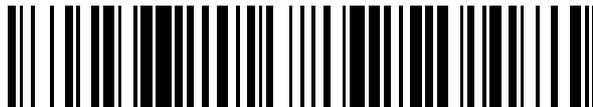


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 034**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/AU2014/050330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15061858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14858802 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 3063278**

54 Título: **Preparación de vector vírico**

30 Prioridad:

01.11.2013 AU 2013904242

07.02.2014 AU 2014900370

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

29.05.2018

73 Titular/es:

SEMENTIS LIMITED (100.0%)

9 Sing Crescent

Berwick, Victoria 3806, AU

72 Inventor/es:

HOWLEY, PAUL MICHAEL y

LIU, LIANG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 034 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

Preparación de vector vírico

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud se encuentra asociada y reivindica la prioridad con respecto a la solicitud de patente australiana nº 2013904242, presentada el 1 de noviembre de 2013 y la solicitud de patente australiana nº 2014900370, presentada el 7 de febrero de 2014.

10

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15

La presente invención se refiere al desarrollo de células y líneas celulares adecuadas para propagar y, por lo tanto, preparar medicamentos basados en poxvirus. En particular, la memoria se refiere a sustratos celulares modificados recombinantes para propagar dichos poxvirus para la preparación de agentes terapéuticos o profilácticos.

ANTECEDENTES

20

Se listan al final de la memoria, los datos bibliográficos de las referencias en la presente memoria.

25

La familia de los poxvirus comprende dos subfamilias: *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*. La familia *Chordopoxvirinae* comprende ocho géneros, incluyendo las *Orthopoxviridae* que comprende especies que infectan el ser humano (por ejemplo, el virus variola, el agente causativo de la viruela, el virus de la viruela bovina (que formaba la vacuna original de la viruela, informada por Jennes en 1796), el virus Vaccinia (utilizado como vacuna de la viruela de segunda generación) y el virus de la viruela del mono, y los virus *Avipoxviridae*, que comprende especies que infectan las aves, tales como los virus de la viruela aviar y de la viruela del canario. Además de su utilización como antígenos en vacunas de la viruela, existe gran interés en la utilización de virus basados en Vaccinia recombinantes y en virus de la viruela aviar como vectores 'esqueléticos'. Como vectores intracitoplasmáticos, los *Orthopoxviridae* son capaces, entre otros, de transportar antígenos foráneos hasta el citoplasma del huésped y rutas de procesamiento de antígenos que procesan los antígenos en péptidos para la presentación sobre la superficie celular. Dichos vectores que expresan antígenos foráneos se utilizan en el desarrollo de vacunas para enfermedades tales como el SIDA, la tuberculosis, el paludismo y el cáncer, que han demostrado ser difíciles de tratar con otras estrategias de vacunación.

30

35

Los *Chordopoxvirinae* presentan genomas de ADN de doble cadena lineal de tamaños comprendidos entre 130 kb los parapoxvirus y más de 300 kb los virus de la viruela aviar, y su ciclo vital en el huésped transcurre por completo en el citoplasma de la célula huésped. Los poxvirus operan de manera sustancialmente independiente de su célula huésped y moléculas de la célula huésped, especialmente en los procesos que implica la síntesis inicial del ARNm. Sin embargo, las moléculas del huésped aparentemente son utilizadas para el inicio o la terminación de la transcripción vírica intermedia y tardía. Los poxvirus producen "factores de espectro de huéspedes" estructuralmente diversos que reconocen y manipulan específicamente las rutas de señalización del huésped, produciendo condiciones celulares que permiten la replicación vírica. La mayoría de poxvirus pueden unirse e infectar células de mamífero pero si la posterior infección es permisiva (capaz de producir viriones infecciosos) o no permisiva (sustancialmente incapaz de producir viriones infecciosos) depende del poxvirus específico y del tipo celular específico implicado. Actualmente se dispone de un conocimiento escaso al nivel molecular de las interacciones entre poxvirus y huésped, en particular de los genes de espectro de huéspedes y qué factores resultan necesarios para modular la relación para facilitar la propagación tanto vírica como celular. Para una revisión de los genes de espectro de huéspedes, ver Werden et al., 2008, incorporada en la presente memoria en su totalidad.

40

45

50

Se han publicado observaciones sobre las cepas de Vaccinia relevantes a su utilización en vacunas de la viruela y posteriormente como vectores víricos, desde principios de los años sesenta hasta la actualidad. Determinadas cepas de Vaccinia, incluyendo las cepas utilizadas como vacunas de la viruela, son capaces de propagarse en las células humanas y, por lo tanto, representan un riesgo para la salud, tal como el desarrollo de encefalitis vírica. Con vistas a desarrollar una vacuna más segura, se ha subcultivado una cepa de Vaccinia de Ankara (denominada "CVA", por sus siglas en inglés) más de 500 veces en células no humanas. Durante dicho procedimiento, el genoma de Vaccinia cambia sustancialmente, implicando el desarrollo de por lo menos seis deleciones mayores en comparación con el genoma original del CVA. El virus modificado era menos patogénico en el ser humano pero todavía era capaz de producir una respuesta inmunológica protectora. Dicho virus Vaccinia atenuado se denomina MVA (Vaccinia Ankara modificado, por sus siglas en inglés) y también se clasifica según el número de pases, ya que se ha encontrado que los virus con diferente número de pases son genéticamente y fenotípicamente diferentes. Sin embargo, alcanzado el número de pase 515, se consideró que MVA515 era genéticamente estable. A principios de los años noventa se observó que las cepas de MVA, tales como MVA572, y su derivado, MVA F6, eran capaces de expresar proteínas de Vaccinia y proteínas heterólogas (recombinantes) a nivel elevado en células no permisiva (en las que el virus no se propaga), permitiendo el desarrollo de MVA como vector para moléculas heterólogas de interés, tales como las codificantes de antígenos para vacunas o la administración de terapia.

55

60

65

Más recientemente, se han realizado intentos de producir un virus Vaccinia modificado con las cualidades de MVA mediante la introducción de seis delecciones grandes conocidas de MVA en el CVA. Resulta interesante que ello no resultó en virus con cualidades atenuadas del MVA. Se ha propuesto que la ausencia de genes de espectro de huéspedes podría ser responsable de la atenuación observada; sin embargo, esta hipótesis no ha sido contrastada empíricamente (ver, por ejemplo, Meyer et al., Journal of General Virology 72:1031-1038, 1991).

Los poxvirus constituyen una gran familia de virus caracterizada por un genoma de ADNdc lineal de gran tamaño, un sitio citoplasmático de propagación y una morfología compleja del virión. El virus Vaccinia es el virus representativo de este grupo de virus y el más estudiado en cuanto a morfogénesis del virus. Los viriones del virus Vaccinia presentan una apariencia de partículas unidas a membrana con 'forma de ladrillo' u 'ovoides', con una compleja estructura interna que muestra un núcleo bicóncavo circundado de paredes y flanqueado por 'cuerpos laterales'. La ruta de ensamblaje del virión implica la fabricación de precursores que contienen membranas que se desarrollan en viriones inmaduros (VI) y después se desarrollan formando viriones maduros (VM). Se encuentran contenidos más de 70 productos génicos específicos dentro del virión del virus Vaccinia, de los que se describen a continuación los efectos de mutaciones en más de 50 genes específicos sobre el ensamblaje del virus Vaccinia.

El virus Vaccinia entra en las células mediante la fusión de sus membranas superficiales con la membrana plasmática de la célula huésped, liberando el núcleo (y cuerpos laterales) al citoplasma y activando el programa transcripcional del virus. Los núcleos del virión contienen el complemento completo de enzimas codificados por el virus necesario para la síntesis y modificación del ARNm temprano. Los genes tempranos codifican enzimas necesarios para la propagación del ADN y, de esta manera, al alcanzar su máximo la expresión de los genes tempranos, resulta la propagación del ADN vírico en sitios citoplasmáticos denominados "fábricas". Los genes tempranos codifican además factores de transcripción intermedios y los genes intermedios, a su vez, codifican factores de transcripción tardíos, de manera que los genes intermedios y tardíos se expresan en sucesión después del inicio previo requerido de la propagación del ADN vírico. De esta manera, el complemento completo de genes víricos se transcribe en una cascada temporal, diferenciándose las clases temprana, intermedia y tardía por los promotores transcripcionales específicos de clase y los factores de transcripción codificados víricamente. Además, sólo los genomas propagados son moldes competentes para la transcripción intermedia y tardía. Estas dos clases de genes juntos codifican proteínas estructurales del virión, enzimas del virión y factores de ensamblaje y resultan necesarios para el ensamblaje de nuevas partículas de progenie vírica.

Poco después de la incorporación vírica y la expresión temprana, se forman dominios citoplasmáticos específicos de la infección dentro de la célula que son de densidad uniforme y en ocasiones se encuentran circundados por cisternas derivadas de retículo endoplasmático (RE) que se incrementan en tamaño con el tiempo. Dichos dominios representan sitios de propagación del ADN vírico y con frecuencia se denominan "fábricas víricas".

El ensamblaje vírico se inicia con la formación de estructuras rígidas en forma de media luna (cúpulas, en las tres dimensiones) dentro de las fábricas víricas. En micrografías electrónicas de alta resolución, la capa externa de dichas estructuras con forma de media luna está compuesta de proyecciones regularmente espaciadas denominadas "espículas". Las medias lunas aparentemente crecen en longitud, manteniendo simultáneamente la misma curvatura hasta convertirse en círculos cerrados (esferas, en las tres dimensiones) denominados viriones inmaduros (VI). Los VI se encuentran llenos de material de "viroplasma" que es de densidad uniforme aunque discerniblemente más electrón-densos que la fábrica circundante. A medida que se forman los VI, también tiene lugar la incorporación del ADN encapsidado: se observan en las micrografías electrónicas como subdominios electrodensos redondos u ovoides dentro de los VI denominados "nucleoides". Los VI que contienen nucleoides de ADN condensado con frecuencia se denominan "VIN". La maduración de los precursores de varias proteínas del virión mediante corte proteolítico resulta necesaria para la morfogénesis del VIN en viriones maduros (VM). La mayoría de los viriones maduros se encuentra fuera de las fábricas y puede existir en grupos en la periferia de una fábrica o aparentemente separados por una distancia significativa a la fábrica más próxima.

Los viriones de poxvirus existen en tres formas infecciosas: los viriones maduros (VM), los viriones envueltos (VEn) y los viriones extracelulares (VE). Los MV, la forma más simple del virus, son partículas con membranas que contienen un núcleo bicóncavo que contiene ADN flanqueado por cuerpos laterales, que llenan las concavidades del núcleo. Los MV normalmente se encuentran exclusivamente en el interior de las células y son liberados únicamente mediante la lisis celular. Los VEn consisten en VM que se encuentran circundados por dos bicapas lipídicas adicionales derivadas de cisternas trans del Golgi. Los Ven, las membranas externas de los cuales contienen proteínas víricas características, son precursores de los VE y también se observan dentro de la célula. Los VE consisten en VEn que han sido exocitados mediante fusión de la membrana del VEn más externa con la membrana plasmática, dejando un VEn envuelto en una membrana adicional. Una fracción de los VE se encuentra unido a la superficie celular, mientras que algunos se observan libres en el medio extracelular. Se cree que los VE resultan importantes para la extensión del virus dentro de un organismo.

La eliminación de genes esenciales de los virus y la complementación en células huésped es conocida de la técnica como una estrategia propuesta general para la generación de vectores víricos seguros y eficaces para el tratamiento y la terapia. Existe una necesidad de vectores ortopox atenuados mejorados con una seguridad, expresión y/o

inmunogenicidad mejoradas y una necesidad correspondiente de métodos de propagación y preparación de dichos vectores ortopox de manera segura y económica.

Se utilizan varias líneas celulares de mamífero para la preparación de proteínas recombinantes con fines de investigación. Entre ellas se incluyen líneas celulares de conejo, hámster, primate y humanas, tales como, aunque sin limitación y tal como son conocidas de la técnica, las células HEK293, 293T, 143B, CHO, HeLa, Vero y BHK, HepG2, y las células 3T3. Especialmente, sin embargo, se ha llevado a cabo la fabricación según buenas prácticas de fabricación (BPF) de la mayoría de proteínas terapéuticas recombinantes en células CHO, convirtiendo a esta línea celular en la línea celular mejor estudiada y aprobada para la terapéutica en el ser humano. Las células CHO pueden crecer a densidades muy elevadas en cultivos en suspensión y los procesos posteriores para purificar productos se encuentran muy bien desarrollados. Resulta relevante que ni Vaccinia, tal como Vaccinia-COP o Vaccinia-VEn ni sus derivados, tales como MVA y NYVAC, se propagan en células CHO.

La expresión de los genes de espectro de huéspedes víricos desde dentro del poxvirus bajo el control de promotores víricos locales y la ARN polimerasa poxvírica es conocida de la técnica.

La expresión de determinados genes de espectro de huéspedes víricos del genoma de una célula de mamífero de manera puntual para rescatar o permitir la replicación vírica y permitir la supervivencia de la célula huésped no ha sido descrita anteriormente.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

La presente memoria describe células de mamífero en cultivo in vitro transformadas para expresar un factor de espectro de huéspedes poxvírico y un método para propagar vectores víricos, que comprende el cultivo de dichas células.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero modificada en la que se modifica el genoma de la célula para que comprenda una secuencia codificante de CP77 bajo el control de un promotor de manera que la línea celular modificada proporciona soporte a la propagación de un poxvirus que es menos capaz o es incapaz de propagarse en la célula no modificada.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para propagar un ortopoxvirus que no se propaga en células CHO, comprendiendo el procedimiento propagar el poxvirus in vitro en una línea celular de mamífero, en la que la línea celular es modificada para codificar y expresar CP77 bajo el control de un promotor.

En diversas realizaciones alternativas, las células modificadas son modificadas adicionalmente para comprender una secuencia codificante de D13L bajo el control de un promotor y/o para comprender una secuencia codificante de K1L bajo el control de un promotor.

En la presente memoria la referencia a "CP77", "K1L" y "D13L" incluye ortólogos funcionales y variantes funcionales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

La presente invención no se encuentra limitada a procedimientos o agentes particulares, formulaciones específicas de agentes y diversas metodologías médicas, ya que ellas pueden variar. La terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención.

Cualesquiera materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden utilizarse para la práctica o ensayo de la presente invención. Los profesionales se refieren en particular a: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Press, Plainville, N.Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento nº 47), John Wiley & Sons, New York, 1999; Murphy et al., Virus Taxonomy Springer Verlag:79-87, 1995; Mahy Brian W.J. y Kangro O. Hillar (eds): Virology Methods Manual, Academic Press, 1996 y Davison A.J. y Elliott R.M. (eds.): Molecular Virology, A practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1993; Perkus et al., Virology 179(1):276-86, 1990 o definiciones y términos de la técnica y otros métodos conocidos por el experto en la materia.

Aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención se definen a continuación los términos siguientes.

En la totalidad de la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos "comprende" y "comprendiendo" se entenderá que implican la inclusión de una etapa, elemento o grupo de etapas o elementos indicado pero no la exclusión de cualquier otra etapa, elemento o grupo de etapas o elementos. De esta manera, la

utilización del término "comprendiendo" y similar indica que los elementos listados resultan necesarios u obligatorios pero que otros elementos son opcionales y pueden encontrarse presentes o no. En el contexto de los vectores ortopox atenuados, se modifican los vectores de la invención para atenuarlos mediante delección de un gen esencial de maduración o ensamblaje; sin embargo, se encuentran comprendidas las modificaciones adicionales, tales como para actuar como vector para un antígeno u otra proteína.

La expresión "que consiste en" pretende incluir, y se encuentra limitada a, lo que siga a la expresión "que consiste en". De esta manera, la expresión "que consiste en" indica que los elementos listados resultan necesarios u obligatorios y que no puede encontrarse presente ningún otro elemento. La expresión "que consiste esencialmente en" pretende incluir cualesquiera elementos listados después de la expresión y limitada a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la exposición de los elementos listados. De esta manera, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos listados resultan necesarios u obligatorios pero que otros elementos son opcionales y pueden encontrarse presentes o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos listados.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una célula individual, así como a dos o más células; la referencia a "un organismo" incluye un organismo, así como dos o más organismos, etc. En algunas realizaciones, "un" se refiere a "uno o más de uno".

Tal como se utiliza en la presente memoria, "y/o" se refiere y comprende todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los ítems listados asociados, así como la falta de combinaciones en el caso de que se interprete como alternativa (conjunción 'o').

El término "atenuación" o "atenuado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una reducción de la virulencia del vector vírico. La virulencia se define como la capacidad de un virus de provocar una enfermedad en un huésped particular. Un vector poxvírico que es incapaz de producir virus infecciosos puede infectar inicialmente las células pero es incapaz de replicarse sustancialmente por completo o de propagarse dentro del huésped o de causar una condición. Lo anterior resulta deseable ya que el vector transporta su proteína o ácido nucleico hasta el citoplasma de la célula huésped pero no daña al sujeto.

La expresión "elemento de control" o "secuencia de control" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un poxvirus, vector, plásmido o célula particular. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para las células eucarióticas se incluyen secuencias de control transcripcional, tales como promotores, señales de poliadenilación, intensificadores de la transcripción, secuencias de control traduccional, tales como intensificadores de la traducción y sitios internos de unión ribosómica (IRES), secuencias de ácidos nucleicos que modulan la estabilidad del ARNm, así como secuencias directoras que dirigen un producto codificado por un polinucleótido transcrito a un compartimiento intracelular dentro de una célula o al medio extracelular.

En donde se proporcionan secuencias, se encuentran comprendidas las secuencias correspondientes. Las expresiones "corresponde a", "correspondiente" o "correspondiente a" se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos que muestra una identidad de secuencia sustancial respecto a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia (por ejemplo una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o incluso hasta 100% respecto a la totalidad o una parte de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia) o una secuencia de aminoácidos que muestra una similitud o identidad de secuencia sustancial respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una similitud o identidad de secuencia de por lo menos 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o incluso de hasta 100% respecto a la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos de referencia).

La expresión "cantidad eficaz", en el contexto del tratamiento o prevención de una condición o para modular una respuesta inmunológica a un antígeno u organismo diana, se refiere a la administración de una cantidad de un agente (por ejemplo, un vector ortopox atenuado tal como se indica en la presente memoria) o composición que lo comprende en un individuo que requiere dicho tratamiento o profilaxis, en una dosis individual o como parte de una serie, que resulta eficaz para la prevención de la aparición de un síntoma, el control de dichos síntomas y/o el tratamiento de los síntomas existentes de dicha condición o para la modulación de la respuesta inmunológica contra el antígeno u organismo diana. La cantidad eficaz variará dependiendo de la salud y condición física del individuo que debe tratarse, del grupo taxonómico del individuo que debe tratarse, de la formulación de la composición, de la evaluación de la situación médica y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encontrará comprendida en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "codifica", "codificante" y similares se refieren a la capacidad de un ácido nucleico de proporcionar otro ácido nucleico o un polipéptido. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ácidos nucleicos "codifica" un polipéptido en el caso de que pueda ser transcrita y/o traducida para

producir el polipéptido o en el caso de que pueda ser procesada en una forma que pueda ser transcrita y/o traducida para producir el polipéptido. Dicha secuencia de ácidos nucleicos puede incluir una secuencia codificante o tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante. De esta manera, los términos "codifica", "codificante" y similares incluyen un producto de ARN que resulta de la transcripción de una molécula de ADN, una proteína resultante de la traducción de una molécula de ARN, una proteína resultante de la transcripción de una molécula de ADN para formar un producto de ARN y la posterior traducción del producto de ARN, o una proteína que resulta de la transcripción de una molécula de ADN para proporcionar un producto de ARN, el procesamiento del producto de ARN para proporcionar un producto de ARN procesado (por ejemplo, ARNm) y la posterior traducción del producto de ARN procesado.

