

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 971**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13817925 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2935568**

54 Título: **Células de mamífero para la propagación de arterivirus**

30 Prioridad:

**21.12.2012 EP 12199169**

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

**26.09.2017**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Wim de Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**GUELEN, LARS y  
SCHRIER, CARLA CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 633 971 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Células de mamífero para la propagación de arterivirus

- 5 La presente invención se refiere a células de mamífero capaces de propagar Arterivirus, a tales células infectadas por Arterivirus, a cultivos celulares que comprenden tales células y a métodos para la propagación de un Arterivirus en tales células.
- 10 La familia *Arterivirus* comprende el *virus de la arteritis equina* (EAV), el *virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino* (PRRSV), el *virus elevador de la lactato deshidrogenasa* (LDV), y el *virus de la fiebre hemorrágica del simio* (SHFV). De estas cuatro especies víricas, LDV y SHFV solo tienen un menor impacto económico, ya que infectan ratones y monos, respectivamente. Contrariamente a esto, EAV y especialmente PRRSV suponen una carga financiera considerable en la sociedad.
- 15 El virus de la arteritis equina provoca infecciones en caballos, y, por tanto, constituye un problema recurrente en la industria de la crianza de caballos. Por lo tanto, supone una carga económica significativa para los criadores de caballos. El virus de la arteritis equina establece una infección persistente en los, así llamados, "portadores sementales", que posteriormente transmiten el virus a las yeguas, lo que podría llevar al aborto de los fetos. Los criadores de caballos controlan cuidadosamente la presencia de EAV, especialmente en los sementales, y se han desarrollado varias vacunas frente al virus basadas en virus vivos atenuados o basadas en la expresión de subunidades estructurales de EAV. Sin embargo, los recientes brotes en Nuevo México, Estados Unidos (2006) y Francia (2007) han aumentado adicionalmente el interés en el EAV y en vacunas frente a EAV entre los veterinarios y los propietarios de caballos.
- 20 El PRRSV es, de lejos, el Arterivirus más importante económicamente, que afecta a las industrias de ganado porcino en todo el mundo. La infección por este virus da como resultado un crecimiento lento, una disminución en la eficiencia de la alimentación, anorexia, y fiebre en cerdos desde el destete hasta la etapa de madurez, abortos en cerdas gestantes y problemas respiratorios en cerdos jóvenes. Solo en los Estados Unidos, las pérdidas anuales asociadas con la infección por PRRSV se estiman en alrededor de 560 millones de dólares en 2005 y 664 millones de dólares en 2011. La infección por PRRSV se coloca en el puesto número uno de desafíos relacionados con la salud para la industria porcina, causando las mayores pérdidas de productividad cuando se comparan con otras enfermedades causadas por, por ejemplo, *Clostridium difficile*, la gripe porcina, *Streptococcus* sp., rotavirus o circovirus porcino. Considerando la aparición de cepas altamente virulentas de PRRSV en el sureste de Asia en 2006 y el hecho de que la industria porcina de Asia es la más grande del mundo, se puede asumir con seguridad que las pérdidas en esta parte del mundo son considerablemente mayores que las documentadas en los Estados Unidos. El PRRSV sigue siendo una principal amenaza para la industria porcina dado que la enfermedad asociada ha resultado ser difícil de controlar, a pesar de la disponibilidad de vacunas tanto de virus vivos atenuados como muertos frente al PRRSV.
- 25 La familia *Arterivirus* consiste en virus de ARN de cadena sencilla y sentido positivo (+) con un tamaño de genoma que oscila de aproximadamente 13 hasta 16 kb. Tras la infección, el ARN se traduce en dos poliproteínas precursoras de replicasa, pp1 y pp1ab. Las proteínas no estructurales funcionales (nsps) de Arterivirus derivan de la escisión de estas poliproteínas mediante su actividad proteasa interna. Tras la liberación de la poliproteína, estas proteínas no estructurales forman en conjunto el complejo de replicación y transcripción que es responsable de la replicación del genoma del virus y para la síntesis de los ARN mensajeros subgenómicos que codifican las proteínas estructurales. Las poliproteínas pp1a y pp1ab del Arterivirus prototipo, EAV, se escinden en al menos 13 proteínas no estructurales mediante tres proteasas internas presentes en la proteína no estructural 1 (nsp1), nsp2 y nsp4. La nsp2 del Arterivirus contiene un dominio proteasa de tipo papaína (PLP) en su región N-terminal. PLP2, como se denomina comúnmente a esta proteasa, es responsable de la unión entre nsp2 y nsp3, y su actividad catalítica es, probablemente por esta razón, esencial para la replicación vírica.
- 30 Para la mayoría de especies víricas sucede que, tras la infección, la presencia de ácidos nucleicos víricos desencadena la activación de cascadas de señalización inmunitaria innata, que da como resultado la activación de factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y Irf3/Irf7, llevando en última instancia a la transcripción de genes que codifican el interferón beta (IFN- $\beta$ ) y otras citocinas proinflamatorias.
- 35 La, así llamada, inmunidad innata proporciona una defensa natural muy útil del hospedador frente a los virus. Sin embargo, esta misma inmunidad innata supone un problema para los productores de vacunas. Normalmente, se producen vacunas de virus completas mediante la propagación del virus (de tipo silvestre o atenuado) *in vitro*, por ejemplo, en cultivo celular, seguido de la recolección de la progenie vírica. Como resultado de la inmunidad innata, la cantidad de virus producida *in vitro* es a menudo bastante baja: la inducción de IFN- $\beta$  lleva a la protección de otras células frente a la invasión (y la posterior replicación) del virus.
- 40 Para varias especies víricas, este problema se puede abordar de manera teórica disminuyendo la cantidad de IFN- $\beta$  producida. Sin embargo, en el caso de los Arterivirus, se considera que esta aproximación no tiene efecto por la siguiente razón: los Arterivirus son conocidos por evadir de manera muy eficaz las respuestas inmunitarias innatas

del hospedador. Estas grandes capacidades moduladoras del sistema inmunitario de los Arterivirus previenen la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz frente a PRRSV de tipo silvestre y frente a PRRSV vivos atenuados. Por tanto, el nivel de inmunidad que se puede inducir es subóptimo para la protección frente a las infecciones del campo.

5 Se conoce la causa de este carácter evasivo del sistema inmunitario de los Arterivirus. Se debe a la proteína nsp2 de los Arterivirus que, junto con su papel en el procesamiento de la poliproteína, juega un importante papel en la evasión de respuestas inmunitarias innatas del hospedador.

