tgc	cga	ctg	cag	aag	tgc	ttt	gaa	gtg	ggc	atg	tcc	aag	gag	tct	gtg	720
Cys	Arg	Leu	Gln	Lys	Cys	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Val	
225				230					235					240		
aga	aac	gac	cga	aac	aag	aag	aag	aag	gag	gtg	ccc	aag	ccc	gag	tgc	768
Arg	Asn	Asp	Arg	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Val	Pro	Lys	Pro	Glu	Cys	
			245					250						255		
tct	gag	agc	tac	acg	ctg	acg	ccg	gag	gtg	ggg	gag	ctc	att	gag	aag	816
Ser	Glu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Thr	Pro	Glu	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys	
			260				265						270			

ES 2 380 975 T3

gtg	cgc	aaa	gcg	cac	cag	gaa	acc	ttc	cct	gcc	ctc	tgc	cag	ctg	ggc	864
Val	Arg	Lys	Ala	His	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Cys	Gln	Leu	Gly	
		275					280					285				
aaa	tac	act	acg	aac	aac	agc	tca	gaa	caa	cgt	gtc	tct	ctg	gac	att	912
Lys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Arg	Val	Ser	Leu	Asp	Ile	
	290					295					300					
gac	ctc	tgg	gac	aag	ttc	agt	gaa	ctc	tcc	acc	aag	tgc	atc	att	aag	960
Asp	Leu	Trp	Asp	Lys	Phe	Ser	Glu	Leu	Ser	Thr	Lys	Cys	Ile	Ile	Lys	
305					310					315					320	
act	gtg	gag	ttc	gcc	aag	cag	ctg	ccc	ggc	ttc	acc	acc	ctc	acc	atc	1008
Thr	Val	Glu	Phe	Ala	Lys	Gln	Leu	Pro	Gly	Phe	Thr	Thr	Leu	Thr	Ile	
				325					330						335	
gcc	gac	cag	atc	acc	ctc	ctc	aag	gct	gcc	tgc	ctg	gac	atc	ctg	atc	1056
Ala	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	
			340					345					350			
ctg	cgg	atc	tgc	acg	cgg	tac	acg	ccc	gag	cag	gac	acc	atg	acc	ttc	1104
Leu	Arg	Ile	Cys	Thr	Arg	Tyr	Thr	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Met	Thr	Phe	
		355					360					365				
tgc	gac	ggg	ctg	acc	ctg	aac	cgg	acc	cag	atg	cac	aac	gct	ggc	ttc	1152
Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Leu	Asn	Arg	Thr	Gln	Met	His	Asn	Ala	Gly	Phe	
	370					375					380					
ggc	ccc	ctc	acc	gac	ctg	gtc	ttt	gcc	ttc	gcc	aac	cag	ctg	ctg	ccc	1200
Gly	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Phe	Ala	Phe	Ala	Asn	Gln	Leu	Leu	Pro	
385					390					395					400	
ctg	gag	atg	gat	gat	gcg	gag	acg	ggg	ctg	ctc	agc	gcc	atc	tgc	ctc	1248
Leu	Glu	Met	Asp	Asp	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Cys	Leu	
				405					410					415		
atc	tgc	gga	gac	cgc	cag	gac	ctg	gag	cag	ccg	gac	cgg	gtg	gac	atg	1296
Ile	Cys	Gly	Asp	Arg	Gln	Asp	Leu	Glu	Gln	Pro	Asp	Arg	Val	Asp	Met	
			420					425					430			
ctg	cag	gag	ccg	ctg	ctg	gag	gcg	cta	aag	gtc	tac	gtg	cgg	aag	cgg	1344
Leu	Gln	Glu	Pro	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Val	Tyr	Val	Arg	Lys	Arg	
			435				440					445				
agg	ccc	agc	cgc	ccc	cac	atg	ttc	ccc	aag	atg	cta	atg	aag	att	act	1392
Arg	Pro	Ser	Arg	Pro	His	Met	Phe	Pro	Lys	Met	Leu	Met	Lys	Ile	Thr	
	450					455					460					
gac	ctg	cga	agc	atc	agc	gcc	aag	ggg	gct	gag	cgg	gtg	atc	acg	ctg	1440
Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Ser	Ala	Lys	Gly	Ala	Glu	Arg	Val	Ile	Thr	Leu	
465					470					475					480	
aag	atg	gag	atc	ccg	ggc	tcc	atg	ccg	cct	ctc	atc	cag	gaa	atg	ttg	1488
Lys	Met	Glu	Ile	Pro	Gly	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Ile	Gln	Glu	Met	Leu	
				485					490					495		
gag	gac	tca	gag	ggc	ctg	gac	act	ctg	agc	gga	cag	ccg	ggg	ggg	ggg	1536
Glu	Asp	Ser	Glu	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	
			500					505					510			
ggg	cgg	gac	ggg	ggg	ggc	ctg	gcc	ccc	ccg	cca	ggc	agc	tgt	agc	ccc	1584
Gly	Arg	Asp	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Cys	Ser	Pro	
		515					520					525				

ES 2 380 975 T3

agc	ctc	agc	ccc	agc	tcc	aac	aga	agc	agc	ccg	gcc	acc	cac	tcc	ccg	1632
Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Ser	Asn	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Ser	Pro	
530						535					540					

tga	1635
-----	------

<210> 4

<211> 544

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 4

ES 2 380 975 T3

Met 1	Ser	Thr	Asn 5	Ser 5	Phe	Asp	Gly	Ser 10	Ile 10	Val	Ser	Ser	Tyr 15	Leu 15	Thr
Thr	Arg	Met	Pro 20	Pro	Trp	Ala	Gly	Val 25	Arg	Gln	Asn	Val	Met 30	Gly	Ser
Ser	Ile	Asp 35	Gly	Arg	Pro	Val	Leu 40	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr 45	Thr	Leu	Thr
Tyr	Glu 50	Thr	Val	Ser	Gly	Thr 55	Pro	Leu	Glu	Thr	Ala 60	Ala	Ser	Ala	Ala
Ala 65	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala 70	Thr	Ala	Arg	Gly	Ile 75	Val	Thr	Asp	Phe	Ala 80
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu 85	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala 90	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala 95	Arg
Asp	Asp	Lys	Leu 100	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala 105	Gln	Leu	Asp	Ser	Leu 110	Thr	Arg
Glu	Leu	Asn 115	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Leu 120	Leu	Asp	Leu	Arg 125	Gln	Gln	Val
Ser	Ala 130	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser 135	Pro	Pro	Asn	Ala	Val 140	Ala	Thr	Ile	Glu
Thr 145	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser 150	Glu	Glu	Ile	Val	Pro 155	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro 160
Pro	Pro	Leu	Pro	Arg 165	Ile	Tyr	Lys	Pro	Cys 170	Phe	Val	Cys	Gln	Asp 175	Lys
Ser	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Ser	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly

ES 2 380 975 T3

180					185					190					
Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Ile	Gln	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Thr	Cys	His	Arg
		195					200					205			
Asp	Lys	Asn	Cys	Ile	Ile	Asn	Lys	Val	Thr	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Tyr
	210					215					220				
Cys	Arg	Leu	Gln	Lys	Cys	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Val
225					230					235					240
Arg	Asn	Asp	Arg	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Val	Pro	Lys	Pro	Glu	Cys
				245					250					255	
Ser	Glu	Ser	Tyr	Thr	Leu	Thr	Pro	Glu	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys
			260					265					270		
Val	Arg	Lys	Ala	His	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Cys	Gln	Leu	Gly
		275					280					285			
Lys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Arg	Val	Ser	Leu	Asp	Ile
	290					295					300				
Asp	Leu	Trp	Asp	Lys	Phe	Ser	Glu	Leu	Ser	Thr	Lys	Cys	Ile	Ile	Lys
305					310					315					320
Thr	Val	Glu	Phe	Ala	Lys	Gln	Leu	Pro	Gly	Phe	Thr	Thr	Leu	Thr	Ile
				325					330					335	
Ala	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile
			340					345					350		
Leu	Arg	Ile	Cys	Thr	Arg	Tyr	Thr	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Met	Thr	Phe
		355					360					365			
Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Leu	Asn	Arg	Thr	Gln	Met	His	Asn	Ala	Gly	Phe
		370				375					380				
Gly	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Phe	Ala	Phe	Ala	Asn	Gln	Leu	Leu	Pro
385					390					395					400
Leu	Glu	Met	Asp	Asp	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Cys	Leu
				405					410					415	
Ile	Cys	Gly	Asp	Arg	Gln	Asp	Leu	Glu	Gln	Pro	Asp	Arg	Val	Asp	Met
			420					425					430		

ES 2 380 975 T3

Leu Gln Glu Pro Leu Leu Glu Ala Leu Lys Val Tyr Val Arg Lys Arg
435 440 445

Arg Pro Ser Arg Pro His Met Phe Pro Lys Met Leu Met Lys Ile Thr
450 455 460

Asp Leu Arg Ser Ile Ser Ala Lys Gly Ala Glu Arg Val Ile Thr Leu
465 470 475 480

Lys Met Glu Ile Pro Gly Ser Met Pro Pro Leu Ile Gln Glu Met Leu
485 490 495

Glu Asp Ser Glu Gly Leu Asp Thr Leu Ser Gly Gln Pro Gly Gly Gly
500 505 510

Gly Arg Asp Gly Gly Gly Leu Ala Pro Pro Pro Gly Ser Cys Ser Pro
515 520 525

Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn Arg Ser Ser Pro Ala Thr His Ser Pro
530 535 540