El término "endógeno" se refiere a un gen o secuencia o segmento de ácidos nucleicos que se encuentra normalmente en un organismo huésped.

Los términos "expresable", "expresado" y variaciones de los mismos se refieren a la capacidad de una célula de transcribir una secuencia de nucleótidos en ARN y opcionalmente de traducir el ARNm para sintetizar un péptido o polipéptido que proporciona una función biológica o bioquímica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de ser utilizada para producir ARNm opcionalmente con la adición de elementos para asistir en dicho procedimiento. Los genes pueden ofrecer la posibilidad de ser utilizados o no para producir una proteína funcional. Los genes pueden incluir tanto regiones codificantes como no codificantes (por ejemplo, intrones, elementos reguladores, promotores, intensificadores, secuencias de terminación y regiones 5' y 3' no traducidas).

Las expresiones "secuencia heteróloga de ácidos nucleicos", "secuencia heteróloga de nucleótidos", "polinucleótido heterólogo", "polinucleótido foráneo", "polinucleótido exógeno" y similares se utilizan intercambiamente para referirse a cualquier ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que comprende un IRES) que se introduce en el genoma de un organismo mediante manipulaciones experimentales y puede incluir secuencias génicas observadas en dicho organismo con la condición de que el gen introducido contenga alguna modificación (por ejemplo una mutación puntual, delección, sustitución o adición de por lo menos un nucleótido, la presencia de un sitio de corte de endonucleasa, la presencia de un sitio loxP, etc.) respecto a la secuencia genómica vírica antes de la modificación.

Las expresiones "polipéptido heterólogo", "polipéptido foráneo" y "polipéptido exógeno" se utilizan intercambiamente para referirse a cualquier péptido o polipéptido que se encuentra codificado por una "secuencia heteróloga de ácidos nucleicos", "secuencia heteróloga de nucleótidos", "polinucleótido heterólogo", "polinucleótido foráneo" y "polinucleótido exógeno", tal como se ha definido anteriormente.

La expresión "células de mamífero" se refiere a una célula en la que puede introducirse un vector que incluye el vector ortopox atenuado con el fin de propagar el vector poxvirus. En una realización, la célula es una línea celular continua. Es menos imperativo que la célula modificada sea una línea celular capaz de dividirse continuamente. Puede modificarse una célula de mamífero o eucariótica superior según la presente invención y posteriormente transformarla o immortalizarla para convertirla en una línea celular en división continua. Sin embargo, la célula antes de la modificación convenientemente es una línea celular continua conocida de la técnica bien caracterizada, en división continua y compatible con la biotecnología. Dichas células se encuentran convenientemente disponibles de organizaciones de depósito, tales como la American Type Culture Collection (ATCC) o la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Entre las líneas celulares de mamífero adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, RK18, BHK, VERO, HBOC-143B, HaCat, HepG2, HeLa, HT1080, HEK-293, RD, COS-7, CHO, Jurkat, HUT, SUPT, C8166, MOLT4/clone8, MT-2, MT-4, H9, PM1, CEM, las células de mieloma (por ejemplo las células SB20) y CEMX174 se encuentran disponibles de, por ejemplo, la ATCC.

Puede utilizarse cualquier método de ingeniería del genoma reconocida de la técnica para producir líneas celulares modificadas que expresan genes heterólogos. Se hace referencia a la utilización de tecnología de transposones para insertar genes en el genoma celular mediante la utilización de vectores piggyBac. Sin embargo, muchos métodos están reconocidos para la introducción de genes en células, incluyendo, aunque sin limitación, la transducción de retrovirus (por ejemplo MoMLV, etc.), la transducción de lentivirus, la transfección e integración de plásmido, otros sistemas víricos para la transducción de líneas celulares, tales como los adenovirus, VAA (virus adenoasociado), el VEB y las técnicas de edición del genoma para la inserción específica de sitio mediante recombinación homóloga con ADN lineal, meganucleasas manipuladas, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TAL-nucleasa), las nucleasa de dedo de cinc (ZFN) y CRISPR.

En una realización, la célula de mamífero es una célula CHO. Las líneas de células CHO de la técnica anterior, que no codifican genes del huésped vírico, no permiten la preparación de Vaccinia o derivados de Vaccinia sustancialmente incapaces de propagarse en el ser humano. Tal como es conocido del experto en la materia, las células de ovario de hámster chino (CHO) derivadas del ovario del hámster *Cricetulus griseus*, son las células de

mamífero más comúnmente utilizadas para la producción bioindustrial y GMP de terapéuticos proteicos recombinantes, incluyendo anticuerpos. La popularidad de las células CHO para este propósito se basa, en parte, en su rápido crecimiento y elevada producción de proteínas. En consecuencia, las líneas de células CHO han sido bien caracterizadas. Entre las líneas de células CHO adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, las líneas A2, A2H, XrS6, CHO-K1, CHO/dhfr, RR-CHO-K1, UT-I, P22, CHO-1C6, Lec1, Lec2, Lec8, Pro-5 y CDKXB1. La línea celular CHO-K1 depositada en la ATCC con el número de acceso ATCC CLL-61 o ATCC CRL-9618 se utiliza con frecuencia. La línea celular CHO-K1 se derivó como subclón de la línea celular parental CHO iniciada a partir de una biopsia de un ovario de un hámster chino adulto por Puck T. (1957). La presente memoria describe células modificadas diferentes de las células CHO modificadas.

En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula humana, una célula de primate, una célula de hámster o una célula de conejo.

Las células pueden ser unicelulares o pueden cultivarse en cultivo de tejidos en forma de cultivos líquidos, monocapas o similares. Las células huésped también pueden derivarse directa o indirectamente a partir de tejidos o pueden existir dentro de un organismo, incluyendo animales.

Se entiende que "inducir" una respuesta inmunológica tal como se contempla en la presente memoria incluye producir o estimular una respuesta inmunológica y/o potenciar una respuesta inmunológica preexistente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sitio interno de entrada ribosómica" o "IRES", por sus siglas en inglés, se refiere a una secuencia de nucleótidos vírica, celular o sintética (por ejemplo recombinante) que permite el inicio de la traducción de un ARNm en un sitio interno a una región codificante dentro del mismo ARNm o en un sitio en el lado 3' del extremo 5' del ARNm, con el fin de proporcionar la traducción de una región codificante operablemente ligada situada cadena abajo (es decir, en el lado 3' de) el sitio interno de entrada ribosómica. Lo anterior provoca que la traducción sea independiente de la estructura de la caperuza 5' e independiente del extremo 5' del ARNm. Una secuencia de IRES proporciona las secuencias de acción en cis necesarias que se requieren para el inicio de la traducción de una región codificante operablemente ligada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" pretende describir una célula, un compuesto de interés (por ejemplo un poxvirus recombinante, una molécula de ácido nucleico, tal como un genoma, un polipéptido, etc.) que se encuentra en un medio diferente al medio en que se encuentra naturalmente el compuesto. El término "aislado" pretende incluir compuestos que se encuentran dentro de muestras que se encuentran sustancialmente enriquecidas en el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés se encuentra parcial o sustancialmente purificado.

La expresión "operablemente conectado" u "operablemente ligado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes indicados de esta manera se encuentran en una relación que las permite funcionar de su manera deseada. Por ejemplo, una secuencia de control transcripcional "operablemente ligada" a una secuencia codificante se refiere a la posición y/o orientación de la secuencia de control transcripcional respecto a la secuencia codificante para permitir la expresión de la secuencia codificante bajo condiciones compatibles con la secuencia de control transcripcional. En otro ejemplo, un IRES conectado operablemente a una secuencia codificante de virus ortopox se refiere a la posición y/o orientación del IRES respecto a la secuencia codificante del virus ortopox para permitir la traducción independiente de caperuza de la secuencia codificante del virus ortopox.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "marco de lectura abierta" y "ORF" (por sus siglas en inglés) se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a la secuencia de aminoácidos codificada entre los codones de inicio y terminación de traducción de una secuencia codificante. Las expresiones "codón de inicio" (por ejemplo ATG) y "codón de terminación" (por ejemplo TGA, TAA o TAG) se refieren a una unidad de tres nucleótidos contiguos ('codón') en una secuencia codificante que especifica el inicio y terminación de cadena, respectivamente, de síntesis de la proteína (traducción del ARNm).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "virus parental" se entiende que es una referencia a un virus que se modifica para incorporar una secuencia heteróloga de ácidos nucleicos para formar un virus recombinante de la presente invención.

Las expresiones "polinucleótido", "secuencia polinucleótida", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. Las expresiones típicamente se refieren a una forma polimérica de los nucleótidos de por lo menos 10 bases de longitud, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena sencilla o de doble cadena de ARN o ADN.

Las expresiones "polipéptido", "péptido", "proteína" y "molécula proteica" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a moléculas que comprenden o consisten en un polímero de residuos aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. De esta manera, dichas expresiones se aplican a polímeros de

aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son aminoácidos no naturales sintéticos, tales como un análogo químico de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recombinante" tal como se aplica a "moléculas de ácidos nucleicos", "polinucleótidos" y similares se entiende que se refiere a estructuras artificiales de ácidos nucleicos (es decir, ADNc o ARN no replicante, o replicones, ADNc o ARN autorreplicante) que pueden transcribirse y/o traducirse en células huésped o en sistemas libres de células indicados en la presente memoria. Las moléculas de ácidos nucleicos o polinucleótidos recombinantes pueden insertarse en un vector. Pueden utilizarse vectores no víricos, tales como los vectores plásmido de expresión, o vectores víricos. El tipo de vectores y la técnica de inserción del constructo de ácidos nucleicos según la presente invención son conocidos por el experto. Una molécula de ácidos nucleicos o polinucleótido según la invención no se observa en la naturaleza en la organización descrita por la presente invención. En otras palabras, una secuencia heteróloga de nucleótidos no se encuentra naturalmente combinada con elementos de un genoma de virus parental (por ejemplo, un promotor, ORF, señal de poliadenilación o ribozima).

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "virus recombinante" se entenderá que hace referencia a un "virus parental" que comprende por lo menos una secuencia heteróloga de ácidos nucleicos.

20 La expresión "identidad de secuencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la medida en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido dentro de una ventana de comparación. De esta manera, se calcula un "porcentaje de identidad de secuencia" mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas dentro de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se observa la base ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G o I) o el residuo aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Para los fines de la presente invención, la expresión "identidad de secuencia" se entiende que se refiere al "porcentaje de correspondencia", calculado por el programa informático DNASIS (versión 2.5 para Windows, disponible de Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) utilizando los valores por defecto tal como se utilizan en el manual de referencia que acompaña al software.

35 La expresión "secuencia de señal" o "péptido de señal" se refiere a un péptido corto (de una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 60 aminoácidos) que dirige el transporte cotraduccional o post-traduccional de una proteína desde el citosol hasta determinados orgánulos, tales como el núcleo, la matriz mitocondrial y el retículo endoplasmático, por ejemplo. Para las proteínas que presentan un péptido de señal con diana en el RE, los péptidos de señal son típicamente cortados a partir de la forma precursora por la peptidasa de señal tras el transporte de las proteínas al RE y las proteínas resultantes se desplazan a lo largo de la ruta secretoria hasta sus localizaciones intracelulares (por ejemplo, el aparato de Golgi, la membrana celular o la pared celular) o extracelulares. La expresión "péptidos de señal con diana en el RE" tal como se utiliza en la presente memoria incluye secuencias hidrofóbicas aminoterminales que habitualmente resultan eliminadas enzimáticamente tras la inserción de parte o la totalidad de la proteína a través de la membrana del RE hasta la luz del RE. De esta manera, es conocido de la técnica que una forma precursora de señal de una secuencia puede encontrarse presentes como parte de una forma precursora de una proteína aunque generalmente se encontrará ausente de la forma madura de la proteína.

50 El término "similitud" se refiere al número porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras tal como se define en la Tabla A, posteriormente. La similitud puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias, tales como GAP (Deveraux et al., Nucleic Acids Research 12: 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en la presente memoria pueden compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, determinando dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

TABLA A: sustituciones de aminoácidos conservadoras ejemplares

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val

Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

La alineación óptima de secuencia para la alineación de una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computerizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o mediante inspección y alineación óptima (es decir, que resulte en el porcentaje de homología más alto dentro de la ventana de comparación) generada mediante cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas, tal como se da a conocer, por ejemplo, en Altschul et al., Nucl. Acids Res.25:3389, 1997. Puede encontrarse un comentario detallado del análisis de secuencias en la unidad 19.3 de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1994-1998, capítulo 15.

Los términos "sujeto", "paciente", "huésped" o "individual" se utilizan intercambiamente en la presente memoria y se refieren a cualquier sujeto, en particular a un sujeto vertebrado y todavía más particularmente a un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia o la profilaxis. Entre los animales vertebrados adecuados que se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cualquier miembro del subfilum *Chordata*, incluyendo primates (por ejemplo, seres humanos, monos y simios, e incluye especies de monos tales como el género *Macaca* (por ejemplo monos *Cynomolgus*, tales como *Macaca fascicularis* y/o monos *Rhesus* (*Macaca mulatta*)) y babuinos (*Papio ursinus*), así como titís (especies del género *Callithrix*), monos ardilla (especies del género *Saimiri*) y tamarinos (especies del género *Saguinus*), así como especies de simios, tales como chimpancés (*Pan troglodytes*), roedores (por ejemplo, ratones, ratas y cobayas), lagomorfos (por ejemplo conejos y liebres), bovinos (por ejemplo vacas), ovinos (por ejemplo ovejas), caprinos (por ejemplo, cabras), porcinos (por ejemplo, cerdos), equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), aves (por ejemplo, pollos, pavos, patos, gansos, aves de compañía tales como canarios, periquitos, etc.), mamíferos marinos (por ejemplo, delfines y ballenas), reptiles (serpientes, ranas, lagartijas, etc.) y peces. Un sujeto preferente es un ser humano que necesita tratamiento o profilaxis de una condición. Sin embargo, se entiende que los términos anteriormente indicados no implican que se encuentran presentes síntomas.

El término "transgén" se utiliza en la presente memoria para describir material genético que ha sido o va a ser inmediatamente introducido de manera artificial en un genoma de un organismo huésped y que es transmitido a la progenie de dicho huésped. En algunas realizaciones, confiere una propiedad deseada a una célula de mamífero o un vector ortopox en el que se introduce o, de otro modo, conduce a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede presentar una predisposición a la misma pero que todavía no se le ha diagnosticado, (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo, y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad.

Los términos "tipo salvaje", "natural", "nativo" y similar con respecto a un organismo, polipéptido o secuencia de ácido nucleico, se refieren a que el organismo, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos es natural o se encuentra disponible en por lo menos un organismo natural que no ha sido modificado, mutado o de otro modo manipulado por el ser humano.

Entre las variantes se incluyen moléculas de ácidos nucleicos suficientemente similares a una molécula de referencia o sus formas complementarias en la totalidad o parte de las mismas de manera que puede conseguirse la hibridación selectiva bajo condiciones de astringencia intermedia o alta o que presentan una identidad de secuencia de aproximadamente 60% a 90% o de 90% a 98% respecto a las secuencia de nucleótidos que definen un factor de espectro de huéspedes de poxvirus de referencia en una ventana de comparación que comprende por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos. Preferentemente, la región de hibridación presenta una longitud de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 nucleobases o superior. Preferentemente, el porcentaje de identidad entre una secuencia particular de nucleótidos y la secuencia de referencia es por lo menos aproximadamente 80%, o 85%, o más preferentemente aproximadamente 90% similar o más, tal como aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. Los porcentajes de identidad de entre 80% y 100% se encuentran comprendidos. La longitud de la secuencia de nucleótidos depende de su función propuesta. Los homólogos se encuentran comprendidos. Los

términos "homólogo", "genes homólogos" u "homólogos" se refieren ampliamente a moléculas funcional y estructuralmente relacionadas, incluyendo las de otras especies. Los homólogos y ortólogos son ejemplos de variantes.

5 La identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede determinarse de la manera siguiente. La secuencia de ácidos nucleicos de la invención se utiliza para la búsqueda en una base de datos de secuencias de ácidos nucleicos, tal como la base de datos GenBank (accesible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando el programa BLASTM, versión 2.1 (basado en Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389-3402, 1997). El programa se utiliza en el modo sin huecos. Se utiliza la filtración por defecto para eliminar las homologías de secuencia debido a regiones de baja complejidad. Se utilizan parámetros por defecto de BLASTM.

10 La identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse de la manera siguiente. La secuencia del polipéptido de la invención se utiliza para la búsqueda en una base de datos de secuencias de polipéptidos, tal como la base de edatos GenBank (accesible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLASTP. El programa se utiliza en el modo sin huecos. Se utiliza la filtración por defecto para eliminar las homologías de secuencia debido a regiones de baja complejidad. Se utilizaron los parámetros por defecto de BLASTP. La filtración para las secuencias de baja complejidad puede utilizar el programa SEG.

15 Las secuencias preferentes se hibridarán bajo condiciones restrictivas a una secuencia de referencia o su complemento. La expresión "hibridación bajo condiciones restrictivas" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a la capacidad de una molécula de ácidos nucleicos de hibridarse con una molécula diana de ácidos nucleicos (tal como una molécula diana de ácidos nucleicos inmovilizada sobre una membrana con ADN o ARN, tal como una transferencia southern o northern) bajo condiciones definidas de temperatura y concentración salina. Con respecto a las moléculas de ácidos nucleicos de más de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones típicas de hibridación restrictiva son una temperatura no más de 25°C a 30°C (por ejemplo 10°C) inferior a la temperatura de fusión (T_f) del dúplex nativo (ver de manera general Sambrook et al. (supra); Ausubel et al., 1999). La T_f para las moléculas de ácidos nucleicos de más de aproximadamente 100 bases pueden calcularse mediante la fórmula $T_f = 81,5 + 0,41\% (G+C-\log (Na^+))$. Con respecto a las moléculas de ácidos nucleicos con una longitud inferior a 100 bases, las condiciones ejemplares de hibridación restrictiva son 5°C a 10°C inferiores a la T_f.

20 El término "deleción" en el presente contexto se refiere a la totalidad o parte de la región codificante del gen diana. El término comprende además cualquier forma de mutación o transformación que anule la expresión génica del gen diana o anule o regule negativamente de manera sustancial el nivel o actividad de la proteína codificada.