10 El análisis comparativo de secuencias mostró que el dominio PLP2 de esta proteína presenta una similitud con proteínas que pertenecen a la clase que contiene el dominio del tumor ovárico (OTU) de las enzimas desubiquitinizantes (DUB) (Makarova (2000)). Se ha confirmado desde entonces que el PLP2 de Arterivirus de hecho posee una verdadera actividad DUB y que esta actividad probablemente se emplea para eliminar la ubiquitina (también denominada adicionalmente como Ub) de los factores de señalización inmunitaria innata para suprimir la inducción de un estado antivírico (Frias-Staheli, N. (2007), Sun, Z. (2010), van Kasteren, P.B. (2012)). Además de su actividad DUB, el PLP2 de Arterivirus también ha demostrado que elimina el gen 15 estimulado por interferón de la proteína antivírica de tipo ubiquitina (ISG15) de las proteínas diana celulares (Frias-Staheli, N. (2007), Sun, Z. (2012), Arguello, M.D. (2007)). Esta actividad se denominará actividad ISGilante. Debido a la estrecha relación de la ubiquitina y ISG15, este papel del dominio PLP2 se denominará de manera general actividad DUB/desISGilante.

20 Es esta actividad DUB/desISGilante la que, mediante la supresión de la inducción de un estado antivírico, permite al virus evitar la defensa primaria del hospedador.

25 Esta característica de los Arterivirus para evadir el sistema inmunitario innato mediante un bloqueo de la inducción de IFN- $\beta$  comprensiblemente tiene una consecuencia *in vitro*: la propagación *in vitro* en células susceptibles tales como las células comercialmente disponibles MA104 y Marc145 usadas a menudo para la propagación de PRRSV, no se espera que esté influenciada por el sistema inmunitario innato: el propio virus ya bloquea la inducción de IFN- $\beta$ .

30 Por lo tanto, en el caso de los Arterivirus, no se esperaba que las medidas para disminuir la cantidad de IFN- $\beta$  producida por tales células con el objetivo de producir más virus *in vitro* tuvieran algún efecto en el título del virus. Tal como se dice anteriormente, los Arterivirus por naturaleza bloquean la producción de IFN- $\beta$  en la célula hospedadora *in vitro*, análogo a la situación del crecimiento *in vivo* en un hospedador.

35 Sorprendentemente, se descubrió, sin embargo, que un bloqueo deliberado de producción de IFN- $\beta$  en células, adicional al efecto bloqueante del propio Arterivirus, dio como resultado un aumento muy significativo de la cantidad de progenie de Arterivirus propagada en esas células. Incluso se obtiene con frecuencia un aumento del título del virus de un factor de hasta 6-7. Por razones explicadas anteriormente, esto es, de hecho, inesperado, dado el conocido bloqueo de Arterivirus de la producción de IFN- $\beta$ .

40 Por lo tanto, una primera realización de la presente invención se refiere a una célula de mamífero capaz de propagar PRRSV, dicha célula de mamífero se selecciona del grupo de células de mamífero que consisten en células MA104 y Marc145, caracterizado porque dicha célula es deficiente en su producción de IFN- $\beta$  por comprender un fragmento de ADN que codifica un ARNs bajo el control de un promotor adecuado, que es capaz de silenciar el gen que codifica IFN- $\beta$ . La propagación de un virus en una célula es el proceso que comprende la replicación de un virus en esa célula, como resultado de la misma, emerge una progenie vírica. Una célula de mamífero capaz de propagar un 45 Arterivirus, por lo tanto, es una célula capaz de producir una progenie vírica de dicho Arterivirus.

50 Para los fines de la presente invención, una célula de mamífero de acuerdo con la invención que es deficiente en su producción de IFN- $\beta$  es una célula de mamífero que tras la estimulación de la ruta de IFN- $\beta$  presenta un aumento en IFN- $\beta$  a un nivel que es la mitad o menos de la mitad de la cantidad de IFN- $\beta$  producida mediante una forma de tipo silvestre de esa célula de mamífero en las mismas condiciones de estimulación. Preferentemente, una célula de mamífero de acuerdo con la invención presenta un aumento en IFN- $\beta$  que está por debajo del 40 %, más preferentemente por debajo del 30 %, por debajo del 20 %, por debajo del 10 % o incluso por debajo del 5 %, en ese orden de preferencia, de la cantidad de IFN- $\beta$  presentada por una forma de tipo silvestre de esa célula de mamífero en las mismas condiciones de estimulación. El nivel de IFN- $\beta$  se puede determinar por medio de un ELISA.

55 En la sección de Ejemplos, se da una descripción de una reacción de ELISA que se puede usar para determinar el nivel de aumento de proteína IFN- $\beta$  tras la estimulación de la ruta de IFN- $\beta$ . En los ejemplos, se proporciona un método para determinar y comparar el nivel de IFN- $\beta$  en células de tipo silvestre y células de acuerdo con la invención.

60 El ensayo, tal como se describe, usa anticuerpos disponibles comercialmente para la determinación de la cantidad de IFN- $\beta$  producida por las células. Huelga decir que un ensayo usando otro anticuerpo reactivo con IFN- $\beta$  se puede usar igualmente.

65 En una célula de mamífero de acuerdo con la invención, se logra el efecto inesperado bloqueando la traducción del ARNm de IFN- $\beta$  a proteína IFN- $\beta$  introduciendo ARNs de anti-IFN- $\beta$  en la célula hospedadora. Esta aproximación se

basa en el efecto silenciador de genes de los ARNsi de doble cadena (ARN cortos interferentes/inhibidores en cualquier forma, por ejemplo, en la forma de horquillas cortas) en la expresión génica. El principio y el mecanismo detrás de este denominado ARN de interferencia, designado abreviadamente ARNi, y detrás del ARNsi ha sido el objeto de varias publicaciones durante la última década. El uso principal del ARNi aún es, y ha sido, el silenciamiento específico de genes del hospedador o de las células del hospedador en estudio con el fin de determinar su papel en el hospedador. Las revisiones sobre este tema se han escrito por Hannon, G.J. en *Nature* 418: 244-251 (2002) y por Deni, A.M. y Hannon, G.J. en *TRENDS in Biochemical Sciences* 28: 196-201 (2003). Otros artículos, que describen el uso de ARNsi en el silenciamiento de genes son los de Bertrand, J.R. et al., en *B.B.R.C.* 296: 1000-1004 (2002) y los de Sorensen, D.R. et al., en *J. Mol. Biol.* 327: 761-766(2003). Se publicó una revisión extensa sobre ARNsi por Dorsett, Y. y Tuschl, T. en *Nature Reviews, Drug Discovery* 3: 318-329 (2004).