<210> 5

<211> 3069

<212> DNA

5 <213> Adenovirus type 37

<400> 5

ttatagtcag ctgacgtgta gtgtatztat acccggtgag ttcctcaaga ggccactctt	60
gagtgccagc gagtagagtt ttctcctccg agccgctccg acaccgggac tgaaaatgag	120
acatattatc tgccacggag gtgttattac cgaagaaatg gccgccagtc ttttggaacca	180
gctgatcgaa gaggtactgg ctgataatct tccacctcct agccattttg aaccacctac	240
ccttcacgaa ctgtatgatt tagacgtgac ggccccgaa gatcccaacg aggaggcgg	300
ttcgcagatt tttcccgact ctgtaatggt ggcggtgcag gaagggattg acttactcac	360
ttttccgccg gcgcccgggt ctccggagcc gcctcacctt tcccggcagc ccgagcagcc	420
ggagcagaga gccttggggc cggtttctat gccaaacctt gtaccggagg tgatcgatct	480
tacctgccac gaggtgggt ttccaccag tgacgacgag gatgaagagg gtgaggagtt	540
tgtgttagat tatgtggagc accccgggca cggttgacag tcttgtcatt atcaccggag	600
gaatacgggg gaccagata ttatgtgttc gctttgctat atgaggacct gtggcatgtt	660
tgtctacagt aagtgaatat tatgggcagt ggggtgataga gtggtgggtt tgggtgtgta	720
atTTTTTTTT taatTTTTac agTTTTgtgg tttaaagaat tttgtattgt gatTTTTTTa	780
aaaggtcctg tgtctgaacc tgagcctgag cccgagccag aaccggagcc tgcaagacct	840
acccgccgtc ctaaaatggc gcctgctatc ctgagacgcc cgacatcacc tgtgtctaga	900

gaatgcaata gtagtacgga tagctgtgac tccggtcctt ctaacacacc tcttgagata 960
 caccgcgttg tcccgctgtg ccccatataa ccagttgccg tgagagttgg tgggcgtcgc 1020
 caggctgttg aatgtatcga ggacttgctt aacgagcctg ggcaaccttt ggacttgagc 1080
 tgtaaacgcc ccaggccata aggtgtaaac ctgtgattgc gtgtgtgggtt aacgcctttg 1140
 tttgctgaat gagttgatgt aagtttaata aagggtgaga taatgtttta cttgcatggc 1200
 gtgttaaagt gggcggggct taaagggtat ataatgcgcc gtgggctaatt cttgggttaca 1260
 tctgacctca tggaggtctg ggagtgtttg gaagatTTTT ctgctgtgcg taacttgctg 1320
 gaacagagct ctaacagtac ctcttggttt tggaggtttc tgtggggctc atcccaggca 1380
 aagttagtct gcagaattaa ggaggattac aagtgggaat ttgaagagct tttgaaatcc 1440
 tgtggtgagc tgtttgattc tttgaatctg ggtcaccagg cgcttttcca agagaaggtc 1500
 atcaagactt tggatTTTT caccgcggg cgcgctgcgg ctgctgttgc ttttttgagt 1560
 tttataaagg ataaatggag cgaagaaacc catctgagcg gggggtacct gctggatttt 1620
 ctggccatgc atctgtggag agcggttgtg agacacaaga atcgctgct actgttgtct 1680
 tccgtccgcc cggcgataat accgacggag gagcagcagc agcagcagga ggaagccagg 1740
 cggcggcggc aggagcagag cccatggaac ccgagagccg gcctggacct tcgggaatga 1800
 atgttgtaca ggtggctgaa ctgtatccag aactgagacg cattttgaca attacagagg 1860
 atgggcaggg gctaaagggg gtaaagaggg agcggggggc ttgtgaggct acagaggagg 1920
 ctaggaatct agcttttagc ttaatgacca gacaccgtcc tgagtgtatt acttttcaac 1980
 agatcaagga taattgcgct aatgagcttg atctgctggc gcagaagtat tccatagagc 2040
 agctgaccac ttactggctg cagccagggg atgattttga ggaggctatt agggatatatg 2100
 caaagggtggc acttaggcca gattgcaagt acaagatcag caaacttgta aatatcagga 2160
 attgttgcta catttctggg aacggggccg aggtggagat agatacggag gataggggtg 2220
 ccttttagatg tagcatgata aatatgtggc cgggggtgct tggcatggac ggggtggtta 2280
 ttatgaatgt aagggttact ggccccaatt ttagcggtag ggttttcctg gccaatacca 2340
 accttatcct acacggtgta agcttctatg ggtttaacaa tacctgtgtg gaagcctgga 2400
 ccgatgtaag ggttcggggc tgtgcctttt actgctgctg gaaggggggtg gtgtgtcgcc 2460
 ccaaaagcag ggcttcaatt aagaaatgcc tctttgaaag gtgtaccttg ggtatcctgt 2520
 ctgagggtaa ctccaggggtg cgccacaatg tggcctccga ctgtggttgc ttcagtctag 2580
 tgaaaagcgt ggctgtgatt aagcataaca tggatatgtg caactgcgag gacagggcct 2640
 ctcagatgct gacctgctcg gacggcaact gtcacctgct gaagaccatt cacgtagcca 2700
 gccactctcg caaggcctgg ccagtgtttg agcataacat actgaccgcg tgttccttgc 2760

ES 2 380 975 T3

atttgggtaa caggaggggg gtgttcctac cttaccaatg caatttgagt cacactaaga 2820
tattgcttga gcccagagagc atgtccaagg tgaacctgaa cgggggtgttt gacatgacca 2880
tgaagatctg gaagggtgctg aggtacgatg agacccgcac caggtgcaga ccctgcgagt 2940
gtggcggtaa acatattagg aaccagcctg tgatgctgga tgtgaccgag gagctgaggc 3000
ccgatcactt ggtgctggcc tgcacccgcg ctgagtttg ctctagcgat gaagatacag 3060
attgaggat 3069

<212>ADN

<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 6

10 aaccagcgct accatgagca ccaactcgt 29

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 7

20 aatggtggca accgcattgg gaggggagg 29

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

30 <400> 8
ccaatgcggt tgccaccatt gagaccaga 30

<210> 9

<211> 28

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

40 <400> 9
aaggagcgct ggcgagggt gtgtccat 28

<210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

50 <400> 10
aaccagcgct accatgagca ccaactcgt 29

<210> 11

<211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 11
 accgagcgct tgtttaaac cgcattgg 28

 10 <210> 12
 <211> 1313
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 15

cccagatgc ccagcttcta ttctagagcg ccgcgccggc gccgaatggg ttaacgggcg	60
gggggacacg cctccgtgcg cttgcgcggc gtcccttcgc ccgccttcg cagcgcagtc	120
acatgacccg cccaaccggc gtccgcctat aaaaagctga gtgttgacgt cagcgtttctc	180
ttccgccgtc gtgcgcccca tcctcggcgc gactcgttc tttcggttct acctgggaga	240
atccaccgcc atccgccaac gcgacagata tcaggtgagt aacctgcct cgctggtgcc	300
ccggagcggc ggcggggcct ccgcggggcc tacgctgcct agcctgggac gctggggccc	360
cccgtgccag gaggagacgt agcggcggcg gggccggagg acccggggct ggggaagcgg	420
ccgccgccat gtctgtgccc atgtctgtgc gccgcgtgt tcaccgagcc ctttctccgt	480
ttccgagggc gccataacct tgcccagacc tgggtggagc tgggttggtta gcggggatgg	540
gggtggggaa tgatgatgtg gcaggcgtag taatggcggg caccgcggtg gaagcgggga	600
gacagggagg cgccttatgt aaccgcggg ccgcgagttt gagatcgatt ttctgccggg	660
ggactagggg cggcagggaa tggcagaacg agcaaagcga cacctgaaag gctccccctt	720
tccttccaaa taccttctcc tgatgctgtt aatcgctcac cttaggcact tgctcttct	780
atgactccca gatgtacaaa gactcttatt gagacacgag gtgtaggctt gtggcagtta	840
gggccggttc ggctccccgt tatttcctgg ggtgggtggc cttgtctgat cccgtttgcc	900
aaggggtgac cttgcatttt atgatgaagc ttcttgctcg gggagtttg ggtggcccg	960
tgacaacgtg gagggggcct taggagagga ttcattccctt acgtgttttg ccccaaata	1020
gactttagta tttgtacctg gtatcaagga aatctgttga cactcagttt tattcctgag	1080
cacttttatt tctgggttgt caatcatgaa tgacacctat taacggtggt tccttgga	1140
ttgcggggtg gctcttaagg ggtgttaggc tggcaagatt cgggtgggctt ggggcacccc	1200
agcaccaacc cctcctggc cttgggcagt ctggttcgtt tggactgaac gctccgtgcc	1260
atgctgtgtt cctggaaatc acgagctggt ctgagcctcc ttgtcttgcc cag	1313

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 20

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 13	
	gtggttgctt catgctagtg	20
10	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 14	
	tcttcagcag gtgacagttg	20
20	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 15	
30	acctacgaga ccgtgtctg	19
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
40	gagccgtcaa cttgtcatc	19
	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia NES	
50	<400> 17	
	gcacaattgg attcttgac ccggaactt	30
	<210> 18	
	<211> 10	
55	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia NES	
60	<400> 18	
	Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg Glu Leu	
	1 5 10	

ES 2 380 975 T3

```

5  <210> 19
    <211> 48
    <212> ADN
    <213> Artificial
    <220>

    <223> Secuencia NLS

10  <400> 19
    gatgtacaaa gatccgaaga agaaccgcaa aggttaacgc ggccgcac 48

    <210> 20
    <211> 48
    <212> ADN
15  <213> Artificial

    <220>
    <223> secuencia NLS

20  <400> 20
    ctacatgttt ctaggcttct tcttgccgtt tccaattgcg ccggcgtg 48

    <210> 21
    <211> 6
25  <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
    <223> secuencia NLS

30  <400> 21

                                Pro Lys Lys Asn Arg Lys
                                1          5

    <210> 22
    <211> 1185
35  <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> proteína de fusión pIX-GFP_NLS

40  <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(1185)

45  <400> 22

    atg agc acc aac tcg ttt gat gga agc att gtg agc tca tat ttg aca 48
    Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
    1          5          10          15

    acg cgc atg ccc cca tgg gcc ggg gtg cgt cag aat gtg atg ggc tcc 96
    Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
    20          25          30

```

ES 2 380 975 T3

agc att gat ggt cgc ccc gtc ctg ccc gca aac tct act acc ttg acc	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	
tac gag acc gtg tct gga acg ccg ttg gag act gca gcc tcc gcc gcc	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	
gct tca gcc gct gca gcc acc gcc cgc ggg att gtg act gac ttt gct	240
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	
ttc ctg agc ccg ctt gca agc agt gca gct tcc cgt tca tcc gcc cgc	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	
gat gac aag ttg acg gct ctt ttg gca caa ttg gat tct ttg acc cgg	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	
gaa ctt aat gtc gtt tct cag cag ctg ttg gat ctg cgc cag cag gtt	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	
tct gcc ctg aag gct tcc tcc cct ccc aat gcg gtt tgg gat cca ccg	432
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val Trp Asp Pro Pro	
130 135 140	
gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg	480
Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val	
145 150 155 160	
ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc	528
Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser	
165 170 175	
gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg	576
Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu	
180 185 190	
aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc	624
Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu	
195 200 205	
gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac	672