25 La referencia a "gen" incluye el ADN correspondiente a los exones o el marco de lectura abierta de un gen. La referencia en la presente memoria a un "gen" también se considera que incluye: un gen genómico clásico que consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias 5' y 3' no traducidas) o ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (es decir, exones) y secuencias 5' y 3' no traducidas del gen.

30 La expresión "elemento regulador" o "secuencia reguladora" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo ADN) necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en una célula huésped particular. Las secuencias reguladoras que resultan adecuadas para las células procarióticas, por ejemplo, incluyen un promotor y opcionalmente una secuencia de acción en cis, tal como una secuencia de operador y un sitio de unión ribosómica. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para las células eucarióticas se incluyen promotores, señales de poliadenilación, intensificadores de transcripción, intensificadores de traducción, secuencias líder o posteriores que modulan la estabilidad del ARNm, así como secuencias de reconocimiento que dirigen un producto codificado por un polinucleótido transcrito a un compartimiento intracelular dentro de una célula o al medio extracelular.

35 Los constructos quiméricos adecuados para las presentes células de mamífero modificadas comprenden una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un factor de espectro de huéspedes de ortopox, que se encuentra operablemente ligado a una secuencia reguladora. La secuencia reguladora convenientemente comprende secuencias de control transcripcional y/o traduccional, que serán compatibles para la expresión en la célula. Típicamente, entre las secuencias de control transcripcional y traduccional se incluyen, aunque sin limitación, una secuencia de promotor, una región 5' no codificante, una región reguladora en cis, tal como un sitio de unión funcional para una proteína reguladora de la transcripción o proteína reguladora de la traducción, un marco de lectura abierta cadena arriba, secuencias de unión ribosómica, un sitio de inicio transcripcional, un sitio de inicio traduccional y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, codón de terminación, un sitio de parada traduccional y una región 3' no traducida. Se encuentran contemplados promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen de la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

40 Las secuencias de promotor contempladas pueden ser nativas de las células de mamífero o pueden derivarse de una fuente alternativa, en la que la región es funcional en el organismo seleccionado. La elección de promotor diferirá dependiendo de la célula huésped deseada. Por ejemplo, entre los promotores que podrían utilizarse para la

expresión en células de mamífero se incluyen el promotor metalotioneína, que puede ser inducido en respuesta a metales pesados, tales como el cadmio, el promotor β -actina, así como promotores víricos, tales como el promotor del antígeno T grande del SV40, el promotor temprano inmediato (IE, por sus siglas en inglés) del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP, por sus siglas en inglés), el promotor del virus herpes simplex y un promotor del VPH, en particular la región reguladora cadena arriba (URR, por sus siglas en inglés) del VPH, entre otros. La totalidad de dichos promotores se encuentra bien descrita y fácilmente disponible de la técnica.

También pueden utilizarse elementos intensificadores en la presente memoria para incrementar los niveles de expresión de los constructos de mamífero. Entre los ejemplos se incluye el intensificador génico temprano del SV40, tal como se indica en, por ejemplo, Dijkema et al., *EMBO J.* 4:761, 1985, el intensificador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) del virus del sarcoma de Rous, tal como se describe en, por ejemplo, German et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, 1982 y elementos derivados del CMV humano, tal como se describe en, por ejemplo, Boshart et al., *Cell* 41:521, 1985, tal como elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV.

El constructo quimérico puede comprender además una secuencia 3' no traducida. Una secuencia 3' no traducida se refiere a aquella parte de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualesquiera otras señales reguladoras capaces de intervenir en el procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza por añadir segmentos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación son comúnmente reconocidas por la presencia de homología respecto a la forma canónica 5' AATAAA-3', aunque las variaciones no dejan de ser comunes. La secuencia de ADN reguladora 3' no traducida preferentemente incluye entre aproximadamente 50 y 1.000 nt y puede contener secuencias de terminación transcripcional y traduccional además de una señal de poliadenilación y cualesquiera otras señales reguladoras capaces de intervenir en el procesamiento del ARNm o la expresión génica.

En algunas realizaciones, el constructo quimérico contiene además un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células que contienen el constructo. Los genes de selección son bien conocidos de la técnica y son compatibles para la expresión en la célula de interés.

En una realización, la expresión del gen estructural o de ensamblaje de ortopox se encuentra bajo el control de un promotor. En una realización no limitativa, el promotor es un promotor constitutivo celular, tal como EF1 alfa humano (promotor de gen del factor 1-alfa de alargamiento humano), DHFR (promotor del gen de la dihidrofolato reductasa) o PGK (promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa) que dirigen la expresión de un nivel suficiente de CP77 para sostener la propagación vírica en ausencia de efectos tóxicos significativos sobre la célula huésped. Los promotores también pueden ser inducibles, tal como el promotor inducible celular MTH (de un gen de metalotioneína); también se utilizan promotores víricos en las células de mamífero, tales como CMV, RSV, SV-40 y MoU3.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero modificada en la que se modifica el genoma de la célula para que comprenda una secuencia codificante de CP77 bajo el control de un promotor de manera que la línea celular modificada proporcione soporte a la propagación de un poxvirus que es menos capaz o es incapaz de propagarse en la célula no modificada.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para propagar un ortopoxvirus que no se propaga en células CHO, comprendiendo el procedimiento propagar el poxvirus in vitro en una línea celular de mamífero, en la que la línea celular es modificada para codificar y expresar CP77 bajo el control de un promotor.

En una realización, el genoma de la célula comprende además una secuencia codificante de D13L bajo el control de un promotor y/o comprende además una secuencia codificante de K1L bajo el control de un promotor.

En otra realización, la célula es una línea celular continua, preferentemente una célula CHO.

En otras realizaciones, la célula de mamífero puede ser una célula humana, una célula de primate, una célula de hámster o una célula de conejo.

En otra realización, el gen CP77, el gen D13L y/o el gen K1L se encuentra bajo el control de un promotor de mamífero.

En otra realización, la expresión del gen CP77 proporciona soporte a la propagación del virus para generar rendimientos víricos equivalentes a los observados en una línea celular permisiva y preferentemente proporciona soporte a una proporción de amplificación de la replicación vírica superior a 500.

En otra realización, CP77, D13L y/o K1L se encuentra codificados por una secuencia contigua de nucleótidos, un codón optimizado para la expresión en células de mamífero.

Un ejemplo de una secuencia de K1L se proporciona en la SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

La memoria se refiere ampliamente a células modificadas (recombinantes o transformadas) y a un procedimiento para la preparación in vitro de vectores víricos en células huésped eucarióticas superiores en cultivo, en la que la célula se modifica genéticamente de manera que potencie o facilite la multiplicación del vector vírico dentro de una población o mediante una población de las células in vitro. En una realización no limitativa, la memoria proporciona la propagación de poxvirus basados en Vaccinia en células de ovario de hámster chino (CHO).

Tal como es conocido por el experto en la materia, las células de ovario de hámster chino (CHO) se derivan del ovario del hámster. *Cricetulus griseus* es el origen más común de las células de mamífero utilizadas para la producción bioindustrial de y de GMP de terapéuticos de proteínas recombinantes, incluyendo anticuerpos. La popularidad de las células CHO para este propósito se basa, en parte, en su rápido crecimiento y elevada producción de proteínas. En consecuencia, las líneas de células CHO han sido bien caracterizadas. Entre las líneas de células CHO adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, las líneas A2, A2H, XrS6, CHO-K1, CHO/dhfr, RR-CHO-K1, UT-I, P22, CHO-1C6, Lec1, Lec2, Lec8, Pro-5 y CDKXB1. La línea celular CHO-K1 depositada en la ATCC con el número de acceso ATCC CLL-61 o ATCC CRL-9618 se utiliza con frecuencia. La línea celular CHO-K1 se derivó como subclón de la línea celular parental CHO iniciada a partir de una biopsia de un ovario de un hámster chino adulto por Puck T. (1957). La presente memoria describe células modificadas diferentes de las células CHO modificadas.

Con el fin de maximizar el rendimiento de virus producido, pueden adaptarse líneas celulares, tales como las células CHO, al cultivo en suspensión utilizando técnicas estándares. La referencia a una célula recombinante o modificada incluye su progenie. Las células pueden comercializarse en cualquier forma, incluyendo la forma congelada o en suspensión líquida. Las células pueden comercializarse infectadas con un vector poxvirus.

En la presente memoria la referencia a CP77 se refiere al gen de espectro de huéspedes de la viruela vacuna a la que se hace referencia en Sphener et al. (1988) y Hsiao et al. (2006) y a ortólogos funcionales y formas modificadas de los mismos capaces según se determina en la presente memoria de proporcionar soporte al crecimiento de los poxvirus al expresarse en forma de gen heterólogo en el genoma de una célula huésped de mamífero. La referencia a "formas modificadas" incluye una variación (tal como una delección, sustitución o adición) de la secuencia de tipo salvaje o de referencia. Se proporciona una secuencia de nucleótidos de referencia en la SEC ID nº 1. Las formas modificadas comparten una identidad de secuencia de por lo menos 80% en la región codificante o una o más partes de la misma que comprende por lo menos 200 pares de bases contiguos. Entre las formas modificadas se incluyen formas de codones optimizados tal como se indican en la presente memoria, que han sido optimizadas para la expresión en un mamífero o en otras células eucarióticas superiores, incluyendo las células CHO. La referencia a CP77 incluye ortólogos, es decir, genes con la misma función que en otras especies o identificada mediante nombres diferentes. El factor de espectro de huéspedes del virus de la viruela vacuna, CP77, también se denomina VHR1, CHOhr y CPXV025. El gen CHOhr/CP77 en la cepa Western Reserve (WR) de Vaccinia se encuentra sustancialmente fragmentado y no produce ningún factor funcional. CP77 se encuentra ausente en el virus Vaccinia modificado Ankara (VMA) y en la cepa Copenhagen.

En la presente memoria la referencia a "CP77", "D13L" y "K1L" incluye ortólogos funcionales y variantes funcionales. El término "funcional" se refiere a la calidad de expresión indicada en la presente memoria (Es decir, la transcripción y la traducción) dirigida a partir del genoma de mamífero de una célula en cultivo, para proporcionar soporte a la propagación del poxvirus dentro del citoplasma de la célula expresante. El término "propagar" incluye la propagación intracelular y la propagación intercelular y comprende la producción de partículas víricas maduras.

En una realización, una población de las células modificadas sostiene la propagación de un poxvirus que es menos capaz o sustancialmente incapaz de propagarse en una célula de control no modificada. La incapacidad de propagarse se refiere a que la transmisión célula a célula o sujeto a sujeto típicamente no ocurre.

La referencia a una "célula de control no modificada" incluye la célula modificada tal como existía antes de la modificación para codificar por lo menos un factor de espectro de huéspedes víricos seleccionado de entre el grupo que consiste en CP77, K1L y SPI-1 y para expresar los mismos a partir de su genoma bajo el control de un promotor, así como otras células de control adecuadas conocidas de la técnica.

Por ejemplo, los poxvirus tales como VMA y Vaccinia son incapaces de propagarse en las células CHO. Sin embargo, tal como se ha determinado inesperadamente en la presente memoria, las células CHO que se modifican recombinantemente para expresar CP77 a partir de su genoma bajo el control de un promotor son capaces de proporcionar soporte a la propagación de no sólo Vaccinia sino también de derivados de Vaccinia, tales como el VMA. Tras la propagación en el sujeto, las células CHO-CP77 modificadas, VMA y Vaccinia todavía son incapaces de propagarse en las células CHO no modificadas o en otro control adecuado.

La referencia en la presente memoria a "poxvirus" incluye un vector poxvirus recombinante codificante de una molécula heteróloga de interés (tal como un antígeno de interés) como medicamento, o agente profiláctico, diagnóstico o terapéutico. Dichos vectores poxvirus recombinantes típicamente se utilizan como vacunas contra enfermedades o condiciones no inducidas por poxvirus. Además, el término poxvirus incluye poxvirus aislados y

derivados de los mismos propuestos para la utilización como vacuna terapéutica o profiláctica contra una infección por poxvirus, tal como la viruela o la infección por virus de la viruela.

La referencia en la presente memoria a "basado en Vaccinia" incluye Vaccinia y derivados, y formas modificadas del virus Vaccinia. Entre los derivados basados en Vaccinia se incluyen, aunque en modo alguno se limitan a ellos, el VMA y el virus Vaccinia altamente atenuado (NYVAC, por sus siglas en inglés). La referencia a VMA y NYVAC incluye cepas o derivados de dichos poxvirus conocidos de la técnica. Las formas modificadas pueden presentar modificaciones en uno a diez o más genes. El término "modificación" pretende referirse a una variación (tal como una delección, sustitución o adición) respecto de la secuencia de tipo salvaje o de referencia. La referencia a "atenuada" incluye poxvirus que no se propagan o que se propagan en un grado sustancialmente inferior en un sujeto relevante en comparación con una forma no atenuada del mismo virus. El término incluye además virus que no son patógenos en un sujeto.

En una realización, la célula es una línea celular continua. Es menos imperativo que la célula modificada sea una línea celular capaz de dividirse continuamente. Puede modificarse una célula de mamífero o eucariótica superior según la presente invención y posteriormente transformarla o inmortalizarla para convertirla en una línea celular en división continua. Sin embargo, la célula antes de la modificación convenientemente es una línea celular continua conocida de la técnica bien caracterizada, en división continua y compatible con la biotecnología. Dichas células se encuentran convenientemente disponibles de organizaciones de depósito, tales como la American Type Culture Collection (ATCC) o la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Entre las líneas celulares de mamífero adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, RK18, BHK, VERO, HBOC-143B, HaCat, HepG2, HeLa, HT1080, HEK-293, RD, COS-7, CHO, Jurkat, HUT, SUPT, C8166, MOLT4/clone8, MT-2, MT-4, H9, PM1, CEM, células de mieloma (por ejemplo las células SB20) y CEMX174 se encuentran disponibles de, por ejemplo, la ATCC.

En una realización, la célula es una célula CHO. Las líneas de células CHO de la técnica anterior, que no codifican genes del huésped vírico, no permiten la preparación de Vaccinia o derivados de Vaccinia sustancialmente incapaces de replicarse en el ser humano.

En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, una célula de primate, una célula de hámster o una célula de conejo.

Los constructos quiméricos adecuados para las presentes células de mamífero modificadas comprenden una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un factor de espectro de huéspedes de poxvirus, que se encuentra operablemente ligado a una secuencia reguladora. La secuencia reguladora convenientemente comprende secuencias de control transcripcional y/o traduccional, que serán compatibles para la expresión en la célula. Típicamente, entre las secuencias de control transcripcional y traduccional se incluyen, aunque sin limitación, una secuencia de promotor, una región 5' no codificante, una región reguladora en cis, tal como un sitio de unión funcional para una proteína reguladora de la transcripción o proteína reguladora de la traducción, un marco de lectura abierta cadena arriba, secuencias de unión ribosómica, un sitio de inicio transcripcional, un sitio de inicio traduccional y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, codón de terminación, un sitio de parada traduccional y una región 3' no traducida. Se encuentran contemplados promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen de la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

Las secuencias de promotor contempladas pueden ser nativas de las células de mamífero o pueden derivarse de una fuente alternativa, en la que la región es funcional en el organismo seleccionado. La elección de promotor diferirá dependiendo de la célula huésped deseada. Por ejemplo, entre los promotores que podrían utilizarse para la expresión en células de mamífero se incluyen el promotor metalotioneína, que puede ser inducido en respuesta a metales pesados, tales como el cadmio, el promotor β -actina, así como promotores víricos, tales como el promotor del antígeno T grande del SV40, el promotor temprano inmediato (IE, por sus siglas en inglés) del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP, por sus siglas en inglés), el promotor del virus herpes simplex y un promotor del VPH, en particular la región reguladora cadena arriba (URR, por sus siglas en inglés) del VPH, entre otros. La totalidad de dichos promotores se encuentra bien descrita y fácilmente disponible de la técnica.

También pueden utilizarse elementos intensificadores en la presente memoria para incrementar los niveles de expresión de los constructos de mamífero. Entre los ejemplos se incluye el intensificador génico temprano del SV40, tal como se indica en, por ejemplo, Dijkema et al., EMBO J. 4:761, 1985, el intensificador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) del virus del sarcoma de Rous, tal como se describe en, por ejemplo, Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777, 1982 y elementos derivados del CMV humano, tal como se describe en, por ejemplo, Boshart et al., Cell 41:521, 1985, tal como elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV.

El constructo quimérico puede comprender además una secuencia 3' no traducida. Una secuencia 3' no traducida se

refiere a aquella parte de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualesquiera otras señales reguladoras capaces de intervenir en el procesamiento del ARNm o la expresión génica.

La señal de poliadenilación se caracteriza por añadir segmentos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación son comúnmente reconocidas por la presencia de homología respecto a la forma canónica 5' AATAAA-3', aunque las variaciones no dejan de ser comunes. La secuencia de ADN reguladora 3' no traducida preferentemente incluye entre aproximadamente 50 y 1.000 nt y puede contener secuencias de terminación transcripcional y traduccional además de una señal de poliadenilación y cualesquiera otras señales reguladoras capaces de intervenir en el procesamiento del ARNm o la expresión génica.

En algunas realizaciones, el constructo quimérico contiene además un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células que contienen el constructo. Los genes de selección son bien conocidos de la técnica y son compatibles para la expresión en la célula de interés.

En una realización, la expresión del gen de espectro de huéspedes víricos se encuentra bajo el control de un promotor. En una realización no limitativa, el promotor es un promotor constitutivo celular, tal como EF1 alfa humano (promotor de gen del factor 1-alfa de alargamiento humano), DHFR (promotor del gen de la dihidrofolato reductasa) o PGK (promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa) que dirigen la expresión de un nivel suficiente de CP77 para sostener la propagación vírica en ausencia de efectos tóxicos significativos sobre la célula huésped. Los promotores también pueden ser inducibles, tal como el promotor inducible celular MTH (de un gen de metalotioneína); también se utilizan promotores víricos en las células de mamífero, tales como CMV, RSV, SV4 y MoU3.

Convenientemente, en una realización, la expresión del gen de espectro de huéspedes víricos permite sostener la propagación del virus, generando rendimientos víricos equivalentes a los observados en líneas celulares permisivas. La expresión del gen de espectro de huéspedes víricos, por ejemplo, proporciona soporte a una proporción de amplificación de la replicación vírica superior a 500. La expresión del gen de espectro de huéspedes víricos proporciona soporte a la propagación vírica en ausencia de toxicidad significativa para las células huésped. Una toxicidad significativa para las células huésped se refiere a un nivel de expresión del factor de espectro de huéspedes víricos que reduce el rendimiento vírico debido a una muerte prematura o falta de división de la célula huésped. Al experto en la materia le resultará familiares los métodos para evaluar cualitativa o cuantitativamente parámetros de la célula huésped, tales como la supervivencia y multiplicación de las células huésped y parámetros víricos, tales como la expresión del gen de espectro de huéspedes víricos, la replicación vírica y el rendimiento vírico.