Con el fin de obtener un emparejamiento óptimo de pares de bases entre el ARNsi y el ARNm de IFN- $\beta$  de las células diana, en este caso, de las células Marc 145, los inventores han realizado, en primer lugar, un alineamiento de las secuencias de los dos genes de IFN- $\beta$  de primate actualmente disponibles en bancos de genes. En una etapa posterior, se suministraron cebadores de (RT)-PCR en la base de regiones altamente conservadas en estos genes de IFN- $\beta$  de primates. Estos cebadores de PCR se usaron para producir ADN de IFN- $\beta$  de ARNm de IFN- $\beta$  de células Marc145. El ADN de IFN- $\beta$  específico de Marc145 obtenido de este modo se secuenció y se usó la información de secuencia para desarrollar los ARNsi usados para el silenciamiento de genes. Siguiendo esta estrategia, se podría averiguar que los ARNsi presentan una unión óptima al ARNm diana de IFN- $\beta$ . (Véase la sección de Ejemplos para detalles).

Para el experimento del silenciamiento de genes, las células de mamífero capaces de propagar Arterivirus, en este caso, células Marc145, se cultivaron y transfectaron con el ARNsi de anti-IFN- $\beta$  de Marc145 añadiendo ARN Poli(I:C) como estimulador de IFN- $\beta$ . Aproximadamente 5-6 horas tras la transfección con ARNsi, se infectaron las células con PRRSV. (Véase la sección de Ejemplos para detalles). Como puede observarse a partir de la figura 7, se podría obtener fácilmente un aumento en el título de aproximadamente 6-7 veces.

El proceso de transfección descrito es muy adecuado para lograr el efecto inesperado de disminución de la cantidad de IFN- $\beta$  en un cultivo *in vitro* a pequeña escala. Sin embargo, como un proceso para disminuir la cantidad de IFN- $\beta$  en un cultivo *in vitro* a gran escala para una producción de virus a gran escala, no es particularmente adecuado. Con el fin de obtener una disminución de la cantidad de IFN- $\beta$  en células en un cultivo *in vitro* para una producción de virus a gran escala, el experto en la materia puede, sin embargo, elegir entre varias opciones, todas conocidas en la materia.

Una opción es la introducción en la célula de un plásmido que lleva un fragmento corto de ADN que codifica ARNsi de anti-IFN- $\beta$  bajo el control de un promotor de mamífero. Esto evita la necesidad de transfectar células cada vez que se inicia un cultivo *in vitro* de virus.

Tal plásmido puede ser un plásmido que sigue presente en el citoplasma de la célula y produce de manera constitutiva una cierta cantidad de ARNsi. Preferentemente, el plásmido se integra en el genoma de la célula. Tales plásmidos son bien conocidos en la materia. Las células que llevan tales plásmidos son deficientes en su producción de IFN- $\beta$ , pero no requieren el cultivo bajo presión selectiva, como sería el caso si el plásmido no estuviese integrado en el genoma.

Es igualmente posible obtener células que son deficientes en su producción de IFN- $\beta$ , desarrollando un ARNsi capaz de silenciar uno de los otros genes que están implicados en la ruta de IFN- $\beta$ .

La ruta del interferón es conocida por ser una cascada de eventos que se desencadena por la entrada de (en este caso) un virus de ARN de cadena sencilla en la célula. El virus entra en un endosoma de la célula mediante endocitosis, en donde activa el receptor TLR7 de tipo Toll. El TLR7 activado recluta el adaptador MyD88 que a su vez recluta IRAK-4 y IRAK-1. Este complejo actúa como un armazón para componentes que desencadenan, entre otros, la ruta Irf3/Irf7. Esto lleva, en última instancia, a la transcripción de genes que codifican IFN- $\beta$ . La cascada completa es bien conocida desde hace ya varios años, y se conocen las proteínas implicadas. Las revisiones extensas de la ruta de IFN- $\beta$  son, por ejemplo, las escritas por Taro Kawai y Shizuo Akira en *Nature Immunology* 7: 131-137 (2006), por Akinori Takaoka y Hideyuki Yanai en *Cellular Microbiology* 8: 907-922 (2006), por Osamu Takeuchi y Shizuo Akira en *Immunological Reviews* 220: 214-224 (2007), y más extensivamente por Randall, R.E. y Goodbourn, S., en *Journal of General Virology* 89: 11-47 (2008).

Una vez que se ha formado una cantidad de IFN- $\beta$ , se excreta por la célula. La IFN- $\beta$  excretada se une posteriormente al receptor de IFN- $\alpha/\beta$  que protruye de la membrana celular. Esta unión induce un aumento adicional en la producción de IFN- $\beta$  y también induce IFN- $\alpha$ , tanto en las células que originariamente produjeron IFN- $\beta$  (por ejemplo, como resultado de la infección vírica) y en las células adyacentes.

Por este motivo, se considera que el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  es una parte de la ruta del interferón- $\beta$ . Una función adicional del receptor de IFN- $\alpha/\beta$  es la inducción de la, así llamada, ruta JAK/STAT que finalmente interfiere con la formación de la progenie vírica. Dado que el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  es parte de la ruta del interferón- $\beta$ , el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  es una diana igualmente adecuada para la determinación de ARNsi. La regulación negativa del receptor se describe, entre otros, por Kai-xin Zhang et al., en *International Journal of Cancer* 127: 830-838 (2010). La

información básica del receptor de IFN- $\alpha/\beta$  se puede hallar, entre otros en los artículos de revisiones de Plataniias, L.C. (Nature Reviews Immunology 5: 375-386 (2005), de Randall, R.E. y Goodbourn, S. (*vide supra*) y de Akinori Takaoka y Hideyuki Yanai (*vide supra*). En el presente documento también se desvela una célula de mamífero caracterizada porque dicha célula comprende un fragmento de ADN que codifica un ARNsi bajo el control de un promotor adecuado, que es capaz de silenciar uno de los genes de la ruta de IFN- $\beta$ .

Una manera igual de atractiva de obtener una célula de mamífero que es deficiente en su producción de IFN- $\beta$  es introducir una mutación en un gen que está implicado en la ruta IFN- $\beta$ . Tal mutación puede ser una inserción, una delección o una mutación por sustitución, siempre que, por supuesto, la mutación lleve a una célula que es deficiente en su producción de IFN- $\beta$ , tal como se define anteriormente. La manera más eficiente es no hacer solo una mutación en tal gen, sino simplemente eliminar uno de los genes implicados en la ruta de IFN- $\beta$ .