ES 2 380 975 T3

Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	
210						215					220					
cac	atg	aag	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	tac	720
His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	
225					230					235					240	
gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag	gac	gac	ggc	aac	tac	aag	acc	768
Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				245					250					255		
cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac	acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	gag	816
Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	
			260					265					270			
ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc	aag	gag	gac	ggc	aac	atc	ctg	ggg	cac	aag	864
Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	
		275					280					285				
ctg	gag	tac	aac	tac	aac	agc	cac	aac	gtc	tat	atc	atg	gcc	gac	aag	912
Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	
	290					295					300					
cag	aag	aac	ggc	atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	cgc	cac	aac	atc	gag	960
Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	
305					310					315					320	
gac	ggc	agc	gtg	cag	ctc	gcc	gac	cac	tac	cag	cag	aac	acc	ccc	atc	1008
Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	
				325				330						335		
ggc	gac	ggc	ccc	gtg	ctg	ctg	ccc	gac	aac	cac	tac	ctg	agc	acc	cag	1056
Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	
			340					345					350			
tcc	gcc	ctg	agc	aaa	gac	ccc	aac	gag	aag	cgc	gat	cac	atg	gtc	ctg	1104
Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	
		355					360					365				
ctg	gag	ttc	gtg	acc	gcc	gcc	ggg	atc	act	ctc	ggc	atg	gac	gag	ctg	1152
Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	
	370					375					380					
tac	aaa	gat	ccg	aag	aag	aac	cgc	aaa	ggc	taa						1185
Tyr	Lys	Asp	Pro	Lys	Lys	Asn	Arg	Lys	Gly							
385					390											

<210> 23
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 23

Met	Ser	Thr	Asn	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr
1				5					10					15	

Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser

ES 2 380 975 T3

20					25					30					
Ser	Ile	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Thr
		35					40					45			
Tyr	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
	50					55					60				
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Thr	Asp	Phe	Ala
65						70					75				80
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg
				85					90					95	
Asp	Asp	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Asp	Ser	Leu	Thr	Arg
			100					105					110		
Glu	Leu	Asn	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gln	Val
		115					120					125			
Ser	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Ala	Val	Trp	Asp	Pro	Pro
		130				135					140				
Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val
145						150					155				160
Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser
				165					170					175	
Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu
			180					185					190		
Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu
		195					200					205			
Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp
		210				215					220				
His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr
225						230					235				240
Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr
				245					250					255	
Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu
			260					265					270		

ES 2 380 975 T3

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
275 280 285

Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
290 295 300

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
305 310 315 320

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
325 330 335

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
340 345 350

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
355 360 365

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
370 375 380

Tyr Lys Asp Pro Lys Lys Asn Arg Lys Gly
385 390

<210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> cebador

10

<400> 24
ggatcctcc tctcgggcg ggtgt 25

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> cebador

20

<400> 25
aaccagcgt accatgagca ccaactcgt 29

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un virus objetivo no adenoviral o una o más proteínas objetivo que no estén relacionadas con el adenovirus, comprendiendo dicho método:

(a) cultivar una célula inmortalizada de expresión de vertebrado, que puede obtenerse infectando o transfectando una célula huésped inmortalizada de vertebrado, con dicho virus objetivo, con un vector portador de secuencias de ácido nucleico que codifican dicho virus, o con un vector portador de secuencias de ácido nucleico que codifican dichas una o más proteínas objetivo, en el que dicha célula inmortalizada de expresión de vertebrado presenta integrado en su genoma de manera estable un gen que codifica la PIX de adenovirus y que expresa de manera estable dicha PIX de adenovirus; y

(b) aislar dicho virus objetivo no adenoviral o dichas una o más proteínas objetivo.

2. Método según la reivindicación 1, en el que:

(i) la PIX de adenovirus se modifica mediante fusión con un factor de transcripción, una proteína marcadora de fluorescencia, una enzima, o un péptido de tránsito; y/o

(ii) la PIX de adenovirus se expresa en la célula huésped y la célula de expresión en una cantidad de por lo menos 1 pg/μg de proteína celular; y/o

(iii) el gen que codifica la PIX de adenovirus está bajo el control de un promotor heterólogo u homólogo estable.

3. Método según la reivindicación 2, en el que:

(i) dicho factor de transcripción es el receptor de ácido retinoico alfa, dicha proteína marcadora de fluorescencia es la GFP o DsRed, dicha enzima es LacZ o dicho péptido de tránsito es un NLS; y/o

(ii) el mencionado promotor es un promotor celular constitutivo.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la PIX de adenovirus:

(i) presenta la secuencia como se representa en la SEC ID n°: 2;

(ii) está fusionada con el receptor de ácido retinoico alfa (RARA);

(iii) está fusionada con la GFP y una secuencia NLS;

(iv) está fusionada con la GFP; o

(v) está fusionada con una secuencia NLS aislada.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la PIX de adenovirus fusionada con el receptor de ácido retinoico alfa presenta la secuencia tal y como se representa en la SEC ID n°: 4, o en el que la PIX de adenovirus fusionada con la GFP y una secuencia NLS presenta la secuencia tal como se representa en la SEC ID n°: 23.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:

(i) la célula huésped y de expresión es portadora de genes (virales) inmortalizadores adicionales, incluyendo una proteína E1 de un adenovirus; y/o

(ii) la célula es portadora, además, de secuencias funcionales tales como secuencias de marcador de selección, sitios donadores/aceptores de empalme y/o secuencias de reconocimiento de recombinasa, que permiten la integración de una secuencia de ácido nucleico objetivo para ser expresada en la célula.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:

(i) el virus objetivo es seleccionado de entre virus de tipo salvaje, mutado o eliminado, virus adaptado al frío o atenuado, cepa de vacuna y un vector viral; o

(ii) la proteína o proteínas objetivo son seleccionadas a partir de anticuerpos, proteínas recombinantes, antígenos virales u hormonas peptídicas.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el vector viral se selecciona de entre un lentivirus, un poxvirus, un virus adenoasociado (aav), un herpesvirus o un flavivirus.

9 Método según la reivindicación 8, en el que el poxvirus se selecciona de entre un virus de la viruela bovina (cowpox), un virus de la viruela aviar (fowlpox) y un virus de la viruela del canario (canarypox).

5 10. Método según la reivindicación 9, en el que el virus de la viruela bovina es un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA).

11. Método según la reivindicación 7, en el que:

10 (i) las proteínas recombinantes se seleccionan de entre eritropoyetina, alfa-1-antitripsina, factores VIII y IX de coagulación de la sangre, e interferones; o

(ii) los antígenos virales se seleccionan de entre HA o NA de la gripe, HBV-S, proteína G del herpes o proteína G de la rabia.

15 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la célula huésped y de expresión se obtiene a partir del cerebro humano.

20 13. Método según la reivindicación 12, en el que la célula huésped y de expresión se obtiene a partir del cerebro fetal humano.

25 14. Método según la reivindicación 13, en el que la célula huésped es una célula NC5T11#34 y la célula de expresión se obtiene a partir de la célula NCST11#34, estando dicha célula NCST11#34 depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2744.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la célula huésped y de expresión es una célula de ave.

30 16. Método según la reivindicación 15, en el que la célula huésped y de expresión es una célula de ave obtenida a partir de la retina de pato o de somitas de pato.

35 17. Método según la reivindicación 16, en el que la célula huésped es una célula CR.PIX (17a11b), y la célula de expresión se obtiene a partir de la célula CR.PIX (17a11b), estando dicho célula CR.PIX (17a11b) depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2749.

18. Célula inmortalizada de expresión de un vertebrado para producir un virus objetivo no adenoviral, que:

40 (i) presenta integrado de manera estable en su genoma un gen que codifica la PIX de adenovirus y expresa de manera estable dicha PIX de adenovirus; y

(ii) está infectada o transfectada con un virus objetivo no adenoviral o con un vector portador de secuencias de ácido nucleico que codifican dicho virus.

19. Célula inmortalizada de expresión de un vertebrado según la reivindicación 18, en la que:

45 (i) la PIX de adenovirus se modifica mediante fusión con un factor de transcripción, una proteína de marcador de fluorescencia, una enzima o un péptido de tránsito; y/o

50 (ii) la PIX de adenovirus se expresa en la célula huésped y la célula de expresión en una cantidad de por lo menos 1 pg/μg de proteína celular; y/o

(iii) el gen que codifica la PIX de adenovirus está bajo el control de un promotor heterólogo u homólogo estable.

20. Célula inmortalizada de expresión de un vertebrado según la reivindicación 19, en la que:

55 (i) dicho factor de transcripción es el receptor de ácido retinoico alfa, dicha proteína marcadora de fluorescencia es la GFP o DsRed, dicha enzima es LacZ o dicho péptido de tránsito es un NLS; y/o

(ii) dicho promotor es un promotor celular constitutivo.

60 21. Célula inmortalizada de expresión de un vertebrado según las reivindicaciones 18 a 20, en la que el vector viral se selecciona de entre un lentivirus, un poxvirus, un virus adenoasociado (aav), un herpesvirus y un flavivirus.

65 22. Célula inmortalizada de expresión de un vertebrado según la reivindicación 18, en la que la célula de expresión es obtenida a partir del cerebro humano.

23. Uso de la célula inmortalizada de expresión de un vertebrado según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 para preparar un virus objetivo no adenoviral.