En una realización, el poxvirus es un virus cordopox diferentes del virus ortopox que codifica un CP77 u ortólogo de CP77 funcional. El virus de la viruela vacuna codifica CP77 y, por lo tanto, no se encuentra comprendido en dicho aspecto. Entre los virus ortopox se incluyen el virus de la viruela del búfalo, el virus de la viruela vacuna, el virus de la viruela del camello, el virus ectromelia, el virus de la viruela del mono, el virus de la viruela del conejo, el virus de la viruela del mapache, el virus teterapox, el virus Vaccinia, el virus de la viruela del ratón meteoro, el virus de la viruela de la mofeta y el virus de la enfermedad Uasin Gishu de los caballos. Entre otros géneros se incluyen parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, virus de la viruela porcina, molluscipoxvirus y yatapoxvirus.

En una realización, el poxvirus es el VMA o un derivado del VMA que es sustancialmente incapaz de replicarse en el ser humano/un sujeto.

En una realización, el poxvirus es el virus Vaccinia o un derivado de Vaccinia que es sustancialmente no replicante in vivo en el ser humano.

En otra realización, el poxvirus es adecuado para la utilización como vacuna poxvírica.

En una realización adicional, el poxvirus es un vector poxvírico recombinante que codifica y expresa una molécula heteróloga de interés, tal como un antígeno de interés médico, en el que el vector poxvírico recombinante es para la utilización como agente diagnóstico, terapéutico o profiláctico en un sujeto.

En la presente memoria la referencia a K1L se refiere al gen descrito por Shisler y Jin (2004) y ortólogos o formas modificadas del mismo.

La referencia en la presente memoria a SPI-1 se refiere al gen de espectro de huéspedes descrito por Brookes et al. (1995) u ortólogos o formas modificadas del mismo.

En algunas realizaciones, y para evitar cualquier duda, el presente proceso de propagación vírica mejorado no requiere la adición de genes al genoma poxvírico. Evidentemente, ello no excluye modificaciones de vectores víricos con otros fines, tales como, aunque sin limitación, para codificar moléculas heterólogas como antígenos de interés con fines de vacunación o para producir una respuesta inmunológica en un sujeto.

La transcripción del gen de espectro de huéspedes poxvíricos dentro del núcleo de la célula huésped y la traducción

del producto codificado tiene lugar en la célula infectada y resulta suficiente para la propagación poxvímica en el citoplasma de la célula huésped. Aunque sin limitación a ningún modo de acción particular, se propone que CP77 es un agente de protección vírica.

5 En una realización ilustrativa, el gen de espectro de huéspedes poxvíricos expresado por la línea celular infectada es CP77. Tal como se muestra en el Ejemplo 4, en el caso de que se modifique el núcleo de una célula CHO para codificar y expresar CP77, es capaz de proporcionar sostén a la amplificación vírica como si fuese una línea celular permisiva, tal como 143B. Típicamente, se observan placas confluyentes dentro de los dos primeros días desde la infección.

10 En otra realización, el nivel de propagación vírica en la célula modificada proporciona una proporción de amplificación de entre por lo menos 10 y 5.000. Las proporciones de amplificación son, en algunas realizaciones, de entre 500 y 3.000 o de entre 1.000 y 4.000.

15 En otra realización, el promotor que controla la expresión del gen de espectro de huéspedes poxvíricos heterólogo proporciona un nivel de expresión del gen heterólogo de espectro de huéspedes poxvíricos en la célula. El nivel de expresión de CP77 puede ser similar o exceder el producido por el virus de la viruela vacuna en las células permisivas.

20 En otra realización, el promotor que controla la expresión del gen heterólogo de espectro de huéspedes poxvíricos proporciona un nivel de expresión del gen heterólogo en la célula suficiente para permitir la propagación vírica por lo menos hasta el nivel de propagación vírica en una célula permisiva.

25 En una realización, la producción poxvímica en una línea de células CHO es igual o excede el nivel de producción poxvímica en una célula de control positivo.

En una realización, el nivel de producción del virus VMA en las células CHO es sustancialmente igual o excede el nivel de producción de virus VMA en las células CEF.

30 En una realización, CP77, K1L y/o SPI-1 se encuentran codificados por una secuencia contigua de nucleótidos de codones optimizados para la expresión en células de mamífero.

Tal como se indica adicionalmente en la presente memoria, la secuencia de ácidos nucleicos de codones optimizados codificante de CP77 puede presentar una identidad de secuencia de nucleótidos inferior a 80% o inferior a 75% respecto a la secuencia codificante de la proteína CP77 del virus de la viruela vacuna de la cepa Brighton Red (UniprotKB/Swiss-Prot:P12932.1). En algunas realizaciones, la secuencia de codones optimizados presenta la secuencia indicada en la SEC ID nº 1 o es una variante funcional que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 70% respecto a la secuencia indicada en la SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, el factor de espectro de huéspedes víricos CP77 presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº 2 o presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 70% respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº 2.

45 En algunas realizaciones, se encuentra contemplado un kit que comprende o que consiste esencialmente en una población, tal como una población clonal, de células de mamífero modificadas que expresan CP77 a partir de su genoma tal como se indica en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula modificada no contiene un virus Vaccinia.

50 La presente descripción describe además un procedimiento o método de preparación de un poxvirus que no se propaga en las células CHO, comprendiendo el procedimiento propagar el poxvirus in vitro en una línea celular de mamífero en la que la línea celular ha sido modificada para codificar y expresar CP77 bajo el control de un promotor. El procedimiento puede comprender además el aislamiento de las partículas víricas.

55 La línea celular es convenientemente una línea celular de mamífero que es conocido por el experto en la materia que resulta adecuada para la preparación de un medicamento o agente terapéutico, diagnóstico o profiláctico.

La memoria describe una célula CHO modificada, en la que la célula CHO es modificada para codificar CP77 y expresarlo a partir de su genoma bajo el control de un promotor.

60 En una realización, la línea celular CHO modificada proporciona sostén a la propagación de un virus que es menos capaz de propagarse en una célula CHO de control no modificada que es una que no expresa CP77.

En una realización, el virus es un ortopoxvirus diferentes de un ortopoxvirus que codifica CP77. Tal como es conocido de la técnica, el virus de la viruela vacuna es un poxvirus que codifica CP77.

65 En algunas realizaciones, el virus es el virus Vaccinia o un derivado de Vaccinia que es sustancialmente no replicante in vivo en el ser humano/en un sujeto.

En algunas realizaciones, el virus es el VMA.

5 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación de un poxvirus que es sustancialmente no replicante en el ser humano, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo a partir de (i) con el poxvirus que es sustancialmente no replicante en el ser humano.

10 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación de un poxvirus que es sustancialmente no replicante en el ser humano, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77, y D13L y/o K1L, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo a partir de (i) con el poxvirus que es sustancialmente no replicante en el ser humano.

15 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación del VMA, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77 y D13L y/o K1L, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo de (i) con el VMA.

20 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación de un derivado de Vaccinia que es sustancialmente no replicante en el ser humano, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77 y D13L y/o K1L, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo de (i) con el derivado de Vaccinia.

25 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación del VMA codificante de una proteína heteróloga, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77 y D13L y/o K1L, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo de (i) con el VMA.

30 En otra realización, la memoria proporciona un método de propagación de un derivado de Vaccinia que es una proteína heteróloga que es sustancialmente no replicante en el ser humano, en el que el método comprende: (i) cultivar una célula CHO que ha sido transformada para expresar CP77 y D13L y/o K1L, e (ii) infectar la célula CHO en cultivo de (i) con el derivado de Vaccinia.

35 En otra realización, la presente memoria proporciona un vector, polinucleótido o plásmido creado artificialmente que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de un gen de espectro de huéspedes víricos operablemente conectado a elementos reguladores, tales como un promotor para la expresión en una línea celular de mamífero. En algunas realizaciones, el gen vírico es el gen de la proteína CP77 que contiene dominio repetido de anquirina de la viruela vacuna (UniProtKBSwiss-Prot P12932.1 [proteína CP77 025LBR]). En una realización, el gen de espectro de huéspedes víricos, tal como CP77, ha sido optimizado para sus codones para la expresión en una línea celular de mamífero. Los vectores y plásmidos adecuados son conocidos de la técnica.

40 En una realización, el polinucleótido codifica CP77. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID nº 1 (de codones optimizados para la expresión en células de mamífero tales como CHO). En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado comprende la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID nº 1 o una variante de la misma que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID nº 2.

45 En otra realización, la presente memoria describe un vector de trasposición para la inserción estable de un gen de espectro de huéspedes víricos en una célula de mamífero.

50 La presente descripción proporciona además un método de transformación de una célula en cultivo de mamífero o eucariota superior que es sustancialmente no permisiva a un virus, en una célula que es permisiva al virus, en el que el método comprende transformar la célula para expresar CP77.

En algunas realizaciones, el método incluye transfectar la célula con un vector capaz de dirigir la expresión de un CP77 codificado bajo el control de un promotor de mamífero.

55 En algunas realizaciones, el vector es un vector de transposición codificante de CP77 bajo el control de un promotor de mamífero.

60 En una realización no limitativa, el promotor es un promotor constitutivo celular, tal como EF1 alfa humano (promotor de gen del factor 1-alfa de alargamiento humano), DHFR (promotor del gen de la dihidrofolato reductasa) o PGK (promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa) que dirigen la expresión de un nivel suficiente de CP77 para sostener la propagación vírica en ausencia de efectos tóxicos significativos sobre la célula huésped. Los promotores también pueden ser inducibles, tal como el promotor inducible celular MTH (de un gen de metalotioneína); también se utilizan promotores víricos en las células de mamífero, tales como CMV, RSV, SV4 y MoU3.

65 En algunas realizaciones, la célula es una célula CHO.
En algunas realizaciones, el virus es un poxvirus.

En algunas realizaciones, el poxvirus es un derivado de Vaccinia que resulta no patogénico o no replicante en el ser humano.

El término "aislado" se refiere a material que se encuentra sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren al aislamiento y/o purificación in vitro de una molécula polinucleótida o polipeptídica respecto de su medio celular natural y de la asociación con otros componentes de la célula. Aunque sin limitación, una composición aislada, complejo, polinucleótido, péptido o polipéptido puede referirse a una secuencia nativa que se aísla mediante purificación o a una secuencia que se produce mediante medios recombinantes o sintéticos.

Entre las variantes se incluyen moléculas de ácidos nucleicos suficientemente similares a una molécula de referencia o sus formas complementarias en la totalidad o parte de las mismas de manera que puede conseguirse la hibridación selectiva bajo condiciones de astringencia intermedia o alta o que presentan una identidad de secuencia de aproximadamente 60% a 90% o de 90% a 98% respecto a las secuencias de nucleótidos que definen un factor de espectro de huéspedes de poxvirus de referencia en una ventana de comparación que comprende por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos. Preferentemente, la región de hibridación presenta una longitud de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 nucleobases o superior. Preferentemente, el porcentaje de identidad entre una secuencia particular de nucleótidos y la secuencia de referencia es por lo menos aproximadamente 80%, o 85%, o más preferentemente aproximadamente 90% similar o más, tal como aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. Los porcentajes de identidad de entre 80% y 100% se encuentran comprendidos. La longitud de la secuencia de nucleótidos depende de su función propuesta. Los homólogos se encuentran comprendidos. Los términos "homólogo", "genes homólogos" u "homólogos" se refieren ampliamente a moléculas funcional y estructuralmente relacionadas, incluyendo las de otras especies. Los homólogos y ortólogos son ejemplos de variantes.

La identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede determinarse de la manera siguiente. La secuencia de ácidos nucleicos de la invención se utiliza para la búsqueda en una base de datos de secuencias de ácidos nucleicos, tal como la base de datos GenBank (accesible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando el programa BLASTM, versión 2.1 (basado en Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389-3402, 1997). El programa se utiliza en el modo sin huecos. Se utiliza la filtración por defecto para eliminar las homologías de secuencia debido a regiones de baja complejidad. Se utilizan parámetros por defecto de BLASTM.

La identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse de la manera siguiente. La secuencia del polipéptido de la invención se utiliza para la búsqueda en una base de datos de secuencias de polipéptidos, tal como la base de datos GenBank (accesible en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLASTP. El programa se utiliza en el modo sin huecos. Se utiliza la filtración por defecto para eliminar las homologías de secuencia debido a regiones de baja complejidad. Se utilizaron los parámetros por defecto de BLASTP. La filtración para las secuencias de baja complejidad puede utilizar el programa SEG.

La expresión "hibridación bajo condiciones restrictivas" y equivalentes gramaticales de la misma se refiere a la capacidad de una molécula de ácidos nucleicos de hibridarse con una molécula diana de ácidos nucleicos (tal como una molécula diana de ácidos nucleicos inmovilizada sobre una membrana con ADN o ARN, tal como una transferencia southern o northern) bajo condiciones definidas de temperatura y concentración salina. Con respecto a las moléculas de ácidos nucleicos de más de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones típicas de hibridación restrictiva son una temperatura que no es más de 25°C a 30°C (por ejemplo 10°C) inferior a la temperatura de fusión (Tf) del dúplex nativo (ver de manera general Sambrook et al. (*supra*); Ausubel et al., 1999). La Tf para las moléculas de ácidos nucleicos de más de aproximadamente 100 bases pueden calcularse mediante la fórmula $T_f = 81,5 + 0,41\% (G+C-\log (Na^+))$. Con respecto a las moléculas de ácidos nucleicos con una longitud inferior a 100 bases, las condiciones ejemplares de hibridación restrictiva son 5°C a 10°C inferiores a la Tf.

El término "vector" se refiere a una molécula polinucleótida, convenientemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura, virus, mamífero, ave, reptil o pez en la que puede insertarse o clonarse un polinucleótido. Un vector preferentemente contiene uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped definida, incluyendo una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor del mismo, o ser integrable en el genoma del huésped definido de manera que la secuencia clonada sea reproducible. De acuerdo con lo anterior, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe en forma de una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido circular lineal o cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualesquiera medios para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, al ser introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Un sistema vector puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que debe introducirse en el genoma de la célula huésped, o un transposón. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que debe introducirse el vector. El vector puede incluir además un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a antibiótico que puede utilizarse

para la selección de transformantes adecuados. Los ejemplos de dichos genes de resistencia son conocidos por el experto en la materia.

5 La referencia a "gen" incluye ADNc correspondiente a los exones de un gen. La referencia en la presente memoria a un "gen" también se considera que incluye: un gen genómico clásico que consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias 5' y 3' no traducidas) o ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (es decir, exones) y secuencias 5' y 3' no traducidas del gen.

10 La expresión "elemento regulador" o "secuencia reguladora" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo ADN) necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en una célula huésped particular. Las secuencias reguladoras que resultan adecuadas para las células procarióticas, por ejemplo, incluyen un promotor y opcionalmente una secuencia de acción en cis, tal como una secuencia de operador y un sitio de unión ribosómica. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para las células eucarióticas se incluyen promotores, señales de poliadenilación, intensificadores de transcripción, intensificadores de traducción, secuencias líder o posteriores que modulan la estabilidad del ARNm, así como secuencias de reconocimiento que dirigen un producto codificado por un polinucleótido transcrito a un compartimiento intracelular dentro de una célula o al medio extracelular.

15 20 Las secuencias complementarias y partes de estas secuencias se encuentran comprendidas. Los términos "complemento" y "complementario" utilizados en relación a una molécula de ácidos nucleicos se refieren a la secuencia complementaria de ácidos nucleicos según se determina mediante apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, el complemento de la secuencia de ácidos nucleicos 5'CCATG3' es 5'CATGG3'.

25 La expresión "que se hibrida específicamente a" y similares se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula únicamente a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones restrictivas en el caso de que se halle presente dicha secuencia en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo celular total).

30 Los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente", utilizados intercambiamente en la presente memoria, se refieren a cualquier sujeto, en particular sujeto vertebrado y todavía más particularmente sujeto mamífero, para el que se desea la terapia o la profilaxis. Entre los animales vertebrados adecuados que se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, primates, aves, animales de ganadería (por ejemplo ovejas, vacas, caballos, burros y cerdos), animales de experimentación de laboratorio (por ejemplo, conejos, ratones, ratas, cobayas y hámsters), animales de compañía (por ejemplo gatos y perros) y animales salvajes en cautividad (por ejemplo, zorros, ciervos y dingos). Un sujeto preferente es un primate, tal como un ser humano, que requiere tratamiento o profilaxis. Sin embargo, se entiende que los términos anteriormente indicados no implican que se encuentran presentes síntomas.

40 Las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria se describen en mayor detalle mediante los ejemplos no limitativos a continuación.

EJEMPLO 1

VACV-COP no consigue crecer en las células CHO

45

Materiales y reactivos

- VACV-COP, VSS02, SEMI 20213, Título: $1,6 \times 10^8$ ufp/ml
- Vero: WHO-VERO-MCB pase n° 141, 08/08/2005, Virax Holdings Limited
- 50 • CHO: SA-Pathology 7.05.2004
- Medio de cultivo: RPMI, FBS al 10%, Pen/Strep
- Medio de mantenimiento: RPMI, FBS al 2%, Pen/Strep

55 Se cultivaron células CHO y Vero hasta la confluencia en una placa de 6 pocillos (6-WP, por sus siglas en inglés) por cada línea celular. Se infectó cada pocillo con 4×10^4 ufp de VACV-COP VSS02 durante 45 minutos a temperatura ambiente y después se incubaron a 37°C/5% de CO₂. De cada línea celular se recolectó el contenido de 2 pocillos y se agrupó a las 24 h, 48 h y 72 después de la infección. Los extractos de virus se prepararon mediante congelación-descongelación tres veces y almacenando a -80°C hasta el momento de las titulaciones. Cada extracto se tituló utilizando células Vero tal como se indica en el Protocolo, descrito en el Ejemplo 4.

60 Tras la congelación-descongelación, puede utilizarse una sonda de homogenización para romper dichos grandes agregados insolubles. Cada pocillo que debía recolectarse contenía 2 ml de MM. En cada punto temporal se agruparon 2 pocillos, proporcionando un volumen total de 4 ml por cada punto temporal. Puede añadirse también TE hasta proporcionar un volumen total de 6 ml por punto temporal.

Los resultados de titulación, resultados de rendimiento de virus y rendimientos de producción se tabulan en la Tabla 1. Los resultados muestran que VACV-COP no puede propagarse desde una m.o.i. baja en células CHO, al contrario que en células Vero, en las que la producción vírica se incrementa con el tiempo. VACP-COP es no permisiva en células CHO.

5

EJEMPLO 2

Crecimiento en múltiples etapas para VACV+PH22 [CP77] en CHO frente a VERO

10 CP77 es activo en VACV

Se determinó el potencial de propagación en CHO de un VACV-COP recombinante que expresaba el gen del virus de la viruela vacuna BR025L codificante de CP77 (VACV-PH22 [CP77]) en comparación con células Vero en un estudio de crecimiento multietapa.