Si los genes mencionados anteriormente se seleccionan para su silenciamiento y/o mutación, se debe tener cuidado para evitar que una subruta alternativa de la cascada tome el control de la subruta bloqueada. Simplemente como ejemplo; si se mutase IRF7, preferentemente uno o más genes del NF- $\kappa$ B también deberían mutarse. (Para una visión conjunta de las rutas, véase, entre otros, Randall, R.E. y Goodbourn, S., en Journal of General Virology 89: 11-47 (2008) tal como se menciona anteriormente)

Por supuesto, un gen muy atractivo y, por tanto, preferido para la mutación es el gen que codifica el propio IFN- $\beta$ . Esto se puede hacer, entre otros, mediante la mutación del gen como tal, pero también se puede acompañar, por ejemplo, de la mutación del promotor de IFN- $\beta$  o de elementos de la región promotora tales como PRD IV, PRD I/III o PRD II. También se desvela en el presente documento una célula de mamífero caracterizada porque dicha célula tiene una mutación en un gen de la ruta de IFN- $\beta$ . Los genes de la ruta de IFN- $\beta$  que son adecuados como dianas de silenciamiento de genes y como dianas de mutación son, entre otros, los genes que codifican IFN- $\beta$ , el receptor de IFN- $\alpha/\beta$ , MyD88, IRAK-4, IRAK-1, TRAF3, el gen que codifica la subunidad IKK- $\alpha$  y el gen que codifica IRF7. También se desvela una célula de mamífero tal como se describe en el presente documento caracterizada porque dicho gen se selecciona del grupo de genes que consiste en los genes que codifican IFN- $\beta$ , el receptor de IFN- $\alpha/\beta$ , MyD88, IRAK-4, IRAK-1, TRAF3, el gen que codifica la subunidad IKK- $\alpha$  y el gen que codifica IRF7.

El experto en la materia que desee mutar cualquiera de los genes mencionados anteriormente tiene varias herramientas poderosas disponibles para mutar genes específicos tales como, por ejemplo, las nucleasas con dedos de zinc (ZNF) y las nucleasas de tipo activadores de transcripción (TALEN).

Estas herramientas son las herramientas de elección para la mutación específica de cualquier gen. Básicamente, ambas herramientas se basan en el hecho de que comprenden una DNAsa FokI dimerizada, capaz de crear roturas de doble cadena en cualquier parte del ADN, y dos dominios de unión a ADN altamente específicos y diseñados por el investigador. Tanto las TALEN como las ZFN permiten un direccionamiento de genes altamente específico y una mutación de genes.

Estas herramientas y sus usos se han descrito de manera extensiva para la mutación de genes en, entre otros, células, células pluripotenciales y embriones. A continuación se dan algunos ejemplos de publicaciones: DeFrancesco, L. en Nature Biotechnology 29, 681-684 (2011), Cost, G. et al., en Nature Biotechnology 29, 695-696 (2011), Yeh, J-R. et al., en Nature Biotechnology 29, 697-698 (2011), Zhang, B. et al., Nature Biotechnology 29, 699-700 (2011), Jaenisch, R. et al., en Nature Biotechnology 29, 731-734 (2011), Miller, J. et al., en Nature Biotechnology 29, 143-148 (2011) y Zhang, F. et al., en Nature Biotechnology 29, 149-153 (2011). Una revisión de la ZFN por Hauschild-Quintern, J et al., está disponible en formato electrónico de Cellular and Molecular Life Sciences, Springer Basel 2012 10.1007/s00018-012-1204-1.

Las células en las que uno o más genes específicos se mutan usando una de estas dos técnicas también están en la actualidad disponibles comercialmente bajo demanda.

Por lo tanto, el experto en la materia que quiera evitar el esfuerzo de mutar un gen de la ruta de INF- $\beta$ , puede, por ejemplo, pedir células en las que se ha mutado el gen deseado usando TALEN bajo demanda de Collectis bioresearch, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia o de Collectis bioresearch Inc., One Broadway, Cambridge, MA 02142, EE.UU.).

Las células en las que el gen deseado se ha mutado, por ejemplo, usando las ZFN, están comercialmente disponibles bajo demanda de Sigma-Aldrich Corporation, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU.

Las estrategias descritas anteriormente son todas igualmente aplicables para aumentar el rendimiento del Arterivirus equino (EAV) en el cultivo celular. Este virus normalmente se cultiva en células renales de cría de hámster (BHK21) y en células renales de conejo (RK13). La secuencia del ARNm del IFN- $\beta$  de células RK13 se da por el NCBI con el número XM\_002707968.1 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\\_002707968.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002707968.1)). Por lo tanto, se puede diseñar directamente, por ejemplo, un ARNsi para el silenciamiento de genes en células RK13 en la base de esta secuencia. Igualmente, los dominios de unión a ADN altamente específicos y diseñados por el investigador para su uso en TALEN o ZFN se pueden diseñar directamente en la base de esta secuencia.

Por lo tanto, en el presente documento se describe adicionalmente una célula de mamífero que es capaz de propagar PRRSV o EAV. La célula de mamífero se puede seleccionar del grupo de células de mamífero que consiste en BHK21, RK13, MA104 o Marc145.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para la propagación de PRRSV en cultivo celular,

en donde dicho método comprende la etapa de propagar dicho virus en células de mamífero de acuerdo con la invención. Adicionalmente se desvela una célula de mamífero tal como se describe en el presente documento caracterizada porque dicha célula de mamífero se infecta con un Arterivirus. Otra realización más de la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende células de mamífero de acuerdo con la invención.

5 Una forma preferida de esa realización se refiere a un cultivo celular que comprende células de mamífero de acuerdo con la invención, caracterizado porque dichas células de mamífero están infectadas por PRRSV.

**Leyenda de las figuras:**

- 10 Figura 1: Alineamiento de secuencias de interferón-β de *Macaca mulatta* y *Homo sapiens*.  
 Figura 2: Expresión de IFN-β tras la transfección con poli(I:C) a T=24 horas tras la transfección. Los carriles 2, 3, 7 y 8 presentan células no transfectadas, los carriles 4, 5, 9 y 10 muestran el efecto de la inducción de poli(I:C), los carriles 6 y 11 son controles negativos.  
 15 Figura 3: Expresión sostenida de ARNm de IFN-β tras la transfección con poli(I:C). El + y el - indican el tratamiento de las células, tal como se usa para la figura 2.  
 Figura 4: ELISA de IFN-β. La Figura 4A muestra una curva patrón para el ELISA de IFN-β, y la figura 4B muestra los niveles reales de proteína IFN-β medidos en el medio en varios momentos en el tiempo.  
 20 Figura 5: Actividad de atenuación génica de ARNm de IFN-β. El + y el - indican el tratamiento de las células, tal como se usa para la figura 2.  
 Figura 6: Actividad de atenuación génica de la expresión de proteína IFN-β. La Figura 6A muestra una curva patrón para el ELISA de IFN-β, y la figura 6B muestra los niveles reales de proteína IFN-β medidos en el medio en varios momentos en el tiempo.  
 25 Figura 7: Titulación de PRRSV.

**Ejemplos**

Ejemplo 1.