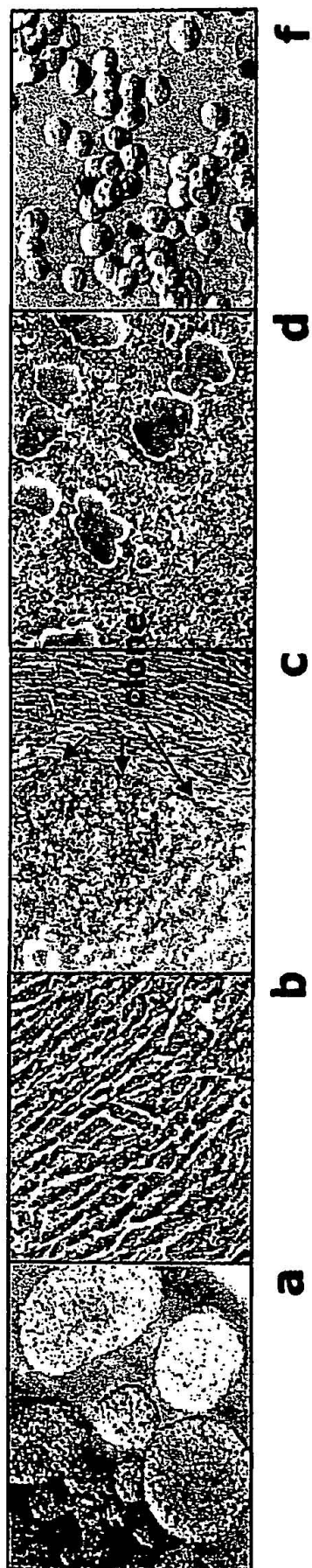


Fig. 1

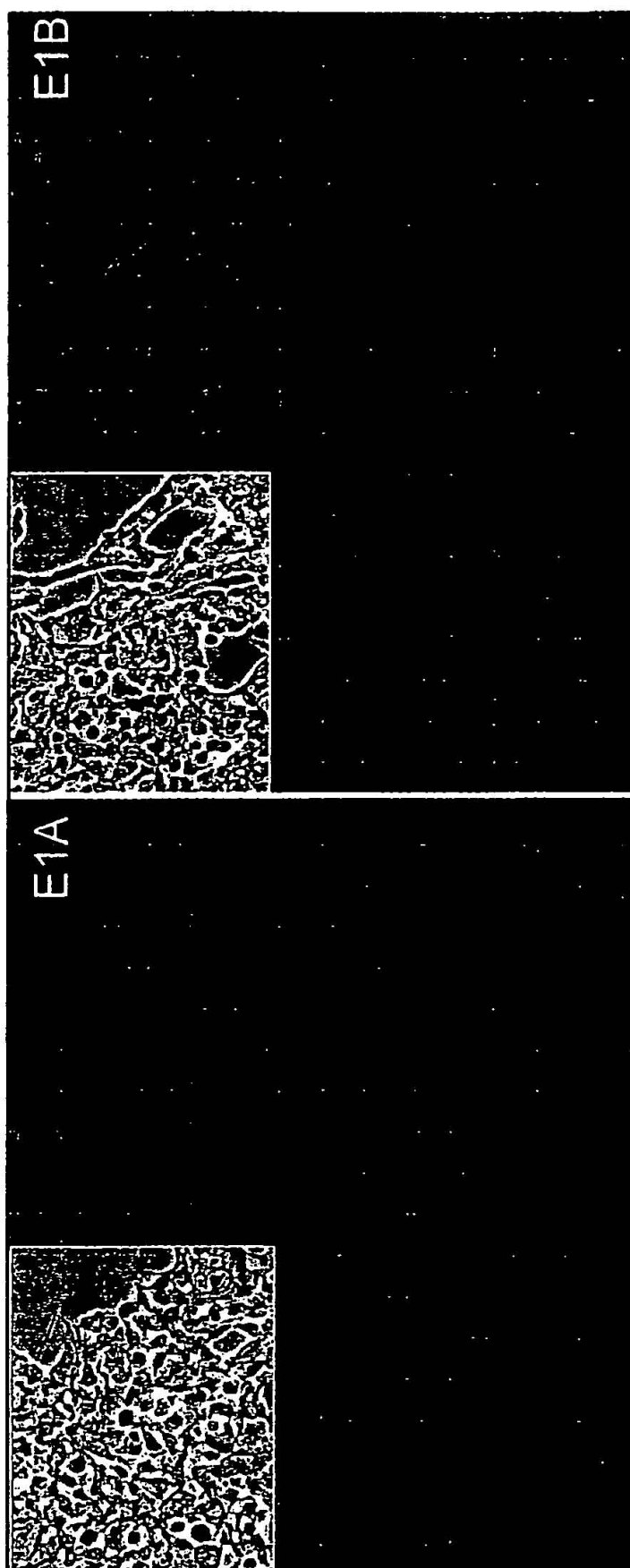


Fig. 2

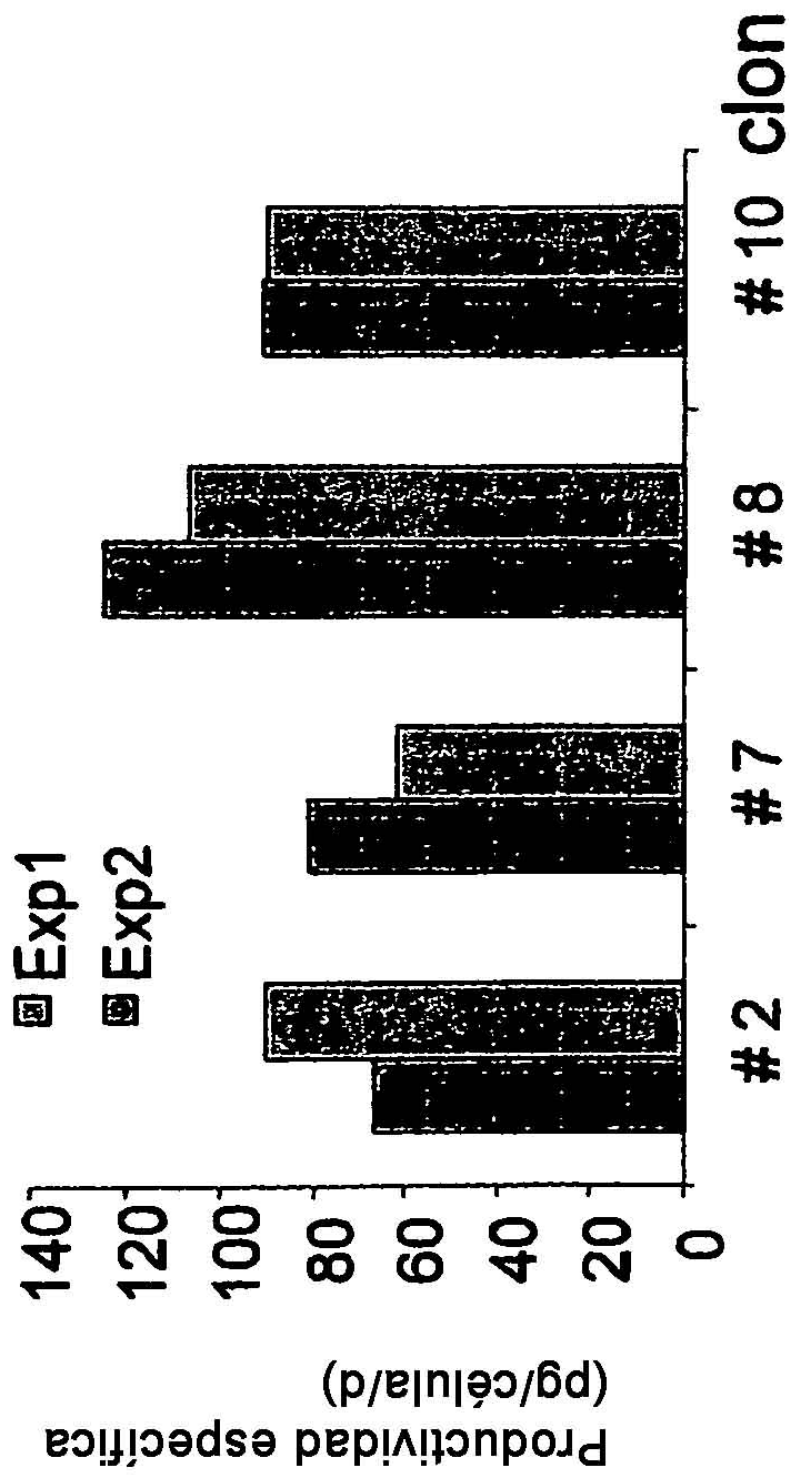


Fig. 3

Cultivo de lotes en medio ADCF