15

VACV-PH22 es un virus Vaccinia recombinante de cepa Copenhagen que expresa el ORF 025L nativo de la cepa Brighton de virus de la viruela vacuna que codifica para la proteína de espectro de huéspedes CHO, CP77. Este ORF en Vaccinia también se encuentra bajo el control del promotor nativo BR025L. El gen BR025L nativo (promotor nativo y ORF) se clonó para crear pPH22, que también codifica para una proteína fluorescente roja, DsRed-Express2. pPH22 es un vector de integración que inserta el gen BR025L y el gen DsRed en ORF B19R de VACV-COP, que codifica para la proteína receptora alfa/beta IFN soluble y de superficie celular. La inserción de BR025L y DsRed en VACV-COP se llevó a cabo mediante recombinación homóloga como resultado de la infección de CHO con baja multiplicidad de VACV-COP y la transfección con pPH22. Sólo el virus que contenga el gen BR025L se amplificará adicionalmente en las células CHO, lo que puede verificarse visualmente por la presencia de células infectadas o placas fluorescentes rojas.

25

El virus extraído 3 días después de la recombinación homóloga se amplificó tres veces en CHO y después se tituló en células Vero antes de utilización en el presente estudio de crecimiento multietapa en células CHO.

30 Materiales y reactivos

- VACV-COP, VSS02, SEMI 20213, Título: $1,6 \times 10^8$ ufp/ml
- VACV-PH22 [CP77], Título: 8×10^6 ufp/ml
- Vero: WHO-VERO-MCB pase nº 141, 08/08/2005
- 35 – CHO: SA-Pathology 7.05.2004
- Medio de cultivo: RPMI, FBS al 10%, Pen/Strep para CHO y Vero
- Medio de mantenimiento: RPMI, FBS al 2%, Pen/Strep para CHO y Vero

35

Se cultivaron células CHO y Vero hasta la confluencia en 2x matraces T25 por cada línea celular. Se infectó 1 matraz de cada línea celular con 1×10^5 ufp de VACV-COP VSS02 y uno cada una con 1×10^5 ufp de VACV-PH22 durante 45 minutos a temperatura ambiente y después se incubaron a 37°C/5% de CO₂. De cada línea celular se recolectó el contenido de cada matriz 96 h después de la infección. Los extractos de virus se prepararon mediante congelación-descongelación tres veces y almacenando a -80°C hasta el momento de las titulaciones. Cada extracto se tituló utilizando células Vero tal como se indica en el protocolo detallado en el Ejemplo 4, en formatos de placas de 24 pocillos.

45

Las infecciones se realizaron en matraz T25, 2 matraces por cada línea celular en donde el matraz 1 era para la infección por VACV-COP y el matraz 2, para la infección por VACV-PH22. La recolección sólo se llevó a cabo 96 h después de la infección. Se muestran los resultados en la Tabla 2. En la Tabla 2 puede observarse que: las células CHO no pueden proporcionar soporte a la producción de progenie del virus VACV-COP. Lo anterior confirma los resultados indicados en el Ejemplo 1. Además, VACV-COP era viable ya que la infección de una línea celular permisiva, células Vero en el presente estudio, amplificó el nivel de inóculo a más de 200 veces, por lo tanto los resultados observados en CHO se debían a la restricción de la célula huésped. Sin embargo, al expresar CP77 por un virus Vaccinia recombinante, VACV-PH22, se consiguió una amplificación del inóculo de aproximadamente 700 veces. La expresión de CP77 no limitaba el espectro de huéspedes de Vaccinia a sólo las células CHO, ya que la infección de las células Vero con VACV-PH22 también amplificó el inóculo. Sin embargo, el nivel de amplificación podría no ser tan bueno como Vaccinia sin CP77. Debido a que los errores estándares de los resultados de titulación son tan grandes, la diferencia de rendimiento podría no ser significativa.

50

55

Estos resultados muestran que CP77 expresado a partir del genoma vírico es más que adecuado en posibilitar que VACV-COP se amplifique en la línea celular CHO no permisiva mediante la producción de rendimientos similares a los esperados de un sustrato celular permisivo, tal como Vero.

60

Una posible función para la proteína CP77 durante la infección por virus Vaccinia de las células CHO ha sido informada por Hsiao et al. (2006). Propusieron que CP77 se une y elimina HMG20A del genoma de Vaccinia recién

65

5 sintetizado situado en las fábricas víricas, permitiendo de esta manera que el ciclo vital de Vaccinia continúe en las células CHO. En la presente memoria se plantea que CP77 permite que el genoma recién sintetizado se encuentre disponible para el empaquetamiento que de otro modo no se encontraría disponible en las células CHO debido a la unión y consiguiente "bloqueo" por HMG20a del genoma. Debido a que la función de CP77 no resulta necesaria para la amplificación vírica en líneas celulares permisivas, tales como Vero, se propone en la presente memoria que existe una proteína equivalente alternativa, incluso una proteína celular, que presenta dicha función y que puede encontrarse inactiva o ausente en por lo menos las células CHO pero activa o presente en líneas celulares permisivas. La proteína alternativa podría suponer que CP77 no resulta necesaria y, de esta manera, durante la evolución de Vaccinia posteriormente resultó delecionada o reorganizada, ya que su pérdida de función no resulta esencial para el amplio espectro de huéspedes.

EJEMPLO 3

Construcción de p-LL07-CHO (línea celular policlonal que expresa CP77)

15 Se construyó una línea celular CHO para expresar la proteína CP77. Un virus VACV-COP recombinante que expresa una proteína fluorescente verde (EGFP, por sus siglas en inglés) forma placas que se desarrollan hasta constituir una infección confluyente en unos pocos días de infección.

20 Vaccinia-COP (SCV401C) es un virus Vaccinia recombinante de la cepa Copenhagen (VACV-COP) en el que se ha insertado en el ORF A39R un casete de expresión que consiste en un promotor temprano/tardío fuerte del virus Vaccinia operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, por sus siglas en inglés) y terminado por la secuencia de parada transcripcional temprana de poxvirus. Con la infección de las células no permisivas y permisivas, EGFP se expresará dentro de las células infectadas, que podrán visualizarse utilizando un microscopio fluorescente. En las células permisivas, la fluorescencia verde puede observarse que se extiende de célula a célula a medida que el virus se extiende por la población celular.

30 La secuencia codificante de la proteína CP77 ha sido sintetizada por GeneArt GmbH (Alemania) mediante la recreación (retrotraducción o traducción inversa) de la secuencia de ADN desde el aminoácido de CP77 codificado por el ORF 025L de la cepa Brighton Red de virus de la viruela vacuna UniProtKB/Swiss-Prot: P12932.1, y el codón se optimizó para la expresión en células de mamífero (CHO). Ver la SEC ID n° 1 para la secuencia de nucleótidos de codones optimizados para la expresión de la secuencia codificante de la proteína CP77.

35 La secuencia codificante de la proteína CP77 de codones optimizados de pPH51 (un plásmido de clonación que aloja la secuencia codificante de la proteína CP77 de codones optimizados) se amplificó por PCR utilizando cebadores de PCR en los que se diseñó el cebador 5' para añadir una secuencia de Kozak en proximidad al codón de inicio y el cebador 3' se diseñó para añadir la secuencia de etiqueta Flag antes del codón de parada. El producto de PCR amplificado se subclonó en el vector del transposón piggybac pJ507-2 (Hyg+) obtenido de DNA2.0 Inc. (USA) mediante el sitio de clonación Bsal. La clonación en Bsal sustituye eficazmente la secuencia codificante de GFP cometa con la secuencia codificante de la proteína CP77, creando pLL07. A continuación, CP77 queda bajo el control del promotor constitutivo humano factor 1-alfa de alargamiento (EF1a, por sus siglas en inglés) y se coexpresa con el gen de resistencia a higromicina después de integrarse establemente ambos en el genoma de las células transfectadas.

45 Transducción de CHO por inserción estable ayudada por transposón de los casetes de expresión de CP77 y resistencia a higromicina: Se sembraron células CHO en los pocillos de una placa de 6 pocillos de manera que tras la incubación durante la noche alcanzarán una confluencia de 50%. Utilizando el reactivo de transfección Effectene de Qiagen, se transfectó 1 µg de pLL07 en 1 pocillo de células CHO confluyentes al 50% siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las células transfectadas se incubaron durante la noche en medio de crecimiento. Al día siguiente, se cambió el medio por medio de crecimiento que contenía 500 µg/ml de higromicina B para la selección de las células transducidas. Se cambió el medio de selección cada 2-3 días y al multiplicarse el crecimiento de las células transducidas, se recuperaron utilizando TrypLE Select (Life Technologies) y se sembraron en un matraz T25 para la expansión celular adicional.

Verificación de la expresión de CP77 mediante transferencia western (etiquetado con Flag)

60 Cultivo de sueros de conejo anti-CP77: Se inyectó en conejos un péptido de 15 aminoácidos ligado a proteína KHL que representaba una secuencia de aminoácidos interna corta de la proteína CP77. Dicha secuencia de aminoácidos era: SGSDVNIRSNNGYTC - posiciones aminoácidas 481 a 495 de UniProtKBSwiss-Prot P12932.1 [proteína CP77 025LBR] SEC ID n° 2.

65 Se llevó a cabo un total de tres inyecciones, separadas por 1 mes, para generar anticuerpos contra dicha secuencia de aminoácidos conjugada con KLH. Se sometió a ensayo sangre procedente del conejo inyectado, mediante transferencia western frente a proteína CP77 etiquetada con His N-terminal purificada con Ni-NTA y expresada en bacterias. Se demostró que el suero de conejo anti-CP77 reconocía claramente la proteína CP77 recombinante.

Ensayo para la expresión de CP77 por p-LL07-CHO: Se sembraron dos matraces T25 con CHO y p-LL07-CHO y se cultivaron hasta que las monocapas celulares en cada matraz alcanzasen el 100% de confluencia. Se recolectaron las células de cada matraz y se lavaron con PBS y después se resuspendieron en 200 µl. A lo anterior, se añadieron 50 µl de 5X tampón de carga de SDS-PAGE a cada tubo de células resuspendidas y después se incubó a 98°C durante 5 min. Se cargaron 15 µl de cada extracto de proteínas celulares en dos geles de SDS-PAGE al 10%, se sometieron a electroforesis y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL mediante electrotransferencia.

A continuación, las membranas electrotransferidas se trataron con leche en polvo desnatada al 5% disuelta en Tween 20 que contenía solución salina tampón Tris (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear todos los sitios de unión a anticuerpo no específicos disponibles sobre la membrana. A continuación, las membranas se lavaron varias veces en TBST antes de sondear con anticuerpos. La membrana 1 se sondeó con una dilución 1:5.000 de anticuerpo anti-etiqueta DDDDK [M2] conjugada con HRP (ab49763, Sapphire Bioscience) durante la noche a 4°C. Se sondeó la membrana 2 con una dilución 1:100 de antisueros anti-CP77 durante la noche a 4°C, se lavó 3 veces con TBST y después se sondeó con anticuerpo secundario, dilución 1:5.000 de anticuerpo anticonejo conjugado con HRP (GE Healthcare) durante 2 horas. A continuación, se lavaron ambas membranas 3 veces en TBST y se trataron con reactivos de detección de transferencia western ECL (GE Healthcare) y se expusieron a película de rayos X siguiendo las instrucciones en el manual del usuario.

Ensayo de placas en CHO y p-LL7-CHO: Se sembraron células CHO y p-LL7-CHO en múltiples placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta que las monocapas celulares eran confluyentes al 100%.

Para infectar las células se utilizó un virus Vaccinia recombinante (cepa Copenhagen) que alojaba un casete de expresión de EGFP (proteína fluorescente verde) bajo el control de un promotor temprano/tardío de virus Vaccinia (SCV401C). Debido a que el título de SCV401C era desconocido, en primer lugar, se diluyeron 10 µl del stock vírico en 1 ml de medio MM (Dil. 1: 1:100) y después se infectó cada pocillo con 500 µl del diluyente vírico. El día 1 postinfección, se observó una infección de elevada m.o.i. en la que la mayoría de células mostraban fluorescencia verde. Se decidió llevar a cabo una dilución 1:20 adicional de Dil. 1 mediante la adición de 100 µl de Dil. 1 en 2 ml de medio MM (Dil. 2). A continuación, se utilizó lo anterior para infectar cada pocillo con 500 µl de Dil. 2.

Las infecciones víricas se observaron bajo el microscopio fluorescente (Olympus IX51) con filtro de GFP (nº de cat. U-MGFPHQ, Olympus). La imagen se capturó utilizando el software de imágenes digitales cellSens (Olympus).

Se observó a partir de los resultados que VACV-COP expresante de proteína fluorescente verde (SCV401C) no se propaga en células CHO tal como se esperaba. Las células individuales fluorescentes verdes son el resultado de la entrada del virus en la célula, la expresión del gen que incluye EGFP pero que es incapaz de producir nuevas partículas víricas infecciosas y, por lo tanto, incapaz de extender la infección a las células vecinas. Sin embargo, en una línea celular CHO que expresa CP77, el virus Vaccinia es capaz de producir nuevos virus infecciosos que se extienden a las células vecinas formando focos de infección el día 1 postinfección. Dichos focos de infección se convierten en una infección confluyente en los siguientes dos días después de la infección, en donde alcanzado el día 3, la entera monocapa celular se encuentra infectada por SCV401C. Las células CHO que expresan la proteína de espectros de huéspedes, CP77, son permisivas de las infecciones por virus Vaccinia al contrario que las células CHO parentales (nativas).

HMG20A pertenece a una familia de proteínas que contiene el dominio de caja HMG. Las proteínas HMG son proteínas remodeladoras de cromosomas que reconocen estructuras de ADN distorsionadas, tales como los cruciformes. También pueden inducir el doblado del ADN mediante la unión al surco menor del ADN. Por lo tanto, las proteínas que contienen caja HMG se consideran importantes para el remodelado de los cromosomas durante la replicación, recombinación o reparación del ADN. Además, determinadas proteínas que contienen caja HMG pueden afectar a la transcripción génica mediante la interacción con factores de transcripción en el sitio de promotor.

El trabajo publicado por Hsiao et al., 2006, ha demostrado que CP77 se une a HMG20A en las células CHO-K1. Dicha proteína de la célula huésped, HMG20A, aparentemente se une al ADN vírico en las fábricas víricas de las células CHO infectadas por Vaccinia y se ha planteado que dicha proteína de la célula huésped "bloquea" el ADN en las fábricas víricas y evita de esta manera el siguiente estadio del ciclo vital de Vaccinia, evitando de esta manera la producción de progenie vírica infecciosa. La expresión de CP77 por el virus de la viruela vacuna aparentemente elimina HMG20A del huésped del ADN vírico y permite que el ciclo vital vírico se reinicie, con la producción eventual de partículas víricas de progenie infecciosa.

Sin embargo, con la expresión de CP77 en CHO en ausencia de una infección vírica, se esperaría que dicha proteína secuestrase el HMG20A recién sintetizado presente en el citoplasma antes de translocarse al núcleo. En caso de ser así, se perdería la función de HMG20A en el núcleo y, debido a que desempeña un papel crucial durante la replicación, recombinación y reparación del ADN más su función durante la transcripción génica, se esperaría que la expresión de CP77 perjudicaría la integridad de las células CHO durante la multiplicación y mantenimiento celulares. Lo anterior inesperadamente no ocurre, ya que la línea celular CHO que expresa CP77 se

mantuvo fácilmente como cultivo continuo sin efectos observables sobre su capacidad de replicación durante muchas generaciones en comparación con la línea celular CHO parental.

EJEMPLO 4

5

Estudios multietapa de crecimiento

El estudio cinético multietapa de crecimiento se llevó a cabo en p-LL07-CHO: Se evaluó la naturaleza permisiva de la línea celular CHO expresante del gen de espectro de huéspedes CP77 frente a la infección por virus Vaccinia y se comparó el nivel de producción vírica con los niveles de producción alcanzados en una línea celular humana naturalmente permisiva - 143B.

10

El objetivo era comparar la característica de propagación de VACV-COP en las líneas celulares p-LL07-CHO, CHO y 143B. En el presente estudio, se sometió a ensayo la funcionalidad de CP77 expresado por p-LL07-CHO mediante el examen de la característica de amplificación de VACV-COP dentro de dicha línea celular en comparación con su característica de amplificación en células CHO (no permisivas) y 143B (permisivas).

15

Materiales y métodos:

Organización de las líneas celulares

20

Configuración de CHO: se sembró una placa de 6 pocillos (6WP) con células CHO y se cultivó hasta la confluencia en medio de crecimiento (RPMI+FBS al 10%).

Configuración de 143B: se sembró una placa de 6 pocillos (6WP) con células 143B y se cultivó hasta la confluencia en medio de crecimiento (RPMI+FBS al 10%).

25

Configuración de p-LL07-CHO: se sembró una placa de 6 pocillos (6WP) con células p-LL07-CHO y se cultivó hasta la confluencia en medio de crecimiento (RPMI+FBS al 10%+500 µg/ml de higromicina B).

30

Dilución de VACV-COP: cada pocillo de cada 6WP se infectó con 0,01 ufp en un volumen total de 500 µl. Se fijó el recuento celular por pocillo a una confluencia de 100% en 4×10^5 células. Para una tasa de infección de 0,01 ufp/pocillo, resultaron necesarios 4×10^4 ufp por pocillo de manera que se diluyó el stock de virus a 8×10^4 ufp/ml en medio de mantenimiento (RPMI/FBS al 2%).

35

Infecciones: se eliminó el medio de cultivo de cada pocillo de cada placa, en la que se añadieron 500 µl de virus diluido y se dejó bajo incubación a temperatura ambiente durante 1 h para que las células adsorban el virus. A continuación, se extrajo el inóculo vírico y cada pocillo infectado se lavó una vez con 1 ml de PBS estéril y después se incubó en 2 ml de MM por pocillo a 37°C/5% de CO₂.

40

Recolección: se recolectaron dos juegos de pocillos de cada placa en los tiempos siguientes después de la infección: 24 h, 48 h y 72 h. El día de la recolección, se rasparon las células introduciéndolas en el medio de cultivo en el que se agruparon dos juegos de pocillos de cada línea celular y las células se pelletizaron mediante centrifugación a 1.000xg durante 5 min. Se resuspendió cada pellet celular en 1 ml de TrisHCl 10 mM, pH 8. A continuación, el pellet celular resuspendido se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación y se almacenó a -80°C hasta el momento de la titulación.

45

Las titulaciones se llevaron a cabo en células Vero y 143B cultivadas hasta el 100% de confluencia en placas de 24 pocillos.

50

Diluciones: los extractos víricos se sacaron del congelador, se descongelaron y se sonicaron para homogeneizar cualesquiera agregados visibles. Los extractos víricos se diluyeron en serie hasta 10^{-8} en medio de mantenimiento.

Infecciones: se extrajo el medio de cultivo de cada pocillo y se infectó con 1 ml de cada dilución (4 pocillos por dilución, una placa para cada virus, partiendo de la dilución 10^{-2}) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se transfirió cada placa al incubador y se incubó a 37°C/5% de CO₂ durante 3 días para el desarrollo de las placas.