30 Desarrollo de una RT-PCR de IFN-β y derivación de ARNsi.

Los cebadores de PCR se diseñaron para permitir la amplificación específica de una sección del ARNm de IFN-β de células MARC-145. Se generó un alineamiento de NM\_002176.2 (ARNm de interferón beta 1 de *Homo sapiens*) y NM\_001135795.1 (ARNm de interferón beta 1 de *Macaca mulatta*). Los cebadores se diseñaron para ser complementarios a áreas conservadas de la secuencia de ARNm de IFN-β (figura 1, tabla 1). Las PCR se realizaron usando métodos convencionales. Como un control para el procedimiento de RT-PCR, se incluyó siempre una PCR para GADPH en los experimentos. Las secuencias del cebador de GADPH se muestran en la tabla 1. La temperatura de alineamiento usada para ambos conjuntos de cebadores fue 55 °C.

40 Las muestras de PCR se dejaron correr en geles de agarosa. Los productos de PCR se extrajeron de la agarosa, se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se secuenciaron. los ARNsi diseñados por Stealth™ (Invitrogen) se obtuvieron al alimentar la secuencia de nucleótidos de ARNm de IFN-β de MARC-145 obtenida en el diseñador de ARNi BLACK-iT™ (Life Technologies) (tabla 2). Se usaron ARNsi de control negativo (medio con contenido de GC, Life Technologies) en todos los experimentos con ARNsi.

Tabla 1: Secuencias de IFN-β y de cebador GADPH

Cebador	Especificidad del gen	Tamaño del producto esperado (pb)	Secuencia de oligonucleótidos (5'→3')
IFNB1 F1	Interferón beta 1	562	ATGACCAACAAGTGTCTCCTC
IFNB1 R1			AGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG
GAPDH FW	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	452	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH REV			TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Tabla 2: mezcla de ARNsi de anti-IFN-β de Marc145.

ARNsi	Proporción	Secuencias de oligonucleótidos (5'→3')
Stealth 74	33 %	CCUGUGGCAAUUGAAUGGAAGUCUU (sentido) AAGACUUCCAUUCAAUUGCCACAGG (antisentido)
Stealth 239	33 %	UAGCACUGGCUGGAAUGAGACUAAU (sentido) AAUAGUCUCAUUCAGCCAGUGCUA (antisentido)

Stealth 358	33 %	AAUUCAUGAGCAGUCUGCACCUGAA (sentido) UUCAGGUGCAGACUGCUCAUGAAUU (antisentido)
-------------	------	-----------------------------------------------------------------------------------

Inducción y detección de la expresión de IFN-β en células MARC-145

5 Las células MARC-145 se propagaron en medio 6/medio de cultivo B8 modificado, suplementado con FCS al 5 %, a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

10 Para inducir una respuesta de interferón, se transfectaron células MARC-145 con poli(I:C). Las células se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos y se transfectaron al 90-95 % de confluencia con 1,25 - 2,5 µg de poli(I:C) y 5,0 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Tras la transfección, se lavaron las células con PBS y se lisaron en 360 µl de tampón RLT (Mini kit RNeasy, Qiagen), se suplementaron con β-mercaptoetanol al 1 %. Los lisados celulares se recogieron y se homogeneizaron mediante 5 pasos a través de una aguja de calibre 21. El ARN se aisló usando el Mini kit RNeasy (Qiagen ), incluyendo la digestión de DNasa en columna, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se eluyó en 50 µl de H<sub>2</sub>O. El ARN eluido se incubó durante 10 minutos a 65 °C y al menos 2 minutos en hielo. La reacción de RT se realizó con 29 µl de una solución de ARN, usando las perlas Ready-To-Go You-Prime (GE Healthcare) y 200 ng de cebadores aleatorizados (Invitrogen), en un volumen total de 33 µl. Las mezclas de reacción se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente, seguido de 1 hora a 37 °C. Finalmente, se realizaron las PCR de IFN-β y GADPH (tal como se describe anteriormente) y las muestras de PCR se dejaron correr en geles de agarosa.

20 Además, se recogió el medio de cultivo celular tras la transfección, y se determinó la cantidad de IFN-β usando el kit ELISA de suero de IFN-β humano VeriKine-HS (PBL InterferonSource), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Confirmación de la actividad de ARNsi

30 La actividad de los ARNsi de anti-IFN-β se confirmó mediante cotransfecciones de células MARC-145 al 30-50 % de confluencia con 1,25 µg de poli(I:C) en combinación con 100 pmol de mezcla de ARNsi de anti-IFN-β de Marc145 (o 100 pmol de medio con contenido de GC y ARNsi de control negativo), usando 5,0 µl de Lipofectamina 2000, seguido de RT-PCR y ELISA (tal como se describe anteriormente).

Bloqueo de la expresión de IFN-β y titulación del virus PRRSV

35 Un día después de la transfección con ARNsi, se cultivaron las células a una densidad de 1 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 6 pocillos. Justo antes de la transfección, se lavaron las células una vez con PBS 0,01 M. Bien 100 pmol de ARNsi de control negativo (medio con contenido de GC, Life Technologies) o 100 pmol de mezcla de ARNsi de anti-IFN-β de Marc145 (tabla 1) se transfectaron en las células usando 2,5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) por pocillo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se incubaron durante 4 o 5 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % antes de ser infectadas con PRRSV a una MOI de 0,1 en 1,0 ml de medio de cultivo por pocillo. Tras 1 hora de incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se retiró el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con PBS 0,01M y se puso medio de cultivo reciente en las células, seguido de una incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % hasta la recolecta del medio (hasta 72 horas tras la infección). La cantidad de IFN-β en el medio se determinó usando el kit ELISA de suero de IFN-β humano VeriKine-HS (PBL InterferonSource), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 La titulación de PRRSV se realizó preparando soluciones seriadas diez veces de muestras del medio en placas de microtitulación de 96 pocillos que contienen monocapas de células MARC-145. Tras siete días de incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se exploraron los pocillos para la presencia de CPE. El título del virus se calculó de acuerdo con el método Spearman-Kärber y se expresó en log<sub>10</sub> de TCID<sub>50</sub> por ml.

50 Resultados

Expresión de IFN-β en células MARC-145

55 Para investigar si las células MARC-145 son capaces de expresar IFN-β, las células se transfectaron con poli(I:C). Las células y el medio de cultivo se cultivaron en varios puntos temporales tras la transfección. La expresión de ARNm de IFN-β se determinó mediante RT-PCR (figura 2 y 3) y el nivel de proteína IFN-β expresada en las muestras del medio se cuantificó usando ELISA, en la base de una curva patrón (figura 4a y b).

60 Tal como se muestra en la figura 2, la transfección de MARC-145 con poli(I:C) da como resultado una clara inducción de la expresión de ARNm de IFN-β. La Figura 3 muestra que la inducción de la expresión de ARNm de IFN-β es sostenida durante al menos 30 horas.