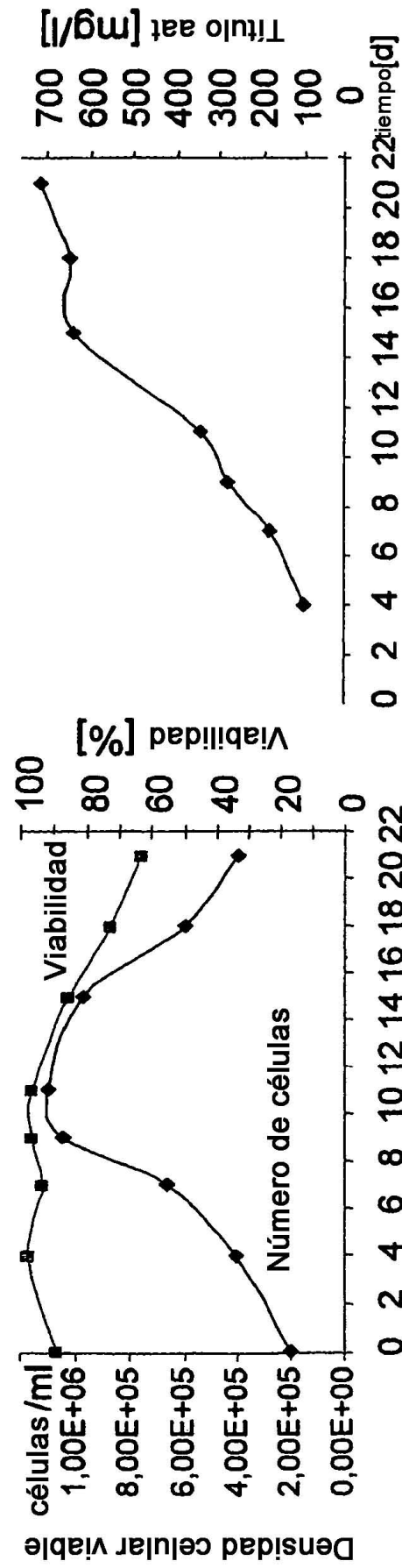


Fig. 4

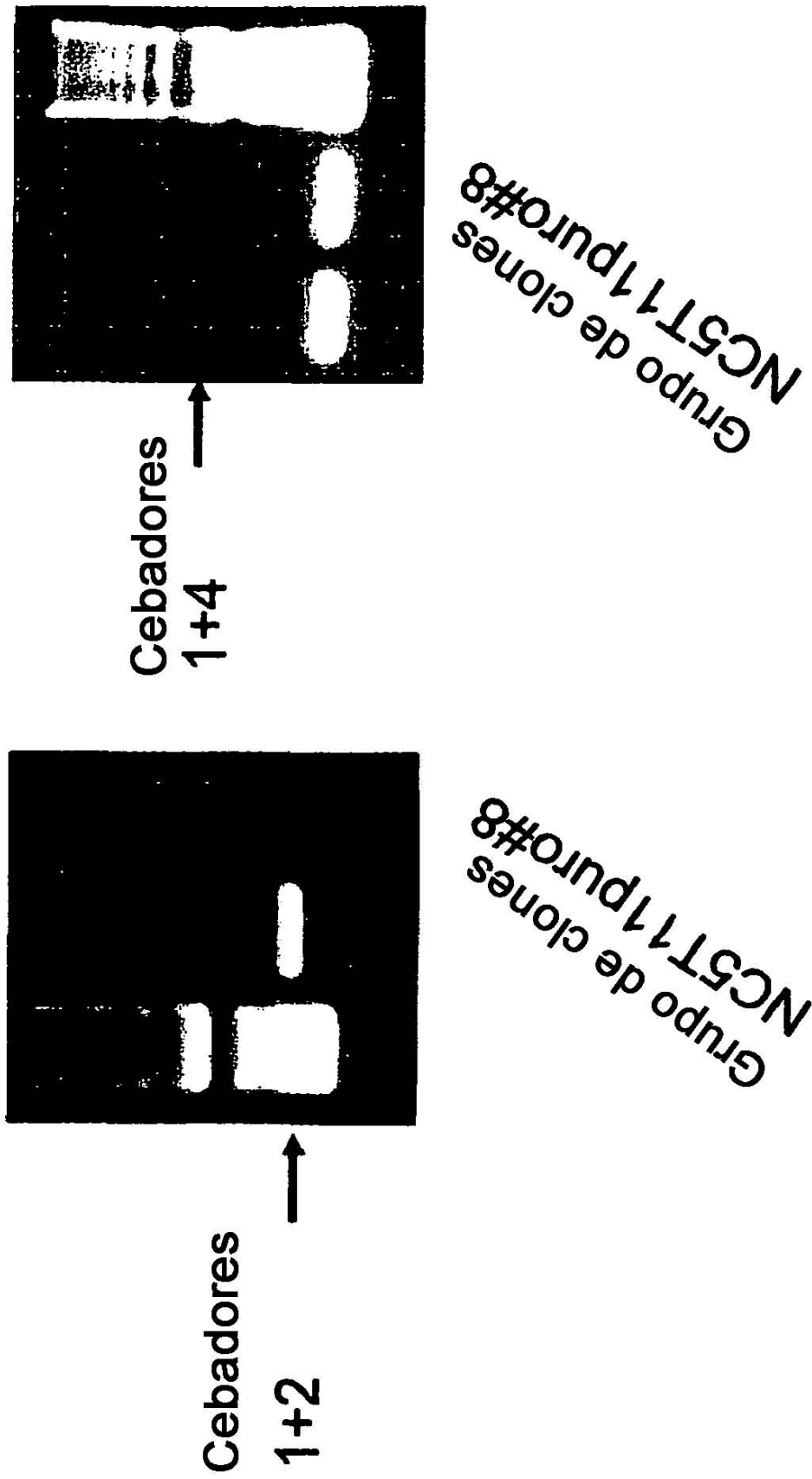


Fig. 5

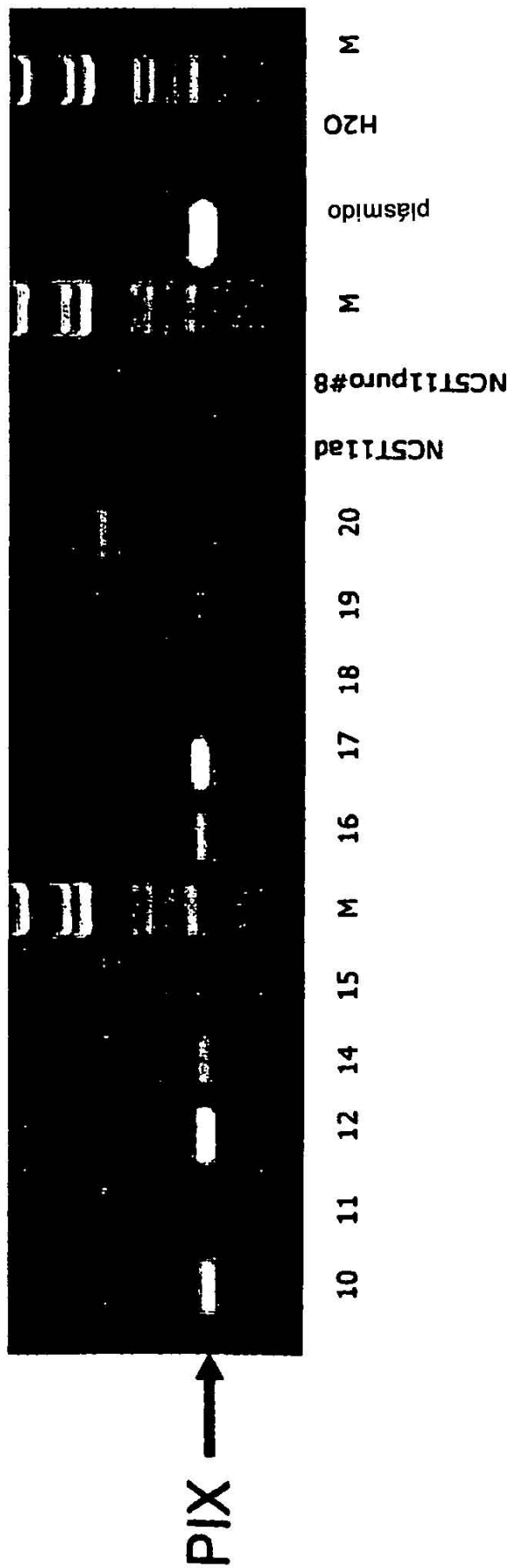


Fig. 6

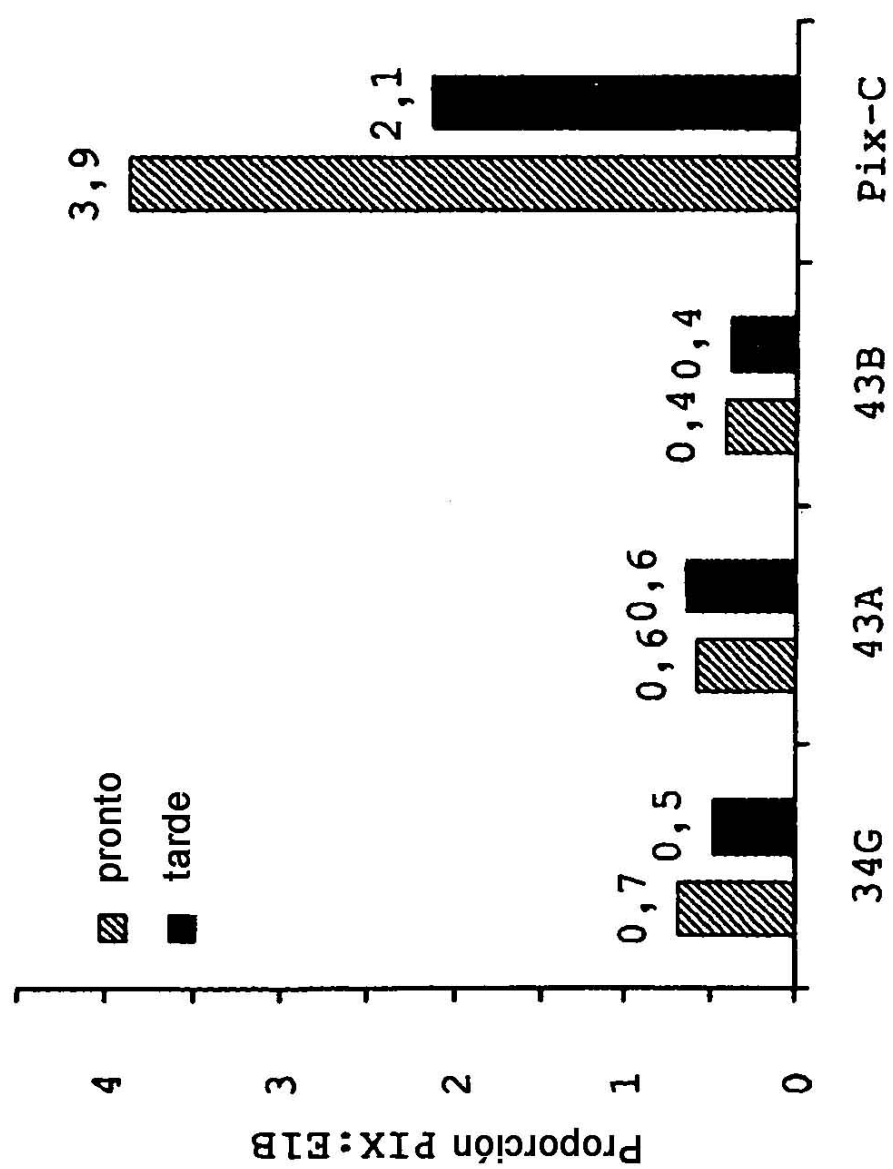