55

Cálculo de los títulos: dilución que contenía 20 a 50 placas; se realizó el recuento de las placas y después se calculó la media. Dichos recuentos medios se multiplicaron por el recíproco de la dilución y debido a que se utilizó 1 ml para la infección, el número resultante es el título en ufp/ml.

60

Cálculo de los errores estándar: se calculó el error estándar (ES) con una confianza del 95% a partir de los 4 valores de titulación que constituían la media, utilizando la fórmula a continuación: $1,95 \times (SD/\sqrt{n})$, en la que: SD es la desviación estándar de una muestra pequeña; n es el número de réplicas de titulación (4 en el presente caso).

65

Cálculo de rendimientos: es la cantidad total de virus en el extracto vírico que se titula: Titulación media (ufp/ml) X Volumen total de extracto vírico = ufp.

5 Cálculo de la proporción de amplificación: este número representa el factor de amplificación respecto a la cantidad utilizada como inóculo: Rendimiento en ufp/tamaño de inóculo en ufp.

10 Se llevaron a cabo estudios multietapa de cinética del crecimiento en placas de 6 pocillos - dos pocillos por cada línea celular y punto temporal. Se infectó cada pocillo con 4×10^4 ufp de VACV-COP y para la recolección, se recolectaron y agruparon 2 pocillos de cada línea celular y punto temporal y se preparó un extracto vírico a partir de cada agrupado. El extracto vírico, volumen total 1 ml, que representa 2 infecciones agrupadas resultantes de un tamaño de inóculo de 8×10^4 ufp (4×10^4 ufp X 2), seguidamente se tituló. La titulación se llevó a cabo utilizando dos líneas celulares indicadoras, 143B y Vero.

15 Los resultados de titulación y rendimiento vírico se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. VACV-COP no se amplificó en las células CHO no permisivas, es decir, produjo menos virus que la cantidad utilizada en el inóculo de entrada. Sin embargo, la amplificación vírica en la línea celular CHO que expresa el gen de espectro de huéspedes CP77 era aproximadamente 2.000 veces superior al del inóculo de entrada (basado en los resultados de titulación con células 143B como línea celular indicadora). La amplificación a partir de la célula permisiva fue aproximadamente 3.000 veces superior que en el inóculo de entrada. Debido a que los errores estándar se solapan, la diferencia de amplificación entre las células p-LL07-CHO y 143B no estadísticamente significativa.

20 Al comparar la amplificación vírica en las dos líneas celulares utilizando los resultados de titulación de las células indicadoras Vero, aparentemente la amplificación resultó marginalmente superior en las células p-LL07-CHO que en las células 143B; sin embargo, este resultado no era estadísticamente significativo.

25 En el presente estudio se confirmó adicionalmente que el virus Vaccinia no era permisivo en las células CHO, ya que el nivel de producción vírica era muy inferior que la cantidad de virus utilizada como inóculo. Sin embargo, en el caso de que CHO exprese el gen de espectro de huéspedes del virus de la viruela vacuna codificante de la proteína CP77, la célula se vuelve permisiva al virus Vaccinia y proporciona soporte a la producción de virus a los mismos niveles observados en una línea celular permisiva. Además, cabe destacar que sólo se requiere la expresión de un gen de espectro de huéspedes, CP77, para convertir dicha línea celular en un sustrato celular permisivo "utilizable" para la producción de Vaccinia. La producción de Vaccinia a partir de CHO resulta muy deseable ya que CHO es una línea celular de fácil uso biotecnológico en el aspecto de que crece tan rápido como las bacterias, puede cultivarse en medio de cultivo sintético definido sin el requisito de aditivos biológicos tales como el suero de feto bovino y puede cultivarse en forma de suspensión celular en un biorreactor. CHO también presenta una historia de producción de productos medicinales biológicos; ha sido bien caracterizada y es conocida y apreciada por las agencias de control biomédico tales como la FDA y EMEA.

40 Una línea celular CHO transgénica que expresa la proteína CP77 bajo el control de un promotor celular constitutivo es permisiva a la replicación y propagación del virus Vaccinia a los mismos niveles observados en una línea celular naturalmente permisiva que rinde niveles elevados de progenie vírica.

EJEMPLO 5

45 Propagación del VMA en células CHO-CP77

Propagación de VMA+GFP en CHO, 143B y p-LL07-CHO

Materiales y métodos:

50 Medio de crecimiento (MC): RPMI-1640, complementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina y gentamicina, Hepes

55 Medio de mantenimiento (MM): RPMI-1640, complementado con FBS al 2%, L-glutamina 2 mM, penicilina y gentamicina, Hepes

60 Observaciones sobre el cultivo de p-LL07-CHO: la propagación general y mantenimiento de la línea celular p-LL07-CHO se llevó a cabo en MC más 500 µg/ml de higromicina-B aunque, sin embargo, para la siembra y cultivo en placa hasta el 100% de confluencia antes de la infección, las células se cultivaron en MC sin higromicina-B.

65 Organización de las células: las células 143B, CHO y P-LL07-CHO se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo (MC) a 37°C/5% de CO₂ hasta que las monocapas celulares alcanzaron el 100% de confluencia. Se cultivó una placa por línea celular.

Infección

• Se utilizó un VMA recombinante que alojaba un casete de expresión de GFP (proteína fluorescente verde) para infectar las células cultivadas en placas de 6 pocillos. Debido a que el título de VMA-GFP era desconocido, el virus se diluyó en serie en medio de mantenimiento (MM) de la manera siguiente:

- Dil 1: 20 µl del stock de virus se diluyó en 2 ml de medio MM (dilución 1:100) y se mezcló mediante agitación vigorosa con vórtex.
- Dil 2: Se añadieron 500 µl de Dil. 1 a 4,5 ml de MM (dilución 1:10³) y se mezclaron mediante agitación vigorosa con vórtex.
- Dil 3: se añadieron 500 µl de Dil. 2 a 4,5 ml de MM (dilución 1:10⁴) y se mezclaron mediante agitación vigorosa con vórtex.
- Dil 4: Se añadieron 500 µl de Dil. 3 a 4,5 ml de MM (dilución 1:10⁵) y se mezclaron mediante agitación vigorosa con vórtex.

- Se infectó un pocillo de cada placa con 500 µl de las diluciones de virus siguientes: Dil. 2, Dil. 3 y Dil. 4.
- Se incubó cada placa durante un periodo de 5 días y se examinó para el desarrollo y extensión de los focos de células fluorescentes. En el presente estudio, la Dil. 4 produjo focos discernibles de células fluorescentes a lo largo de un periodo de tres días. Los pocillos no infectados de cada placa eran controles de la autofluorescencia.

Observación bajo el microscopio

Se observó la infección vírica bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus 1X51) con filtro de GFP (nº de cat. U-MGFPHQ, Olympus). Se capturó la imagen utilizando software de imágenes digitales cellSens (Olympus).

Resultados

Los resultados demostraron que el VMA que expresaba proteína fluorescente verde (GFP) no se propaga en células CHO y 143B tal como se esperaba. Las células individuales fluorescentes verdes son el resultado de la entrada del virus en la célula, la expresión del gen que incluye GFP pero que es incapaz de producir nuevas partículas víricas infecciosas y, por lo tanto, incapaz de extender la infección a las células vecinas. Sin embargo, en una línea celular que expresa CP77, el VMA es capaz de producir nuevos virus infecciosos que se extienden a las células vecinas formando focos de infección el día 1 después de la infección, alcanzando un desarrollo adicional el día 3.

EJEMPLO 6

Confirmación de la restricción de espectro de huéspedes del VMA recolectado de la infección de p-LL07-CHO

Organización de las células

Se sembraron células 143B, CHO y BHK-21 en múltiples placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo (MC) a 37°C/5% de CO₂ hasta que las monocapas celulares alcanzaron el 100% de confluencia. Se cultivó una placa por línea celular.

Recolección de virus del Ejemplo 5

El VMA+GFP del pocillo infectado por P-LL07-CHO Dil. 3 en el Ejemplo 5 se recolectó tras 5 días de infección del modo siguiente:

- Tanto sobrenadante como células se recolectaron del pocillo y se centrifugaron durante 5 min a 1.000xg para pelletizar las células infectadas.
- Se resuspendió el pellet celular en 500 µl de tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 8.
- El pellet celular resuspendido se congeló y descongeló por lo menos tres veces para liberar los virus de las células infectadas.

Infección

• Debido al título desconocido del extracto vírico en bruto, el virus se diluyó en serie en medio MM del mismo modo que en el Ejemplo 5.

- Se infectó un pocillo de cada placa con 500 µl de las diluciones de virus siguientes: Dil. 2, Dil. 3 y Dil. 4.
- Se incubó cada placa durante un periodo de 5 días y se examinó para el desarrollo y extensión de los focos de células fluorescentes. En el presente experimento, la Dil. 3 produjo focos discernibles de células fluorescentes a lo largo de un periodo de tres días.

Observación bajo el microscopio

Se observó la infección vírica bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) con filtro de GFP (nº de cat. U-MGFPHQ, Olympus). Se capturó la imagen utilizando software de imágenes digitales CellSens (Olympus).

Resultados

El VMA recolectado a partir de la línea celular CHO que expresaba CP77 todavía mantenía su espectro de huéspedes restringido, no siendo capaz de propagarse en las líneas celulares no permisivas CHO (hámster) y 143B (humana). La falta de focos fluorescentes verdes durante el periodo de tres días postinfección de las células CHO y 143B demuestra que no se produjo progenie vírica infecciosa en estas líneas celulares. Sin embargo, dicho VMA todavía mantenía su espectro de huéspedes para las células BHK21 (hámster) ya que pudieron observarse focos fluorescentes verdes de infección el día 1 después de la infección que crecieron en tamaño durante los 3 días siguientes.

Conclusiones

- Las células CHO que expresan la proteína de espectro de huéspedes CP77 son permisivas a las infecciones por VMA, al contrario que las células CHO parentales (nativas).
- El VMA propagado en una línea celular CHO que expresaba CP77 no incrementó su espectro de huéspedes a líneas celulares no permisivas tales como CHO y 143B (humana).

EJEMPLO 7

Construcción de pLL07

Información de antecedentes: El producto de PCR CP77 (CHO, de codones optimizados) CDS del molde de ADN pPH51 se clonó en el sistema PiggyBac pJ507-2 (Hyg+) mediante el sistema de clonación InFusion de Clontech para crear pLL07. La secuencia de CP77 etiquetada con Flag se insertó en Bsal de pJ507-2, eliminando de esta manera la secuencia cometa de GFP (SEC ID nº 3).

Pareja de cebadores de PCR utilizada para amplificar por PCR el gen CP77-CHO a partir del ADN del plásmido pPH51.

AACACGTCTCGGGGgcccgccaccATGTTTCGACTACCTGGAAAATGAGGAAGTG (SEC ID nº 4) y
 CAGGAAGACGCTTTTtca**CTTGTCATCGTCATCCTTGTAA**TCTGCTGCTCGAA GATCTTGACT (SEC ID nº 5). Se muestra la secuencia de etiqueta Flag en negrita en el cebador Inf-LL07-CPP7-Rv.

La configuración de INSERCIÓN/CASETE de plásmido era la siguiente: Se envió para la secuenciación Inserción/Casete Map.pLL7 clon nº 3.

Se introdujeron 15 ficheros de secuenciación ABI junto con el fichero de referencia de pLL07 "pLL07_ref.sbd" en el programa informático DNASTar Seqman de Lasergene y se ensamblaron en 1 cóntigo de consenso. Las secuencias de alineación se recortaron para que correspondiesen con el inicio y final de la secuencia de referencia; después se deletó la secuencia de referencia de la alineación para que no presentase influencia sobre el establecimiento de la secuencia de consenso. Se guardó la secuencia de consenso del cóntigo en forma de un fichero de secuencia de ADN con el nombre "pLL07_#3 consensus.seq". La dirección de lectura del cóntigo se determinó y encontró que representaba la misma dirección de lectura que la secuencia de referencia. Utilizando Megalign (DNASTar) se alineó manualmente "pLL07_#3 consensus" a la secuencia de referencia "pLL07_ref.sbd" para ayudar a identificar las discrepancias entre la secuencia de referencia y la secuencia en pLL07_#3. El ensamblaje de los ficheros 15AB1 para pLL07 clon nº 3 del AGRF-sequencing service utilizando Seqman (parámetros por defecto) resultó en un cóntigo de consenso que cubría la longitud completa de la secuencia de referencia pLL07insertion. No se observó discrepancia entre la secuencia en pLL07_#3 y la secuencia de referencia. Las secuencias insertadas en el cóntigo de consenso pLL07_#3 eran idénticas a la secuencia de referencia.

EJEMPLO 8

Expresión de G1L e I7L en células de mamífero

Se construyeron plásmidos de expresión codificantes de G1L etiquetado con Flag e I7L etiquetado con Flag y se utilizaron para generar líneas celulares 143B transgénicas que expresaban dichas proteínas. Aunque dichas células habían sido amplificadas en presencia de genética para seleccionar positivamente las células transducidas y el análisis de PCR había confirmado la presencia de dichas secuencias codificantes de proteína dentro de los genomas de dichas líneas celulares, el análisis de transferencia western no consiguió detectar la presencia de proteínas etiquetadas con Flag expresadas al sondear con un anticuerpo anti-DDDK.

Las secuencias codificantes de proteína de COP-G1L y COP-I7L etiquetados con Flag C-terminales fueron sintetizadas por GeneArt (Life Technologies) y subclonadas en el sitio BsaI de pJ503-2 (selección de piggyBac-antibiótico neomicina) obtenido de DNA2.0 Inc. (USA). Dicho procedimiento de clonación intercambia GFP cometa por las secuencias codificantes de proteína G1L o I7L etiquetada con Flag. Los clones resultantes se denominaron pLL08 para el vector piggyBac de G1L y pLL10 para el vector piggyBac de I7L.

Las características principales de dichos dos vectores plásmido son: las secuencias codificantes de proteína etiquetadas con Flag se encuentran bajo el control del promotor humano constitutivo E1Falfa; dicho casete de expresión junto con el casete de expresión NPT II (gen de resistencia a neomicina) se encuentran flanqueados por límites de transposón izquierdo y derecho formando un elemento transposón artificial. Externo al elemento transposón artificial aunque contenido dentro del mismo plásmido se encuentra el casete de expresión del enzima transposón que media en la integración irreversible del elemento transposón en el genoma del huésped. Las células portadoras de dichos elementos transposón pueden seleccionarse positivamente mediante la inclusión de G418 (geneticina) en el medio de cultivo celular.

El vector plásmido pLL08 (G1L etiquetado con Flag) y pLL10 (I7L etiquetado con Flag) se transfectaron en células 143B para crear dos líneas celulares transgénicas transducidas: G1L-143B (que contenía el casete de expresión de G1L) e I7L-143B (que contenía el casete de expresión de I7L). Las células con integración con éxito del transposón se amplificaron hasta cantidades trabajables mediante la inclusión de geneticina en el medio de cultivo. Con el fin de verificar que se había producido la integración con éxito, se extrajo el ADN celular total de dichas células transgénicas utilizando el kit de extracción de ADN DNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones en el manual del kit. A continuación, se utilizó el ADN extraído como molde para las reacciones de amplificación de PCR utilizando parejas de cebadores de PCR específicas para la amplificación por PCR de G1L e I7L. Ambas líneas celulares eran positivas para la presencia de secuencias de ADN de G1L e I7L en sus genomas.

Con el fin de someter a ensayo la expresión de G1L e I7L por dichas líneas celulares, se llevó a cabo un análisis de transferencia western mediante la detección de la presencia de cada proteína etiquetada con Flag utilizando un anticuerpo anti-etiqueta Flag [M2] conjugado con HRP (anticuerpo anti-DDDDK, Abcam nº ab49763). Los resultados de dichos análisis de transferencia western utilizando proteínas totales extraídas de las líneas celulares G1L-143B e I7L-143B mostraron que el anticuerpo anti-etiqueta Flag no reconocía ninguna proteína extraída de 143B tal como se esperaba y que si podía reconocer una proteína etiqueta Flag expresada en una línea celular CHO transgénica para CP77-etiqueta Flag (CP77-CHO), confirmando que el anticuerpo anti-etiqueta Flag puede reconocer las proteínas etiquetadas con Flag. Sin embargo, no pudo detectarse ninguna proteína G1L-etiqueta Flag en el extracto de proteínas procedente de la muestra G1L-143B. La proteína I7L-etiqueta Flag de expresión bacteriana puede detectarse mediante el anticuerpo anti-etiqueta Flag pero el anticuerpo no pudo detectar la expresión de I7L-etiqueta Flag por la línea celular 17L-143B.

Debido a que los casetes de expresión de G1L e I7L pudieron detectarse en su línea celular respectiva, las conclusiones podrían ser que las proteínas expresadas son rápidamente degradadas tras la síntesis en ausencia de una infección por Vaccinia, es decir, tanto la proteína G1 como I7 son enzimas específicamente víricas y podrían ser inestables sin sus sustratos enzimáticos específicos de Vaccinia o el promotor que controla dichos dos casetes de expresión es defectivo. Otra hipótesis es que la expresión de dichas proteínas en ausencia de una infección por Vaccinia resulta "tóxica" para las células y durante el procedimiento de selección con geneticina, en las células en las que se habían silenciado los casetes de expresión transgénicos G1L e I7L pero no el casete de expresión NPT II posibilitaba la amplificación de las células resistentes a geneticina que no expresaban las proteínas G1L o I7L. Debido a que el plásmido pJ503-2 piggyBac ha sido utilizado con éxito en el laboratorio de los presentes inventores para la expresión de COP-D13I en células 143B, se propone que el promotor EF1alfa es funcional y que dichas proteínas son inestables en ausencia de una infección por Vaccinia o que el promotor que regula la expresión de dichas proteínas ha sido silenciado selectivamente, evitando la represión de proteínas "tóxicas" durante la amplificación celular en presencia de geneticina.

EJEMPLO 9

D13L es un ejemplo de una proteína de maduración o ensamblaje estructural esencial expresada por las células de mamífero y que rescata Vaccinia con la delección del gen D13L y Vaccinia con delección de D13L expresa la proteína en las células infectadas

Construcción de línea celular de rescate de D13: a título de ejemplo de atenuación de Vaccinia mediante el bloqueo del proceso de ensamblaje/maduración, el ORF de D13L de la cepa Copenhagen fue la diana para la delección. De esta manera, en primer lugar, debe construirse una línea celular que expresa dicha proteína de manera que pueda propagarse un virus con delección de COP-D13L. Para la construcción de la línea celular rescatada, se seleccionó la línea celular de ovario de hamster chino, con frecuencia denominada CHO, ya que esta línea celular se considera 'de fácil uso en biotecnología'. Con el fin de rescatar el virus Vaccinia infeccioso con una delección de COP-D13L, dicha línea celular debe expresar la proteína D13 a partir de su genoma nuclear utilizando la maquinaria de transcripción de la célula y no del virus Vaccinia. La secuencia de aminoácidos en la célula expresaba proteína D13 que contenía una secuencia de aminoácidos etiquetada C-terminal DYKDDDDK (etiqueta Flag, Hopp et al., 1988) y

se encontraba optimizada para los codones en CHO a fin de producir la secuencia de nucleótidos correspondiente. La integración estable de dicho casete de expresión de codones optimizados de D13L-CHO etiquetado consistente en un promotor de mamífero y una secuencia de señal de poliadenilación de mamífero en el ADN nuclear se llevó a cabo mediante tecnología de integración de transposón del tipo informado por Urschitz et al. (2010) y Matasci et al. (2011). La transducción de CHO se llevó a cabo mediante la utilización del sistema de vector piggyBac obtenido de DNA2.0 Inc. (USA).