El medio de células transfectadas contiene altos niveles de proteína IFN-β. Similar al ARNm del IFN-β, la elevada expresión de proteína IFN-β se puede detectar durante al menos 30 horas (figura 4b).

Actividad de ARNsi anti-IFN-β en células MARC-145

5 La actividad de los ARNsi de anti-IFN-β se confirmó mediante transfecciones de células MARC-145 con combinaciones de poli(I:C) y mezcla de ARNsi anti-IFN-β de Marc 145 o medio con contenido de GC y ARNsi de control negativo. La expresión de ARNm de IFN-β y proteína se determinaron mediante RT-PCR y ELISA, respectivamente. La transfección de células con la mezcla de ARNsi de anti-IFN-β de Marc145 claramente resulta en la actividad de atenuación génica de ARNm de IFN-β. (figura 5) y de la expresión de proteína (figura 6). El ELISA de IFN-β demuestra que la transfección de células tanto con poli(I:C) como con la mezcla de ARNsi de anti-IFN-β de Marc145 suprime de manera virtual y completamente la inducción de expresión de proteína IFN-β. La estimulación de la expresión de proteína IFN-β como un resultado de la transfección de poli(I:C), pero también la supresión de este efecto mediante la transfección con ARNsi de anti-IFN-β de Marc145, se mantiene durante al menos 72 horas (figura 6).

Replicación de PRRSV mejorada tras la actividad de atenuación génica de IFN-β en células MARC-145

20 El efecto de la atenuación de actividad génica de IFN-β en la replicación de PRRSV se investigó transfectando células MARC-145 con ARNsi de anti-IFN-β de Marc145 o medio con contenido de GC y ARNsi de control negativo, seguido por la infección de estas células con PRRSV. El medio de cultivo celular se cultivó en varios puntos temporales tras la transfección. El nivel de replicación vírica se determinó mediante titulación. Tal como se muestra en la Figura 7 y en la Tabla 3, la replicación de PRRSV es más eficiente en células en las que la expresión de IFN-β se suprime usando ARNsi. La diferencia en el aumento del título, cuando el título del virus crece en células transfectadas con ARNsi de anti-IFN-β se compara con los ARNsi de control negativo, es de hasta 0,7 Log<sub>10</sub> (tabla 3).

Tabla 3: Titulación de PRRSV

<i>T (horas)</i>	<i>Título (Log 10)</i>		
	Sin transfectar	ARNsi control	ARNsi de anti-IFN-β
24	4,15	4,25	4,15
48	5,65	5,45	6,15
72	5,75	5,75	6,35
Aumento de título	1,6	1,5	2,2

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Intervet International B.V.  
 <120> Células de mamífero para la propagación de virus  
 35 <130> 23420  
 <160> 12  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 40 <210> 1  
 <211> 840  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 1

ES 2 633 971 T3

60 acattctaac tgcaaccttt cgaagccttt gctctggcac aacaggtagt aggcgacact  
120 gttcgtggtg tcaacatgac caacaagtgt ctctccaaa ttgctctcct gttgtgcttc  
180 tccactacag ctctttccat gagctacaac ttgcttggat tcctacaaag aagcagcaat  
240 tttcagtgtc agaagctcct gtggcaattg aatgggaggc ttgaatactg cctcaaggac  
300 aggatgaact ttgacatccc tgaggagatt aagcagctgc agcagttcca gaaggaggac  
360 gccgcattga ccatctatga gatgctccag aacatctttg ctattttcag acaagattca  
420 tctagcactg gctggaatga gactattggt gagaacctcc tggctaattg ctatcatcag  
480 ataaaccatc tgaagacagt cctggaagaa aaactggaga aagaagattt caccagggga  
540 aaactcatga gcagtctgca cctgaaaaga tattatggga ggattctgca ttacctgaag  
600 gcccaaggagt acagtcactg tgcctggacc atagtcagag tggaaatcct aaggaacttt  
660 tacttcatta acagacttac aggttacctc cgaaactgaa gatctcctag cctgtgcctc  
720 tgggactgga caattgcttc aagcattctt caaccagcag atgctgttta agtgactgat  
780 ggctaattgta ctgcatatga aaggacacta gaagattttg aaatttttat taaattatga  
840 gttattttta tttatttaaa ttttattttg gaaaataaat tatttttggg gcaaaagtca

<210> 2  
<211> 564  
<212> ADN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 2

5

ES 2 633 971 T3

60 atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacggctctt  
120 tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcagttttca gtgtcagaag  
180 ctctgtggc aattgaatgg aaggcttgaa tactgcctca aggacaggat gaactttgac  
240 atccctgagg aaattaagca gccgcagcag ttccagaagg aggacgctgc attgaccatc  
300 tatgagatgc tccagaacat cttcgtctatt ttcagacaag atttatctag cactggctgg  
360 aatgagacta ttgtggagaa cttccttgct aatgtctatc atcagataga ccatctgaag  
420 acaatcctag aagaaaaact ggagaaagaa gatttcacca ggggaaaatt catgagcagt  
480 ttgcacctga aaagatacta tggaaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt  
540 cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctcagga actttttctt cattaacaaa  
564 cttacaggtt acctccgaaa ctga

5 <210> 3  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Macaca mulatta  
<400> 3

10 21 atgaccaaca agtgtctcct c

15 <210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Macaca mulatta  
<400> 4

20 22 agtttcggag gtaacctgta ag

25 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Macaca mulatta  
<400> 5

ES 2 633 971 T3

20 accacagtcc atgcatcac

5 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 6

10 20 tccaccaccc tgttgctgta

15 <210> 7  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 7

20 25 ccuguggcaa uugaauggaa gucuu

25 <210> 8  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 8

30 25 aauagucuca uuccagccag ugcua

35 <210> 9  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 9

40 25 uagcacuggc uggaugaga cuauu

45 <210> 10  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta  
  
<400> 10

50 25 aauucaugag cagucugcac cugaa

<210> 11  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta

ES 2 633 971 T3

<400> 11

25 uucaggugca gacugcucau gaauu

5 <210> 12  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> Macaca mulatta

10 <400> 12

25 aagacuucca uucaauugcc acagg

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Célula de mamífero capaz de propagar el *virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino* (PRRSV), dicha célula de mamífero se selecciona del grupo de células de mamífero que consisten en células MA104 y Marc145, **caracterizada porque** dicha célula es deficiente en su producción de IFN- $\beta$  por comprender un fragmento de ADN que codifica un ARNsi bajo el control de un promotor adecuado, que es capaz de silenciar el gen que codifica IFN- $\beta$ .
2. Un cultivo celular que comprende células de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** dichas células de mamífero están infectadas con PRRSV.
- 15 4. Método para la propagación de PRRSV en cultivo celular, **caracterizado porque** dicho método comprende la etapa de propagar dicho virus en células de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1.