Fig. 7

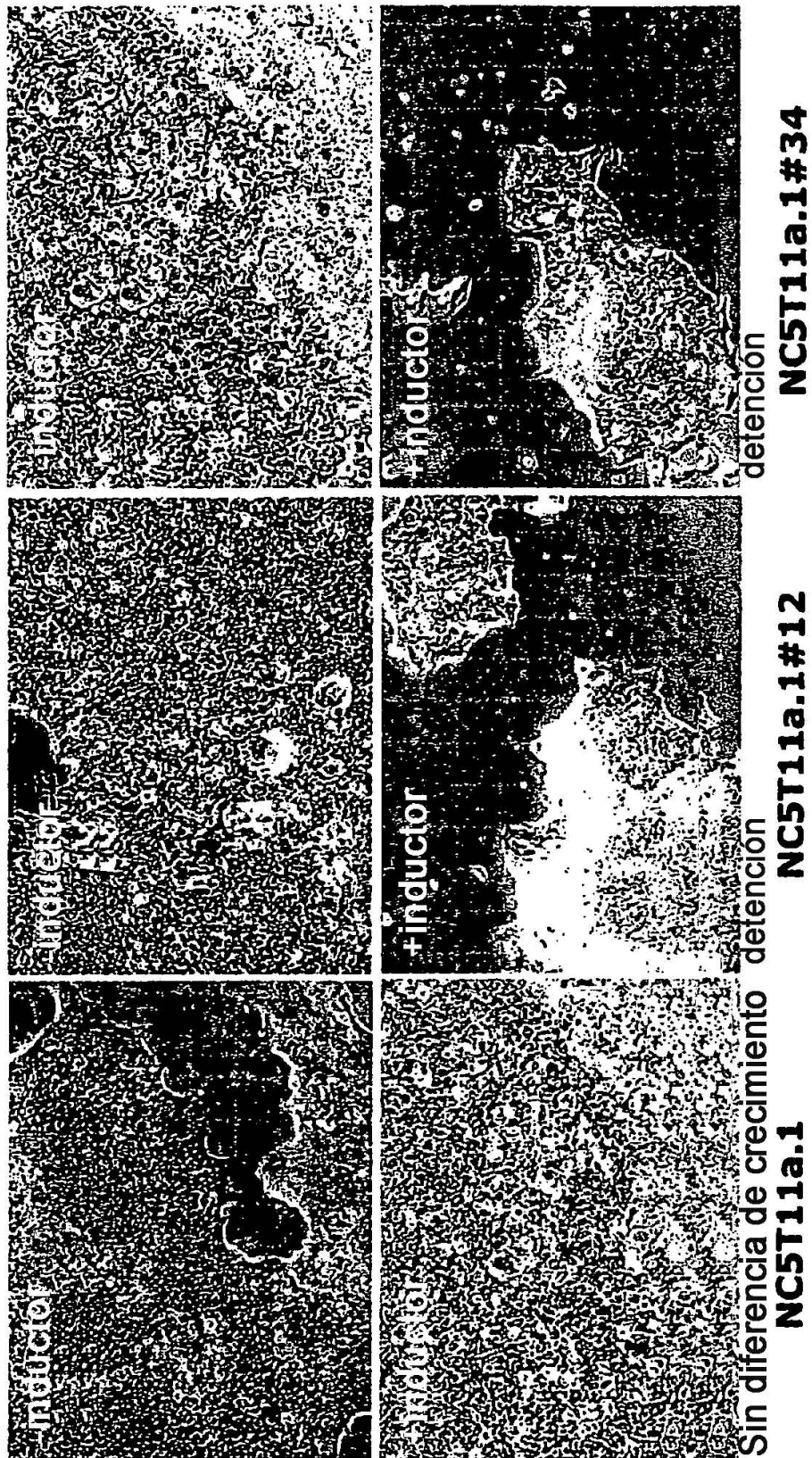


Fig. 8

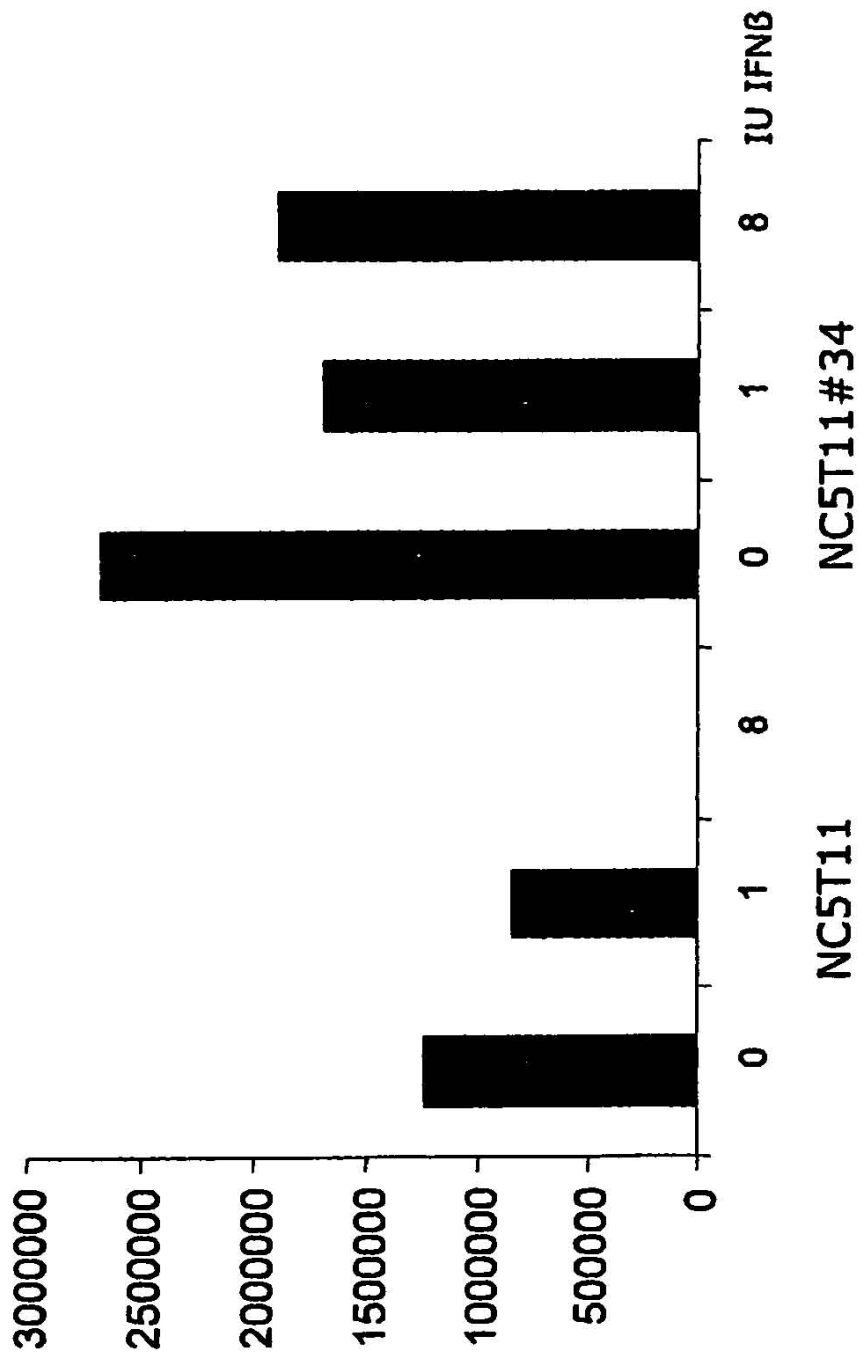


Fig. 9

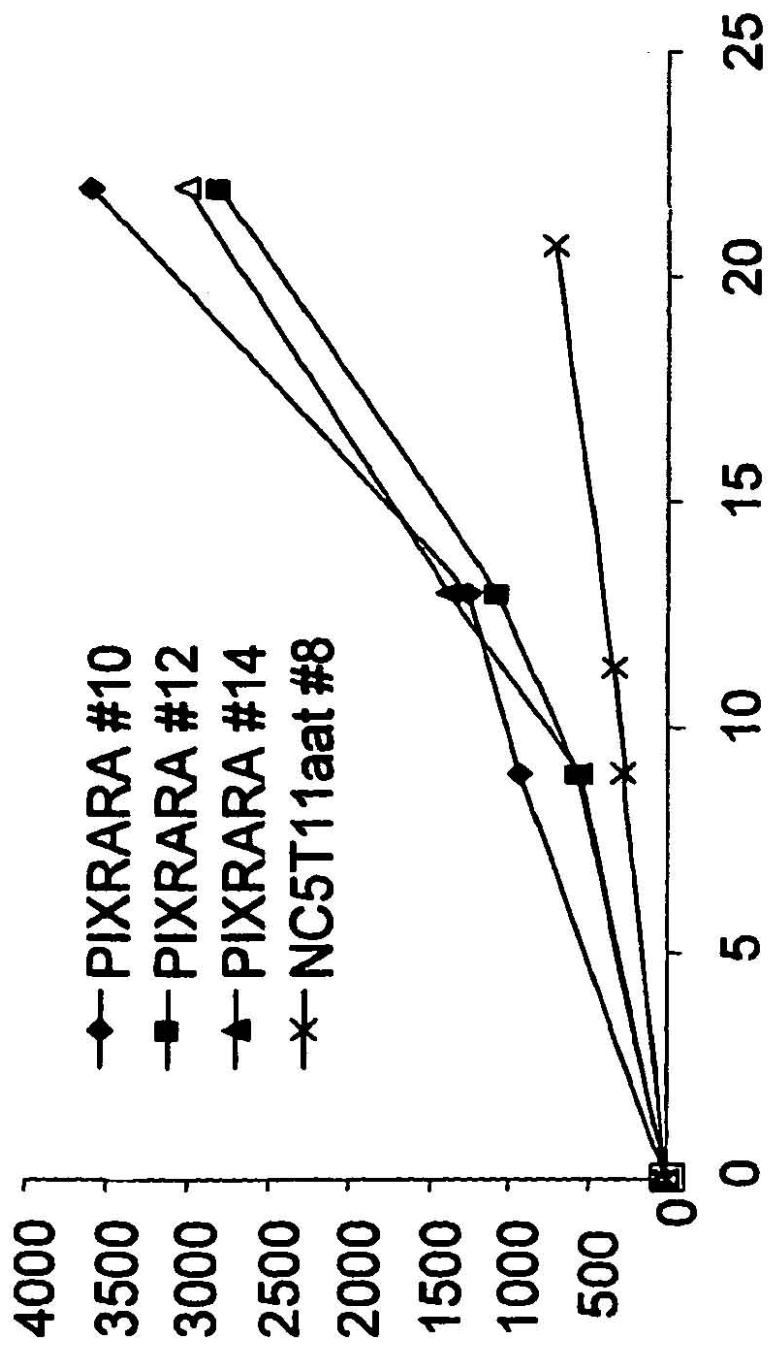


Fig. 10

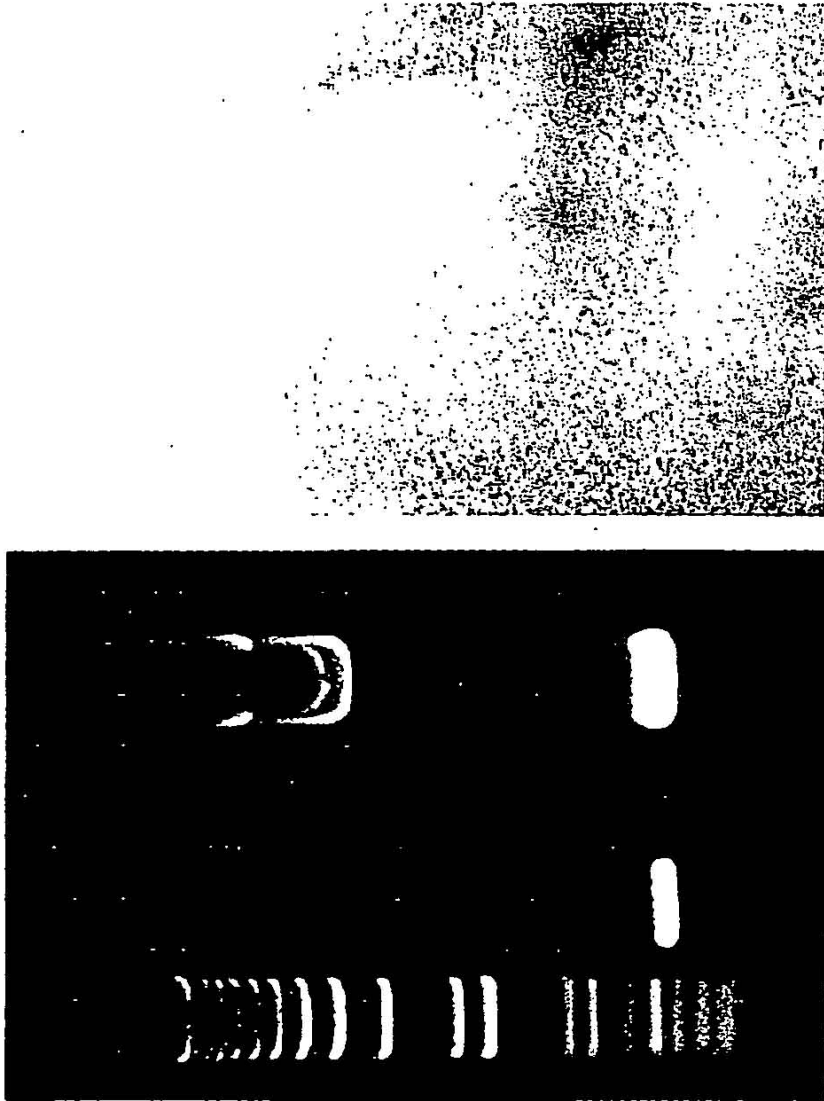