Construcción de secuencia codificante de la proteína D13L: la secuencia codificante de la proteína D13L fue generada mediante síntesis por GeneArt of Life Technologies mediante la recreación de la secuencia de ADN de aminoácidos de D13 codificada por ORF de D13L de la cepa Copenhagen del virus Vaccinia y de codones optimizados para la expresión en células CHO. La secuencia codificante de la proteína del ORF de D13L en VACV-COP se muestra en el Listado de secuencias.

Construcción de vector de transducción celular de D13L: la secuencia codificante de la proteína D13 de codones optimizados (D13LchoTagged) de pLL17 se amplificó por PCR y se subclonó en el vector transposón piggyBac pJ503-2 (vector de expresión de mamífero piggyBac pHULK con CometGFP y Neo⁺) obtenido de DNA2.0 Inc. (nº de cat. pJ503-2) mediante los sitios de clonación Bsal para producir pLL19. La clonación entre Bsal mediante clonación In-Fusion (Clontech: clonación sin ligasas) elimina la secuencia codificante de GFP cometa y la sustituye por la secuencia codificante de proteína D13 etiquetada mediante recombinación homóloga in vitro. La secuencia codificante de la proteína D13LchoEtiquetada se encuentra ahora bajo el control del promotor humano factor 1-alfa de alargamiento (EF1a) y se coexpresará con el gen de resistencia a neomicina una vez ambos se hayan integrado establemente en el genoma de las células transfectadas. La integración estable en el genoma del huésped se encuentra mediada por la integración mediante transposón de la secuencia de ADN unida por los límites izquierdo y derecho del transposón del vector piggyBac.

La amplificación por PCR de la secuencia D13LchoTagged se llevó a cabo utilizando la pareja de cebadores siguiente:

Secuencia de cebador directo:

Inf-LL19-D13LC-Fw: 5'-**AACACGTCTCGGGGgcccgcacc**ATGAACAACACCATCATCAA-3'

La secuencia en mayúscula, negrita y subrayada representa la secuencia homóloga al sitio Bsal cadena arriba de GFP cometa en pJ503-2 (Neo⁺) necesaria para la clonación In-fusion. La secuencia en minúscula, rojo y subrayada es una secuencia de Kozak modificada. La secuencia en mayúscula y fuente normal es homóloga al extremo 5' de la secuencia de D13LchoTagged en pLL17.

Secuencia de cebador inverso:

Inf-LL19-D13LC-Rv: 5'-**CAGGAAGACGCTTTTT**CACTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG- 3'

La secuencia en mayúscula, negrita y subrayada representa la secuencia homóloga al sitio Bsal cadena abajo de GFP cometa en pJ503-2 (Neo⁺) necesaria para la clonación In-fusion. La secuencia en mayúscula y fuente normal es homóloga al extremo 3' de la secuencia de D13LchoTagged en pLL17. El producto de PCR de 1.719 pb esperado se clonó en pJ503-2 cortado con Bsal (Neo⁺), mediante clonación InFusion (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante a fin de crear pLL19.

Construcción de una línea celular CHO que expresa proteína D13: se sembraron células CHO pLL19-CHO en pocillos de una placa de 6 pocillos de manera que tras la incubación durante la noche presentasen una confluencia de aproximadamente el 50%. Utilizando el reactivo de transfección Effectene de Qiagen (nº de cat. 301425), se transfectó 1 µg de pLL19 en 1 pocillo de células CHO confluyentes al 50% siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las células transfectadas se incubaron durante la noche en medio de cultivo (RPMI 1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep). Al día siguiente, se cambió el medio por medio de cultivo que contenía 1.000 µg/ml de geneticina para la selección de las células transducidas. El medio de selección se cambió cada 2 a 3 días. Al crecer las células transducidas a 90-100% de confluencia, se recuperaron utilizando TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp., nº de cat. 12563-029) y se sembraron en un matraz T25 para la expansión celular adicional.

Verificación de la expresión de D13 mediante transferencia western - producción de antisuero anti-D13 de conejo En conejos se inyectó un péptido de 16 aminoácidos unido a proteína KLH que representaba el aminoácido C-terminal de la proteína D13 nativa. Dicha secuencia de aminoácidos era: CYDQGVSTKIMGDNN. Se llevó a cabo un total de tres inyecciones, separadas por 1 mes, para generar anticuerpos contra dicha secuencia de aminoácidos. Se sometió a ensayo el suero del conejo inyectado, mediante análisis de transferencia western frente a los extractos celulares siguientes: extracto de células 143B completas, extracto completo de la línea celular transgénica 143B que expresaba D13L etiquetado con Flag (p-LL06-143b) y extracto de células 143B infectadas por VACV-COP. Los resultados demuestran claramente que el suero anti-D13 de conejo puede reconocer claramente de manera específica la proteína D13.

Preparación de células CHO transducidas - se cultivó la línea celular expandida policlonal CHO transducida con D13LchoTagged (p-LL19-CHO) hasta el 100% de confluencia en un matraz T25, al igual que células CHO normales. Se recolectaron las células de cada matraz con TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp., nº de cat. 12563-029), se peletizaron mediante centrifugación a baja velocidad (300xg durante 5 minutos), se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 µl de PBS.

Análisis de transferencia western - se añadieron 50 µl de 5x tampón de carga de SDS-PAGE a cada suspensión celular y después se incubaron a 98°C durante 5 min. Se cargaron 15 µl de cada extracto de proteínas celulares en dos geles SDS-PAGE al 10%, se sometieron a electroforesis y después se transfirieron a nitrocelulosa Hybond ECL mediante electrotransferencia. A continuación, las membranas electrotransferidas se trataron con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en tampón Tween-20 que contenía solución salina Tris (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente a fin de bloquear todos los sitios de unión a anticuerpo no específicos disponibles sobre la membrana. Las membranas se lavaron varias veces en TBST antes de sondearlas con anticuerpos. La membrana 1 se sondeó con una dilución 1:5.000 de anticuerpo anti-etiqueta DDDDK [M2] conjugada con HRP (Abcam, nº de cat. ab49763) durante la noche a 4°C. La membrana 2 se sondeó con una dilución 1:2.000 de antisuero de D13 de conejo durante la noche a 4°C, se lavó 3 veces con TBST y después se sondeó con anticuerpo secundario, dilución 1:5.000 de anticuerpo anticonejo conjugado con HRP (Abcam, nº de cat. 96069) durante 2 horas. A continuación, se lavaron ambas membranas 3 veces en TBST y se trataron con reactivos de detección de transferencia western ECL (GE Healthcare) y se expusieron a película de rayos X siguiendo las instrucciones en el manual del usuario.

EJEMPLO 10

Atenuación de VACV-COP mediante delección de ORF de D13L

Para atenuar el virus Vaccinia, la secuencia de promotor tardío conservada junto con la mayoría de la secuencia codificante de proteína del ORF COP-D13L se señaló para la delección mediante recombinación homóloga y en su lugar, se insertó un casete de selección/informador de manera que pudiese seleccionarse la delección con éxito mediante recombinación homóloga en una línea celular CHO expresante de proteína D13 y en la que la infección pudiese visualizarse como fluorescencia roja. El casete de selección/informador consistía en un gen de espectro de huéspedes CHO que expresaba CP77 y la secuencia DsRed-Express2 bajo el control de un promotor de Vaccinia.

Construcción de vector de recombinación homóloga por delección de COP-D13L: para la delección del ORF de D13L de VACV-COP mediante recombinación homóloga, se diseñaron dos brazos de recombinación homóloga flanqueando cada lado del ORF COP-D13L. Sin embargo, debido a que la secuencia de promotor de ORF COP-D12L podría encontrarse próxima al extremo 3' del ORF COP-D13L, se dejaron intactos aproximadamente 200 pb desde el extremo 3' del ORF COP-D13L.

Construcción de brazos de recombinación homóloga F1 y F2: se amplificaron por PCR los brazos de recombinación homóloga del ADN genómico de VACV-COP utilizando las parejas de cebadores mostradas posteriormente. El texto en negrita y subrayado representa los brazos In-Fusion para unir los brazos F1 y F2 al casete de selección/informador y el pUC19 linearizado que se suministra en el kit In-Fusion de Clontech. La ligación In-Fusion resulta en el plásmido circularizado denominado pLL09.

Pareja de cebadores de PCR utilizada para amplificar por PCR el brazo D13L-F1 del ADN de VAC-COP:

Inf-PCR-D13L-F1-Fw: 5'**CGGTACCCGGGGATC**ACGAAAAATAATAGTAACCA -3'. El texto en negrita y subrayado (15 pb) representa la secuencia homóloga respecto al extremo izquierdo del plásmido pUC19 linearizado que se suministra en el kit In-Fusion de ClonTech.

Inf-PCR-D13L-F1-Rv: 5'-**AATTTAGTGTGCGCGT**TGGAAAAAGCTTACAATAAACTC -3'. El texto en negrita y subrayado (15 pb) representa la secuencia homóloga respecto al extremo 5' del casete de selección/informador. Tamaño esperado del producto de PCR: 657 pb

Pareja de cebadores de PCR utilizada para amplificar por PCR el brazo D13L-F2 del ADN de VAC-COP:

Inf-PCR-D13L-Fw: 5'-**ATATTTAAATGCGCGC**CAATAATGGAACAAGAACCCT-3'. El texto en negrita y subrayado (15 pb) representa la secuencia homóloga respecto al extremo 3' del casete de selección/informador.

Inf-PCR-D13L-F2-Rv: 5'-**CGACTCTAGAGGATC**GCGCTGAGGTGGCAACTACG -3'. El texto en negrita y subrayado (15 pb) representa la secuencia homóloga respecto al extremo derecho del plásmido pUC19 linearizado que se suministra en el kit In-Fusion de ClonTech. Tamaño esperado del producto de PCR: 621p

Construcción del casete de selección/informador: el casete de expresión de selección/informador consiste en el gen de espectro de huéspedes de CP77 CHO del ORF del virus de la viruela vacuna 025L (cepa Brighton Red) y la secuencia codificante de la proteína fluorescente roja DsRed-Express2. Dicho casete de expresión fue generado sintéticamente por Life Technologies GeneArt de manera que la secuencia codificante de la proteína CP77 se

encontrase bajo el control de su promotor nativo (100 pb de secuencia cadena arriba del codón de inicio ATG de CP77) y terminase con la secuencia de parada transcripcional temprana del poxvirus (T₅NT). La secuencia codificante de la proteína DsRed se encuentra bajo el control de un promotor temprano/tardío del virus Vaccinia y también termina en la secuencia de parada transcripcional temprana del poxvirus.

5 Ensamblaje de pLL09: los productos de PCR D13L-F1 y D13L-F2 junto con el casete de selección/informador se ensamblaron en pUC19, suministrado en el kit InFusion de ClonTech mediante clonación In-Fusion siguiendo las instrucciones del fabricante para producir pLL09.

10 Delección de COP-D13L mediante recombinación homóloga y purificación de placas para producir SCV104: el ORF COP-D13L se inactivó mediante delección de la mayoría de la secuencia codificante de la proteína y el elemento promotor tardío conservado "TAAAT". El ORF de COP-D13L se encuentra bajo el control de un promotor tardío del virus Vaccinia en el que el elemento promotor tardío conservado resulta crucial para la actividad del promotor (Moss, 2007), la delección del mismo resultará en el silenciamiento del ORF de COP-D13L. La delección de la secuencia
15 codificante de la proteína y el elemento promotor conservado se lleva a cabo mediante recombinación homóloga entre VACV-COP y pLL09, en donde el resultado de la recombinación homóloga es la inserción del casete de expresión CP77/DsRed en la región delecionada. La inserción de dicho casete de expresión permite que el virus recombinante, ahora denominado SCV104, se propague en las células CHO pero sólo en células que expresan una proteína D13 funcional, tal como p-LL19-CHO. Tras la recombinación homóloga se eliminó el virus parental de
20 contaminación 'cruzada' (VACV-COP) mediante rondas sucesivas de purificación de las placas. La presencia de virus parental contaminante se monitorizó mediante análisis de PCR del sitio de inserción.

Recombinación homóloga: se sembraron tres matraces T25 que contienen medio de cultivo (RPMI-1640/FCS al 10%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep y 1.000 µg/ml de geneticina) con p-LL19-CHO y se cultivó hasta el 100% de
25 confluencia a 37°C/5% de CO₂. El día de la infección, se infectaron dos matraces con VACV-COP a una m.o.i. de 0,01 ufp/célula, y el otro matraz no fue infectado (control no infectado). Tras infectar los matraces 1 y 2 durante 45 min a temperatura ambiente, se extrajeron los inóculos de virus y la monocapa de células se lavó dos veces con PBS. Tras el lavado, se añadieron 4 ml de medio de mantenimiento (MM: RPMI-1640/FVS al 2%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep) a cada matraz, incluyendo el matraz 3, que también había pasado por la misma etapa de lavado.

30 Se llevó a cabo la transfección utilizando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, nº de cat. 301425) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 16 µl de intensificador a 2 µg de pLL09 linealizado en 150 µl de tampón EC y se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente tras mezclar intensamente. A lo anterior se añadieron 25 µl de reactivo de transfección Effectene y se dejó en reposo a
35 temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se añadió 1 ml de MM (RPMI-1640/FCS al 2%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep) a la mezcla y se mezcló por completo suavemente. A continuación, dicha mezcla de transfección se añadió al matraz 1 que había sido previamente infectado con VACV-COP.

40 Los matraces 1 (recombinación homóloga), 2 (control de sólo infección) y 3 (control no infectado) se incubaron durante la noche a 37°C/5% de CO₂ y al día siguiente se cambió el medio de cada matraz por MM fresco, 5 ml cada matraz, y se incubó adicionalmente a 37°C/5% de CO₂ hasta observar efectos citopáticos (ECP) macroscópicos en el matraz 1 únicamente. No deberían existir signos de infección en el matraz 2, ya que VACV-COP no es infeccioso para las células CHO y la monocapa debería presentar una apariencia sana en el matraz 3.

45 Tras la infección durante la noche, podían distinguirse claramente células fluorescentes rojas al examen bajo un microscopio de fluorescencia invertido. Se decidió recolectar las células del matraz 1 mediante raspado de las mismas al interior del medio de cultivo, seguido de la peletización mediante centrifugación a baja velocidad (500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente) y resuspensión del pellet celular en 1 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8. Se preparó un extracto vírico mediante múltiples ciclos de congelación y descongelación y después se almacenó a -
50 80°C listo para la etapa de purificación de placas. El constructo vírico se denominó SCV104.

Procedimiento de purificación de placas. El esquema era diluir en serie el extracto de recombinación homóloga y utilizar cada dilución para infectar una fila de células p-LL19-CHO cultivadas en una placa de 48 pocillos. El objetivo era diluir el virus a 1 ufp de infección por pocillo y después buscar los pocillos que contenía únicamente 1 placa
55 fluorescente tras aprox. 30 h de infección antes de la recolección.

Se sembraron células p-LL19-CHO en cada pocillo de una placa de 48 pocillos y se cultivaron hasta el 100% en medio de cultivo (RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep) que contenía 1.000 µg/ml de geneticina a
60 37°C/5% de CO₂.

65 Para la infección, se descongeló el extracto de recombinación homóloga (SCV104) y se sonicó brevemente para romper las masas y agregados. La dilución en serie de diez veces hasta 10⁻⁵ del extracto vírico se llevó a cabo utilizando MM (RPMI/FBS al 2%/Glutamax/PenStrep) en volúmenes de 1 ml. Para cada dilución, se sembró una fila de la placa de 48 pocillos con 500 µl de virus diluido tras eliminar el medio de cultivo de cada pocillo y lavarla una vez con PBS. La placa de 48 pocillos se dejó a temperatura ambiente durante 45 minutos para que se produjese la adsorción vírica. Tras la adsorción vírica, se eliminó cuidadosamente el inóculo vírico de cada pocillo, del que se

eliminó el inóculo residual mediante una etapa de lavado que consistía en 500 µl de PBS por pocillo. Tras el lavado, se añadieron 500 µl de MM (RPMI/FBS al 2%/Glutamax/PenStrep) a cada pocillo y después se incubó a 37°C/CO₂ hasta observar claramente focos fluorescentes rojos bajo un microscopio de fluorescencia.

5 Para la recolección de sólo pocillos que contenían un único foco fluorescente, se seleccionó la dilución más baja posible. Se extrajo cuidadosamente el medio de los pocillos seleccionados y se añadieron 100 µl de TrisHCl 10 mM, pH 8. La placa se congeló-descongeló tres veces y después se recuperó el contenido de los pocillos seleccionados. Para cada placa recuperada se repitió el procedimiento de purificación de placas otras cinco veces.

10 A continuación, un clon seleccionado se amplificó adicionalmente mediante la infección de 1 pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía células p-LL19-CHO a una confluencia de 100% mediante la eliminación del medio de cultivo del pocillo y la adición de 10 µl del extracto vírico diluido a 500 µl en PBS. Tras 45 min a temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de MM al pocillo y se incubaron adicionalmente a 37°C/5% de CO₂ durante 3 días hasta que la mayoría de las células emitía fluorescencia roja observable bajo un microscopio de fluorescencia. Las células en el pocillo infectado se rasparon al medio de cultivo y después se peletizaron a 500xg durante 5 minutos. Las células peletizadas se resuspendieron en 500 µl de TrisHCl 10 mM, pH 8, y se sonicaron brevemente para preparar un extracto vírico.

20 Verificación mediante PCR de la inserción del casete de expresión de CP77/DsRed en el ORF D13L del SCV104. Se llevó a cabo el análisis de PCR para determinar si después de la recombinación homóloga y la purificación de placas, ORF D13L había sido sustituido de hecho por el casete de expresión de CP77/DsRed. Se diseñó una pareja de cebadores de PCR para unirse fuera de la región de los dos brazos flanqueantes de recombinación homóloga de manera que se uniesen a la secuencia de ADN "nativa" y no al ADN "introducido". El diseño de la pareja de cebadores de esta manera implica que dicha pareja de cebadores podría utilizar VACV-COP y SCV104 como moldes de ADN para la amplificación por PCR y el tamaño de los productos de PCR será indicativo de la inserción del casete de expresión en el ORF de D13L o la detección del virus sin inserción, es decir, VACV-COP. El presente ensayo de PCR no sólo indica la presencia de inserción sino que también puede identificar si todavía se encuentra presente virus parental contaminante residual (VACV-COP) tras múltiples rondas de purificación de las placas. La presencia de contaminación traza no deseada de VACV-COP resulta altamente no deseable, ya que este contaminante puede proporcionar en trans ayuda de D13 al SCV104 y, de esta manera, reducir la atenuación de SCV104.