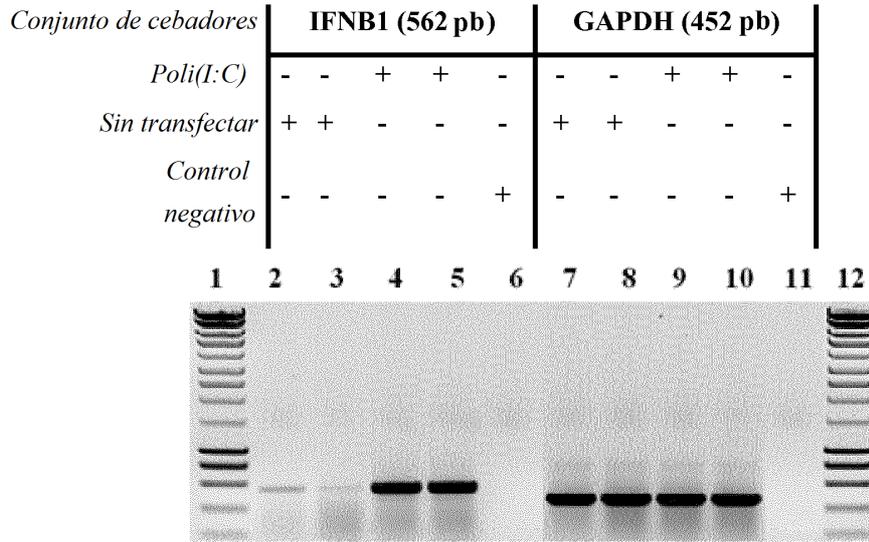


Figura 2.

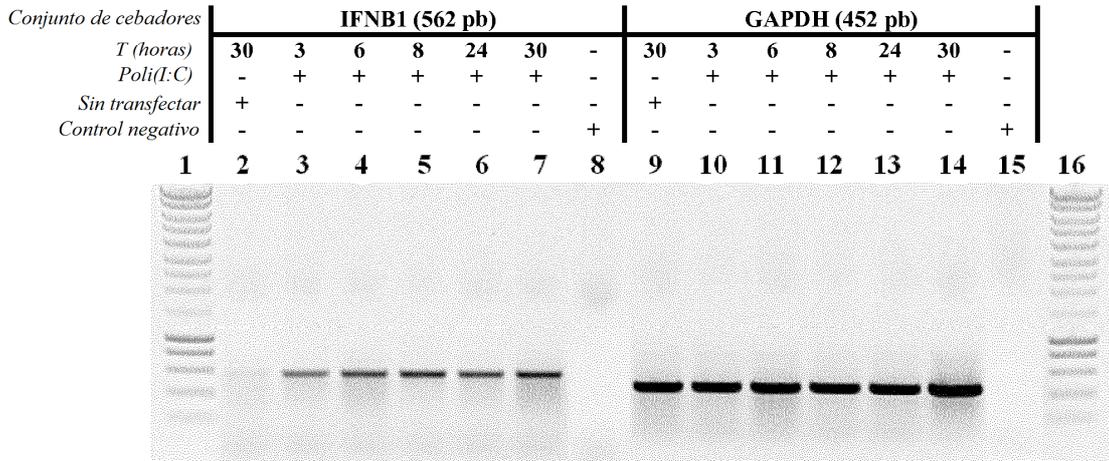
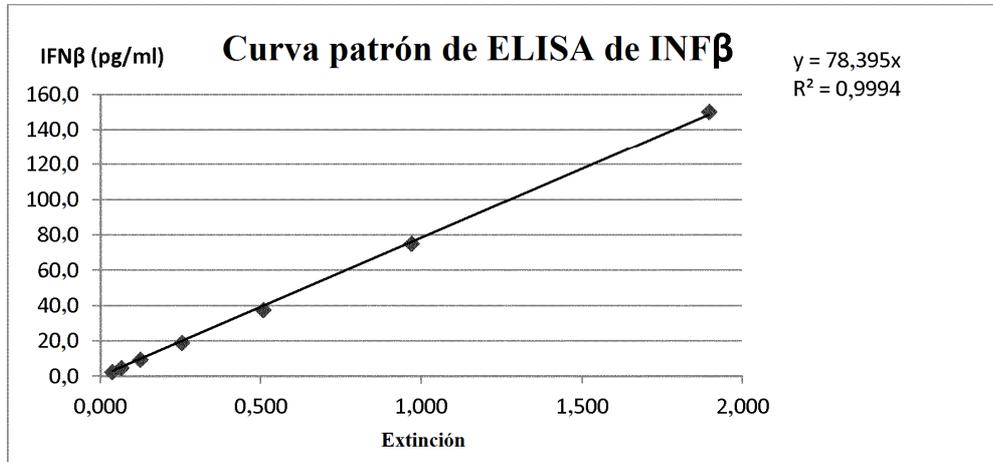


Figura 3.

**A**



**B**

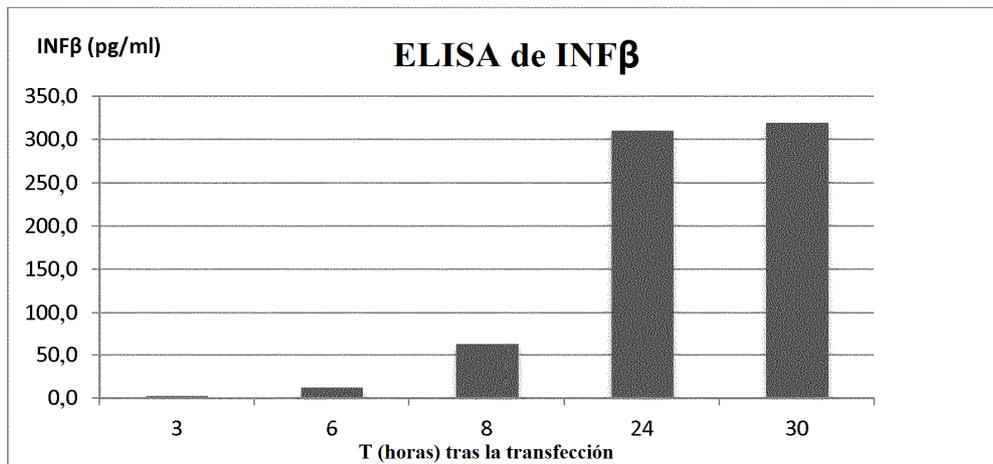


Figura 4.