Fig. 11

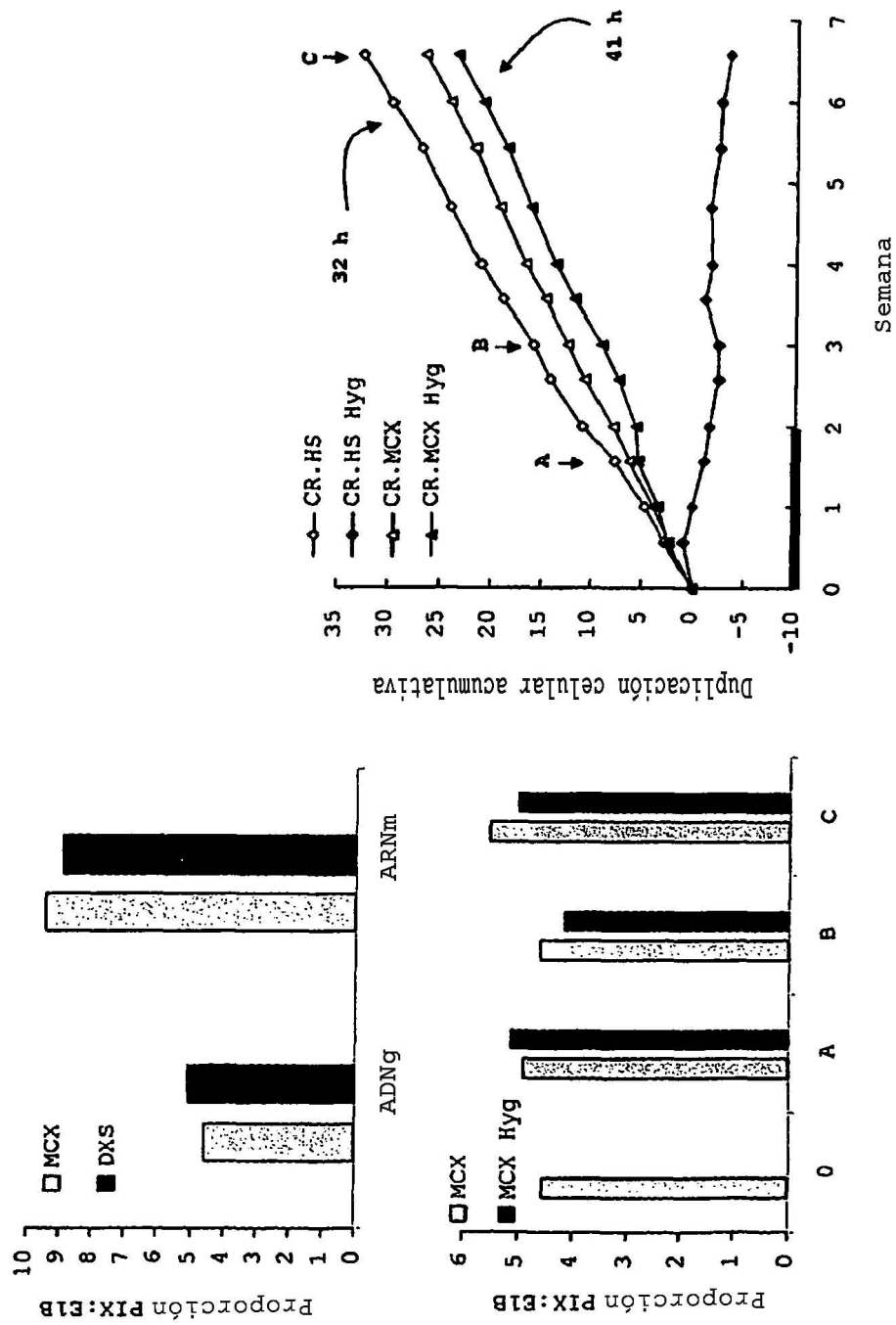


Fig. 12

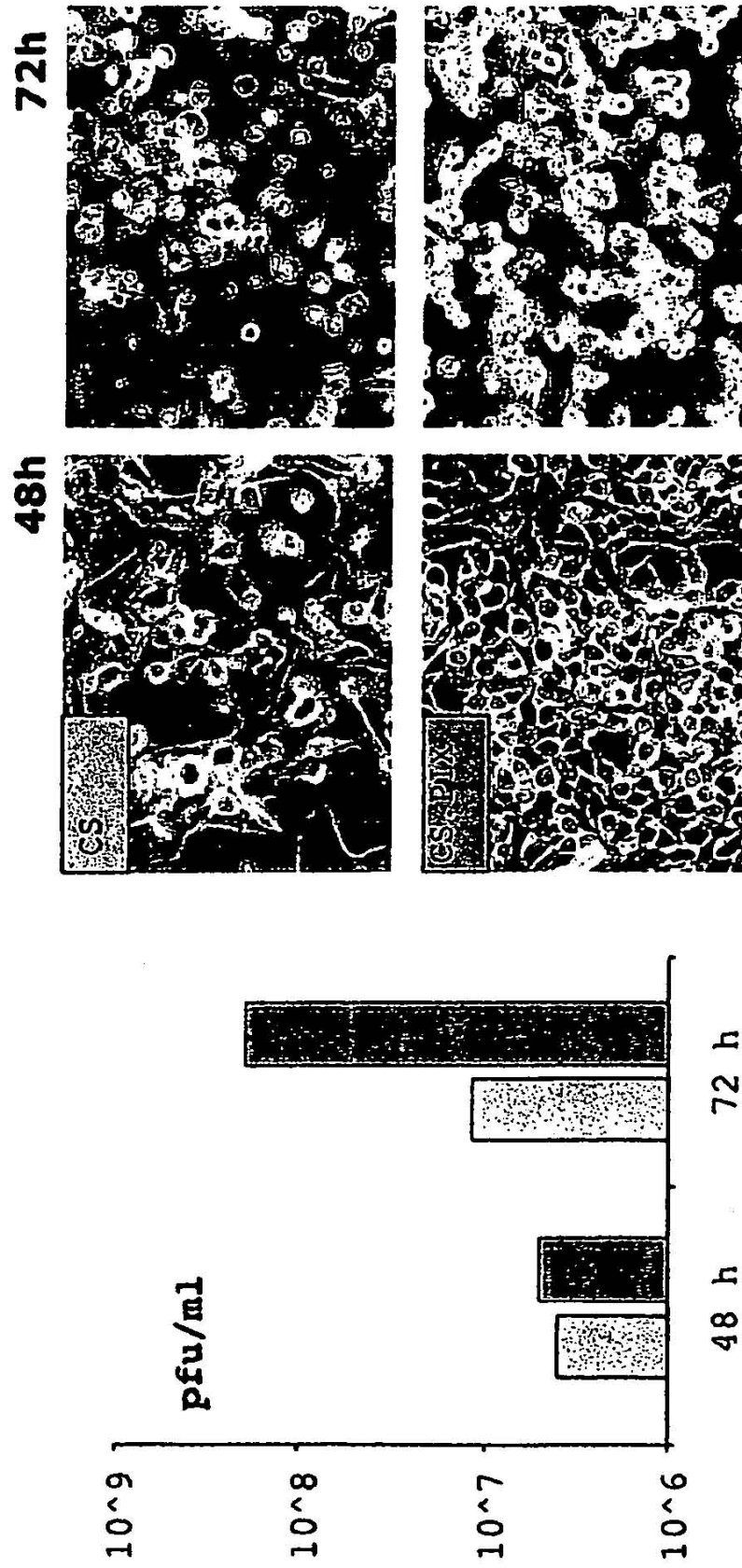


Fig. 13

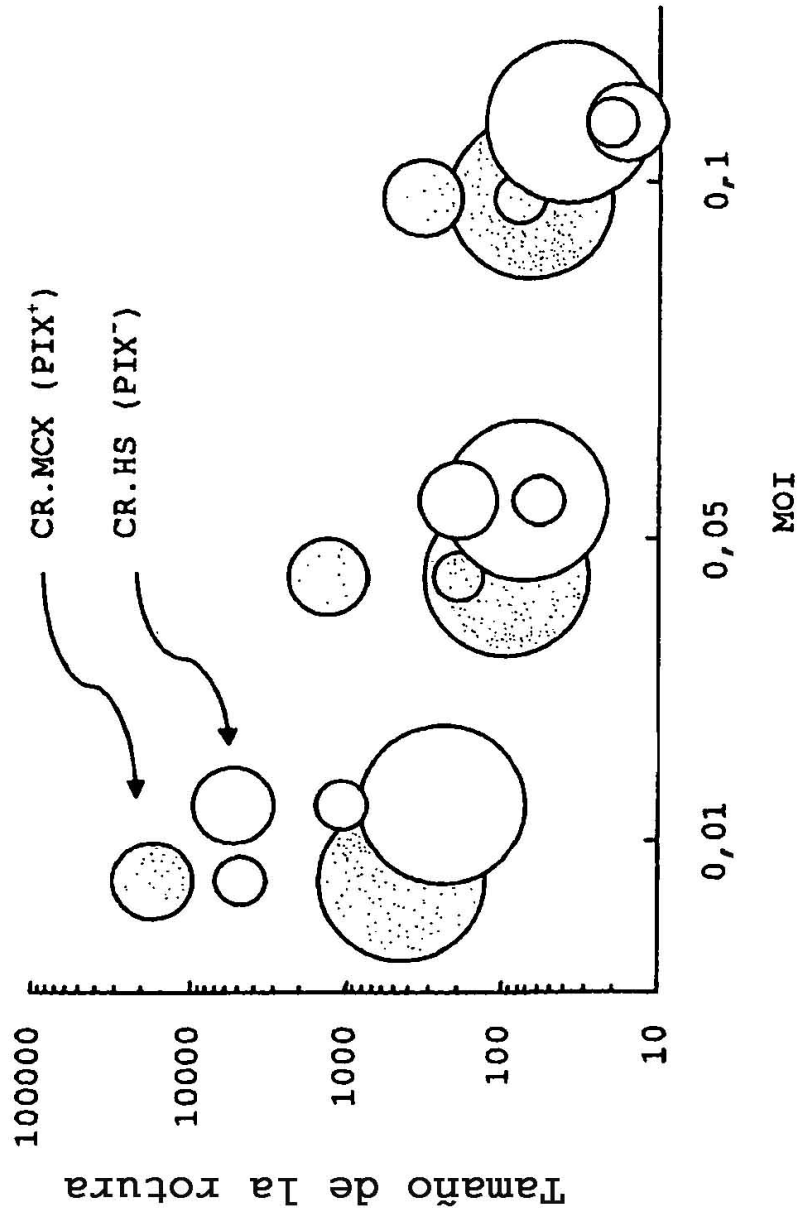


Fig. 14

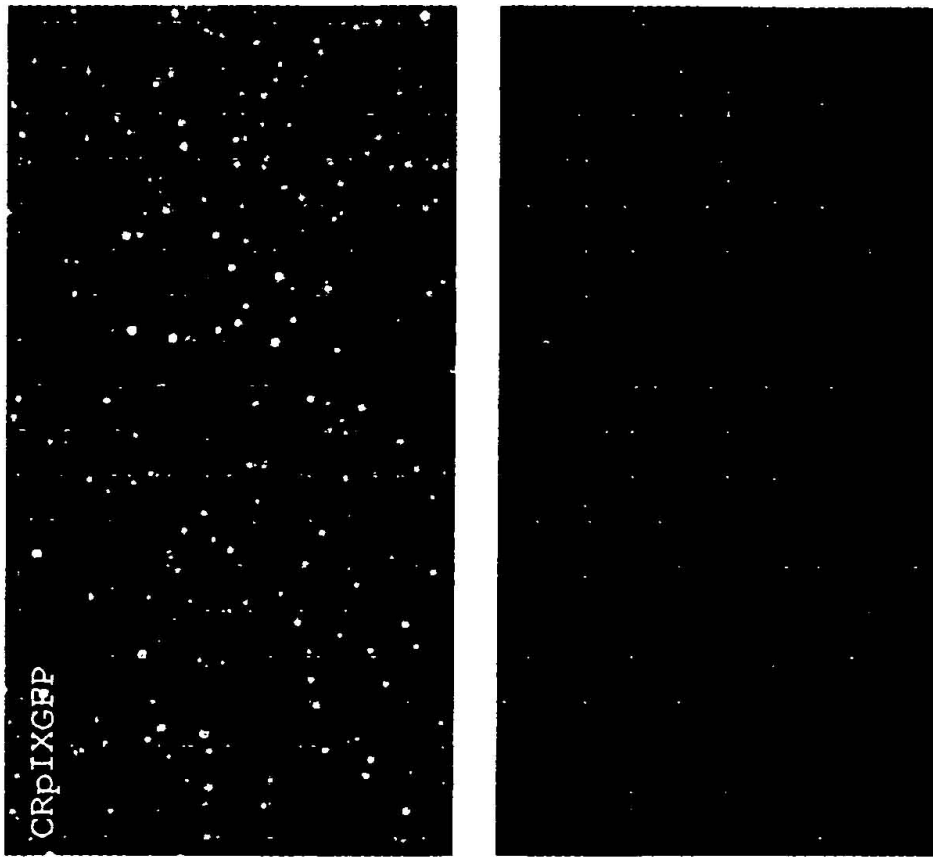


Fig. 15

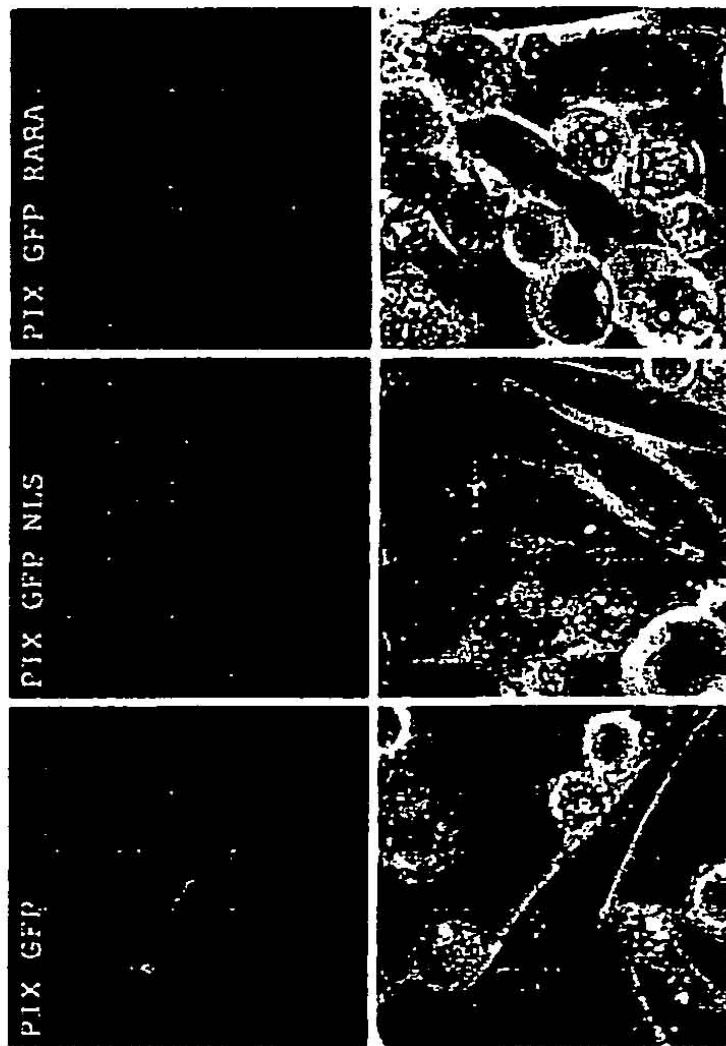


Fig. 16

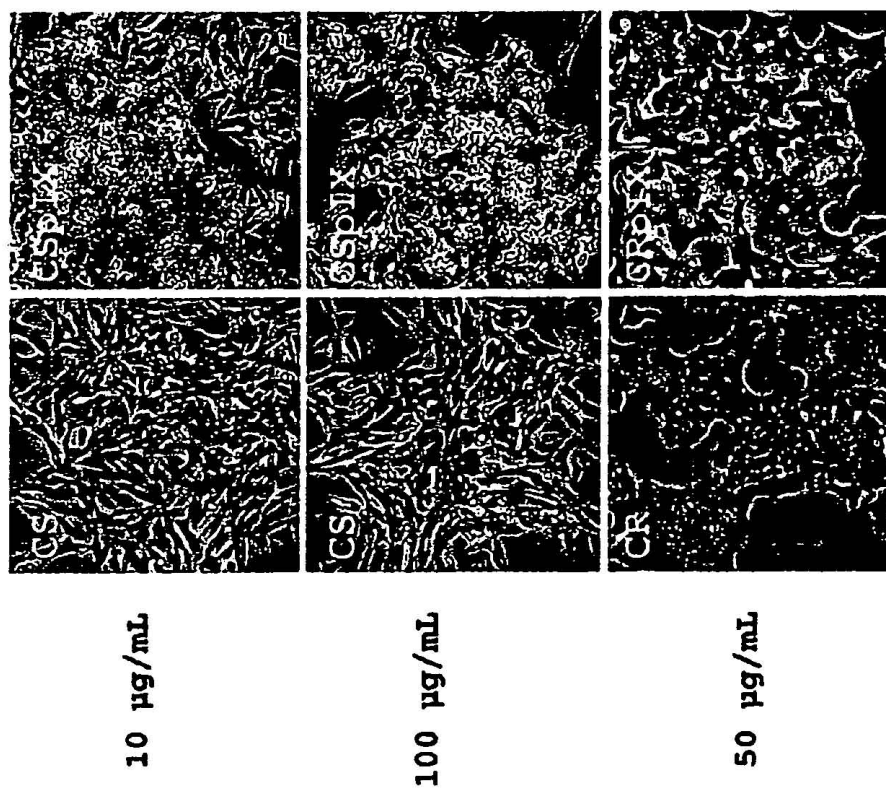


Fig. 17

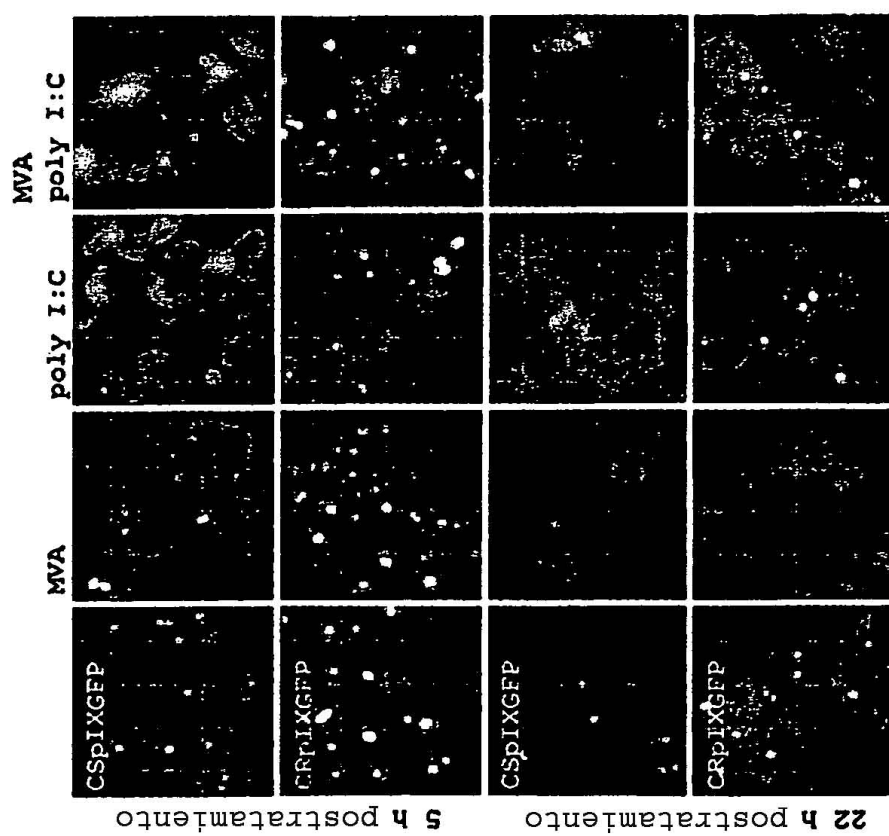


Fig. 18