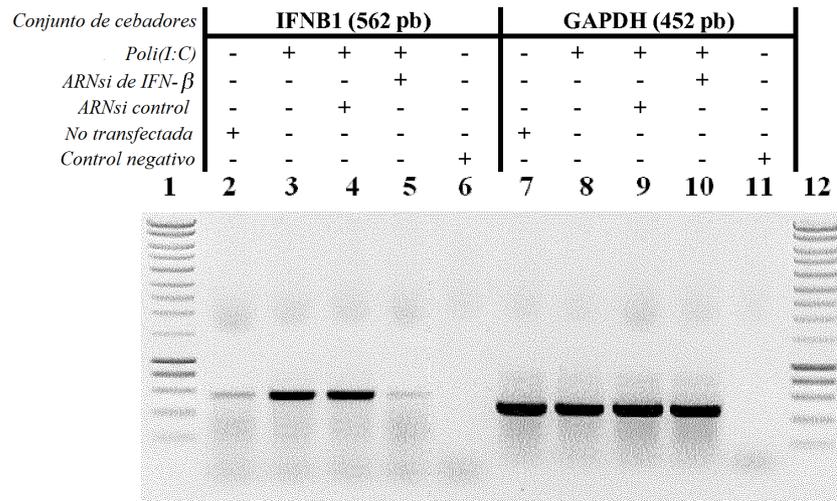
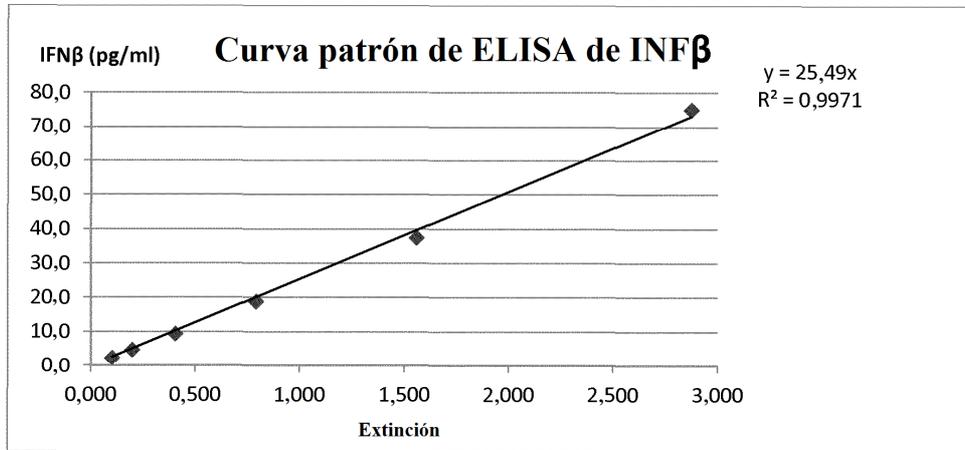


Figura 5.

**A**



**B**

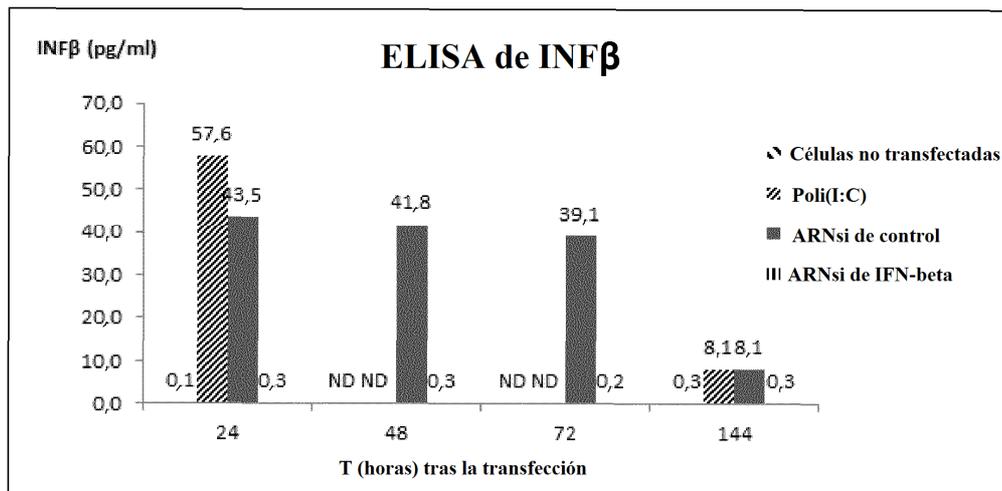


Figura 6.

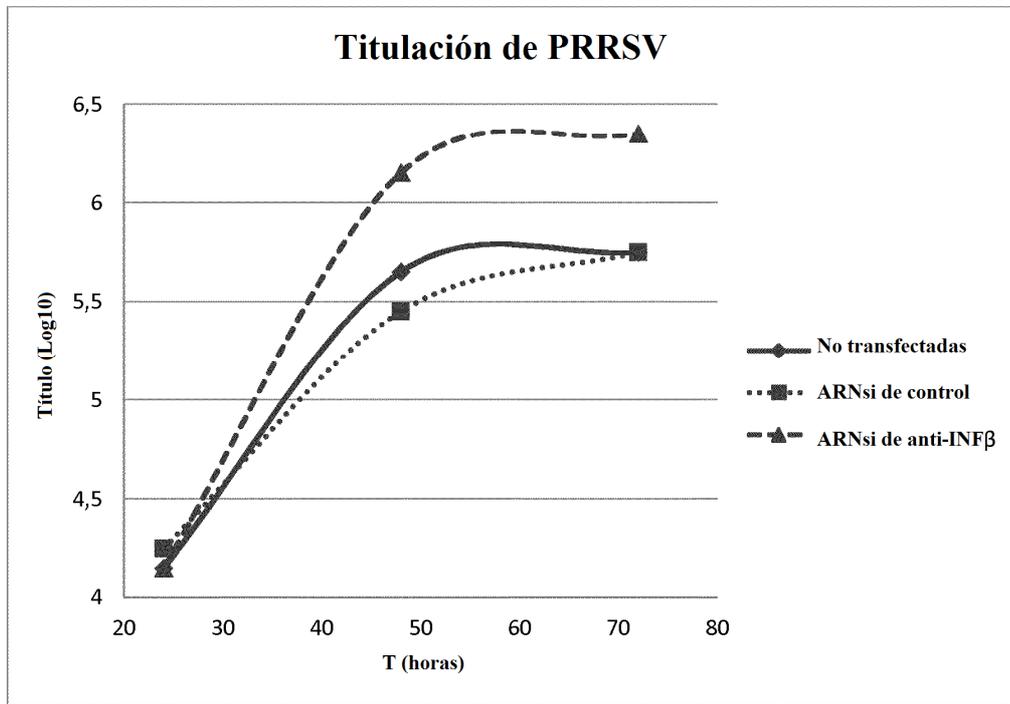


Figura 7.