35 Extracciones de ADN utilizando el kit de tejidos DNeasy de Qiagen (nº de cat. 69504). Se extrajo el ADN vírico a partir de 200 µl del virus amplificado SCV104 anteriormente indicado, utilizando el kit de tejidos DNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, lo anterior se llevó a cabo mediante la adición de 20 µl de proteinasa K a 200 µl de extracto vírico y mezclando bien. A lo anterior, se añadieron 200 µl de tampón AL y se mezclaron por completo antes de incubar a 56°C (bloque térmico) durante 10 minutos. Tras la incubación, se añadieron 200 µl de etanol al 100% y se mezclaron bien y después se añadió el volumen total a una columna de centrifugación. El líquido se pasó por la columna de centrifugación mediante centrifugación siguiendo las instrucciones en el manual de usuario del fabricante, seguido de lavados por la columna de centrifugación con los tampones AW1 y AW2. El ADN unido a la columna de centrifugación se eluyó con 100 µl dos veces de tampón AE. El ADN eluido se agrupó en un único tubo listo para el análisis de PCR o para el almacenamiento a 4°C hasta un análisis posterior de PCR.

45 Amplificación por PCR. Se utilizó el ADN extraído del SCV104 (ver la sección 4.2.3.1, anteriormente) como molde para la amplificación por PCR con el fin de determinar si la inserción había tenido lugar en el ORF de D13L. Los cebadores de PCR indicados posteriormente se unen a secuencias flanqueantes del ORF de D13L de manera que la amplificación a partir del ADN del SCV104 debería amplificar un producto de PCR de 4.360 pb y no un producto de PCR de 2.881 pb amplificado a partir del virus parental, VACV-COP. El análisis de PCR mostró que los clones purificados de la 6a placa del SCV104 sólo amplificaban un producto correspondiente a más de 4.000 pb y menos de 5.000 pb, indicando que el SCV104 contenía el casete de CP77/DsRed en el ORF de D13L. La falta de un producto de PCR de aproximadamente 3.000 pb implica que no existen niveles detectables de contaminación por virus parental en los stocks de SCV104 amplificado.

55 Datos de las parejas de cebadores

ID_D12L_LL04_Fw: 5'-TACAAAATCAAATAATGGTCGAAAC-3'

ID_A2L_LL04_Rv: 5'-TGCCAAGAAAACACTCCTTCTAAGACAAT-3'

60 EJEMPLO 11

Ensayo de SCV104 para la atenuación mediante ensayos de infectividad de placas

65 Debido a que la proteína codificada por el ORF de D13L resulta esencial para el ensamblaje del virus, se esperaría que la entrada celular de un virus SCV104 rescatado no podría producir progenie de viriones infecciosos en células normales permisivas de virus Vaccinia y, por lo tanto, una incapacidad de la infección inicial de extenderse a células

vecinas para formar focos en expansión continua de la infección. Con el fin de confirmar lo anterior, el virus con delección de D13L descrito en la presente invención (SCV104) se diluyó en serie hasta el punto en que pudiese utilizarse un número bajo de unidades formadoras de placa para infectar células cultivadas en una placa de 6 pocillos de manera que la extensión célula a célula del virus infectante pudiese monitorizarse durante un periodo de días. En el presente estudio se analizaron tres líneas celulares: las células 143B, que son permisivas del virus Vaccinia, células CHO que no son permisivas del virus Vaccinia pero que pueden serlo en el caso de que el virus Vaccinia exprese proteína CP77 y p-LL19-CHO, que es una línea celular recombinante que expresa la proteína D13L. El virus descrito en la presente invención en el que se ha insertado un casete de expresión de CP77/DsRed en el ORF de D13L de manera que no puede expresarse función de la proteína D13 sólo debería formar focos infecciosos de infección en la línea celular p-LL19-CHO. La presencia de focos de infección dentro de la monocapa de células 143B indica la presencia de virus Vaccinia contaminantes dentro de la mezcla de poblaciones víricas ya que el contaminante proporciona ayuda de D13L en trans. La presencia de focos de infección dentro de la monocapa de CHO significa que la inserción del casete de CP77/DsRed no ha inactivado el ORF de D13L.

Organización de las células. Se sembraron las células 143B, CHO y p-LL19-CHO en múltiples placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo (RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep y sólo para p-LL19-CHO, 1.000 µg/ml de geneticina) a 37°C/5% de CO₂ hasta que las monocapas celulares alcanzasen el 100% de confluencia.

Infección. Se utilizó el extracto vírico purificado a partir de la 3a placa amplificada para infectar las células. Debido al título desconocido de dicho virus, se llevó a cabo la dilución en serie de 10 veces del stock de virus hasta 10⁻⁴ de la manera siguiente: en primer lugar, se diluyeron 60 µl de stock vírico en 6 ml de medio MM (Dil. 1:1, dilución 1:100) y después se prepararon diluciones adicionales mediante la adición de 800 µl de dilución 1 a 7,2 ml de medio MM (dilución 2: dilución 10⁻³) y después se repitieron para preparar una dilución 10⁻⁴. Para la infección, se añadieron 500 µl de cada dilución a cada pocillo de una placa de 6 pocillos - una placa por cada línea celular utilizada. Se llevó a cabo la adsorción vírica a temperatura ambiente durante 45 min, eliminando después el inóculo vírico de cada pocillo y lavando cada pocillo con PBS antes de añadir MM a razón de 2 ml por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C/5% de CO₂ y se observaron diariamente bajo un microscopio de fluorescencia. La dilución 10⁻² produjo la mejor tasa de infección vírica para la observación.

Observación bajo el microscopio. Se observó la infección vírica bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus 1X51) con filtro de DsRed (nº de cat. U-MRFPHQ, Olympus). Se capturó la imagen utilizando software de imágenes digitales CellSens (Olympus).

Resultados. La infección a una dilución de 10⁻² produjo los mejores resultados para observar la infección inicial de células individuales y la extensión de la infección a células vecinas. El examen de las células 143B muestra la presencia de infecciones de células individuales el día 1, en el que el virus fue incapaz de extenderse a células vecinas los días 2 y 3, indicando que la entrada del virus en células individuales debía de ocurrir pero que no se había producido progenie vírica infecciosa hasta los días 2 y 3. Lo mismo era cierto para las células CHO individuales infectadas, es decir, no se produjo progenie vírica infecciosa a partir de las infecciones iniciales de células individuales.

El examen de la línea celular p-LL19-CHO muestra que la infección inicial de células individuales había producido progenie vírica infecciosa en forma de pequeños focos de infección el día 1. Dichos focos de infección se habían incrementado en tamaño rápidamente hasta los días 2 y 3, indicando que estaba teniendo lugar la amplificación vírica con el tiempo.

De acuerdo con lo anterior, la eliminación de una secuencia codificante de proteína de andamiaje de precursor de Vaccinia funcional de cualquier virus Vaccinia atenúa en gran medida este virus. Aunque este virus no es capaz de producir progenie vírica infecciosa tras la infección inicial, la expresión de esta proteína, especialmente de DsRed, no ocurre en las células individualmente inicialmente infectadas, tal como pone de manifiesto la fluorescencia roja observable. Dicho virus puede rescatarse de una línea celular que expresa la proteína de andamiaje de precursor de Vaccinia de manera independiente de la infección por virus Vaccinia. La expresión constitutiva de la proteína de andamiaje de precursor de Vaccinia por la línea celular transgénica no presenta efectos adversos sobre el crecimiento o la fisiología de dicha línea celular.

EJEMPLO 12

Construcción de línea celular C11-LL19-HeLa expresante de D13L

Con el fin de titular un SCV no fluorescente con una delección de D13L, se preparó una línea celular de rescate que expresa la proteína D13 que consistía en una línea celular permisiva de Vaccinia que proporciona soporte a la formación de placas líticas. En las células CHO, el virus Vaccinia que expresa CP77 o la expresión por una línea celular de CP77 no proporciona soporte a la formación de placas líticas que pueden teñirse con cristal violeta y contarse a ojo desnudo. Con el fin de crear una línea celular de titulación, se transdujeron células HeLa para expresar la proteína D13 mediante integración estable de un casete de expresión que consistía en un promotor de mamífero constitutivo, secuencia codificante de la proteína D13 que contenía la secuencia de Kozak en torno al

codón de inicio y que terminaba en una secuencia de señal de poliadenilación. A continuación, se clonó dicho casete en un vector plásmido que permitía la transferencia génica estable en el ADN genómico de la célula huésped y la selección de integración con éxito mediante selección con antibiótico. Seguidamente las células transducidas se amplificaron mediante la utilización de la selección con antibiótico para seleccionar las células que contenían el casete de expresión de D13 y después se llevó a cabo un ensayo de placas con SCV104 (deleción de ORF de D13L) mediante la infección de monocapas de células a una m.o.i. de 0,001 ufp por célula y la selección de un clon de línea celular que produjese el tamaño de placa más grande durante un periodo de 3 días. Se substituyó el ORF de D13L del SCV104 por dos casetes de expresión: uno para la expresión de la proteína CP77 y el otro para la expresión de una proteína fluorescente roja. La infección de una línea celular HeLa expresante de la proteína D13 por SCV104 resultó en placas líticas fluorescentes rojas.

Construcción de pLL19 - vector transductor celular de D13: la construcción de pLL19 se ha descrito anteriormente. En dicho plásmido la secuencia codificante de la proteína D13 etiquetada con Flag C-terminal se encuentra bajo el control del promotor constitutivo humano factor 1-alfa de alargamiento y la transferencia génica estable al ADN genómico celular se encuentra mediada por transposición. La transposición también inserta un casete de expresión de selección con antibiótico neomicina, de manera que las células transducidas pueden seleccionarse positivamente mediante la adición de G418/geneticina al medio de cultivo.

Inserción estable del casete de expresión etiquetado con D13-Flag en células HeLa mediante transducción con pLL19: se sembraron células HeLa en un matraz T25 y se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente 50% en medio de cultivo RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep. Utilizando el reactivo de transfección Effectene de Qiagen (nº de cat. 301425), se transfectó 1 µg de pLL19 en el matraz T25 con células HeLa confluyentes al 50% siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las células transfectadas se incubaron durante la noche en medio de cultivo (RPMI 1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep). Al día siguiente, se cambió el medio por medio de cultivo que contenía 1.000 µg/ml de geneticina para la selección de las células transducidas. Al morir la mayoría de las células, se recuperaron las remanentes desprendiéndolas de la superficie del matraz con TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp., nº de cat. 12563-029) y se separaron las células individuales a placas de 96 pocillos que contenían medio de cultivo y 1.000 µg/ml de geneticina. Se incubaron dichas placas a 37°C/5% de CO₂ hasta la observación de colonias de células en cada pocillo. Se cambió el medio de selección cada 2 a 3 días. Se recuperó cada colonia de células y se expandió en serie mediante el cultivo de la manera siguiente: placa de 48 pocillos a placa de 24 pocillos a placa de 6 pocillos a matraz T75 y mantenimiento en matraz T75 mediante proporción de división 1:5 hasta encontrarse listo para preparar un stock celular congelado.

Cribado para una línea celular monoclonal que proporcione soporte óptimo a la formación de placas de SCV104: SCV104 es un virus Vaccinia en el que ORF de D13L ha sido substituido por el promotor 025 del virus de la viruela vacuna más ORF que codifica la proteína CP77 y un casete de expresión de proteína fluorescente roja (DsRed Express2). La expresión de CP77 no resulta importante o necesaria para la formación de placas en las células HeLa pero este virus no se propaga en ausencia de expresión en la línea celular de proteína D13. Sin embargo, en la línea celular HeLa que expresa proteína D13, el SCV104 debería ser capaz de amplificarse y extenderse a otras células vecinas y de esta manera formar placas líticas fluorescentes rojas en la monocapa celular. Se utilizó dicho virus en un estudio de formación de placas en líneas celulares HeLa-LL19 clonales para seleccionar el clon que proporcionaba soporte óptimo a la formación de placas.

Organización de las líneas celulares: se sembraron varios clones de la línea celular LL19-HeLa en pocillos de placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo que contenía 1.000 µg/ml de geneticina hasta una confluencia de 100% a 37°C/5% de CO₂.

Infección vírica: se utilizó SCV104 para infectar las células a 0,001 ufp por célula mediante dilución del virus en MM (RPMI-1640/FBS al 2%/Glutamax 2 mM/pen-strep) hasta 10³ ufp/ml. Se añadió 1 ml de virus diluido a cada pocillo para la infección. Cada pocillo de una placa de 6 pocillos contenía aproximadamente 1x10⁶ células en confluencia; por lo tanto, 1 ml de 10³ ufp/ml resulta en una m.o.i. de 0,001. Una m.o.i. de 0,001 garantizará la formación de placas a partir de células individuales infectadas. Se incubaron todas las placas a temperatura ambiente durante 1 hora de manera que el virus pudiese adsorberse a las células y después se añadió 1 ml de MM a cada pocillo y seguidamente se incubaron todas las placas a 37°C/5% de CO₂ estimulando la entrada vírica sincrona en las células seguido de la amplificación vírica, resultando en la extensión célula a célula con el tiempo. Se observó diariamente la formación de placas fluorescentes rojas bajo un microscopio de fluorescencia.

Observación al microscopio: se observó la infección vírica y la formación de placas durante un periodo de tres días bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) con filtro de DsRed (nº de cat. U-MRFPHQ, Olympus). Se capturó la imagen utilizando software de imágenes digitales CellSens (Olympus).

Resultados: el día 1 después de la infección todas las infecciones habían resultado en pequeños focos esporádicos de fluorescencia roja. El día 3 todas las líneas celulares clonales produjeron placas líticas fluorescentes rojas de tamaño considerable en las que el clon 11 (C11) produjo tamaños de placa significativamente más grandes de todos los clones sometidos a ensayo.

Conclusión: estos resultados demuestran que el clon C11 (C11-LL19-HeLa) expresaba suficiente proteína D13 para proporcionar soporte a la mayor formación de placas de todos los clones sometidos a ensayo con una infección de SCV104. Este clon de línea celular (C11) resulta excelente para cuantificar un virus Vaccinia con delección de D13L utilizando el método de recuento de placas lífticas de titulación, utilizado comúnmente para titular el virus Vaccinia.

EJEMPLO 13

Construcción de la línea celular p-LL07-LL29-CHO expresante de CP77 y D13L

Con el fin de rescatar un virus VACV-COP con una delección de ORF de D13L en las células CHO, resultó necesario construir una línea celular CHO que expresase las proteínas D13 y CP77. Lo anterior se llevó a cabo mediante la construcción de un casete de expresión de mamífero de D13 y un casete de expresión de mamífero de CP77 que consistía en un promotor de mamífero para controlar la expresión, una secuencia de ADN codificante de codones optimizados preferente para CHO para la proteína D13 o CP77 seguido de una secuencia de señal de poliadenilación. A continuación, se clonaron dichos casetes en vectores plásmido que permiten la transferencia génica estable al ADN genómico de la célula huésped y la selección de integración con éxito mediante selección con antibiótico. Seguidamente, se amplificaron las células transducidas mediante la utilización de la selección con antibiótico para seleccionar las células que contenían ambos casetes de expresión, de D13 y de CP77. Con el fin de verificar la expresión de CP77, se utilizó un virus Vaccinia que expresaba proteína fluorescente verde mejorada (SCV505) para infectar la línea celular transgénica en la que se monitorizó el desarrollo de placas fluorescentes durante un periodo de 4 días. El tamaño de las placas fluorescentes verdes en expansión continua durante el periodo de 4 días confirmó la expresión de CP77 por la línea celular. Para verificar la expresión de la proteína D13 y un virus Vaccinia con delección de D13L que expresaba CP77 (SCV104) se utilizó la proteína fluorescente DsRed para infectar la línea celular transgénica, de la que se monitorizó el desarrollo de las placas durante un periodo de 4 días. El tamaño de las placas fluorescentes rojas en expansión continua durante el periodo de 4 días confirmó la expresión de la proteína D13 por la línea celular.

Construcción de pLL07, plásmido de transferencia del gen de CP77

Construcción de la secuencia codificante de la proteína CP77: la secuencia codificante de la proteína CP77 fue sintetizada por GeneArt GmbH (Alemania) mediante la recreación (retrotraducción o traducción inversa) de la secuencia de ADN a partir de la secuencia de aminoácidos de CP77 codificada por el ORF de 025L de la cepa Brighton Red de virus de la viruela vacuna UniProtKB/Swiss-Prot: P12932.1 y codones optimizados para la expresión en células de ovario de hámster chino (CHO).

Construcción de vector transductor celular de CP77: la secuencia codificante de proteína CP77 de codones optimizados de pPH51 (un plásmido de clonación que alojan la secuencia de la proteína CP77 de codones optimizados) se amplificó por PCR utilizando una pareja de cebadores de PCR en la que el cebador 5' se diseñó para añadir una secuencia de Kozak en torno al codón de inicio y el cebador 3' se diseñó para añadir la secuencia de etiqueta Flag antes del codón de parada. El producto de PCR amplificado se subclonó en el vector transposón piggyBac pJ507-2 (Hyg^r) obtenido de DNA2.0 Inc. (USA) mediante el sitio de clonación Bsal. La clonación en los sitios Bsal sustituye eficazmente la secuencia codificante cometGFP por la secuencia codificante de la proteína CP77, creando pLL07. A continuación, CP77 queda bajo el control del promotor constitutivo humano factor 1-alfa de alargamiento (EF1a) y se coexpresa con el gen de resistencia a higromicina después de integrarse establemente ambos en el genoma de las células transfectadas. La integración estable en el genoma del huésped se encuentra mediada por la integración mediante transposón de la secuencia de ADN unida por los límites izquierdo y derecho del transposón del vector piggyBac.

Pareja de cebadores de PCR utilizada para amplificar por PCR el gen CP77-CHO a partir del ADN del plásmido pPH51.

Secuencia de cebador directo:

AACACGTCTCGGGGGgcccaccATGTTCTGACTACCTGGAAAATGAGGAAGTG (SEC ID nº 4).

Secuencia de cebador inverso:

CAGGAAGACGCTTTTcaCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCCTGCTGCTCGAAG ATCTTGTACT (SEQ ID NO: 5). La secuencia de la etiqueta Flag se encuentra subrayada seguida del codón de parada (en minúscula).

Construcción de pLL29, plásmido de transferencia del gen de D13

La secuencia codificante de la proteína D13 de codones optimizados para CHO se amplificó por PCR a partir de pLL19 (tal como se ha indicado anteriormente) para intercambiar la secuencia de etiqueta Flag C-terminal por la secuencia de etiqueta HA antes de la clonación en pJ503-02 (vector de expresión de mamífero piggyBac pHULK con CometGFP y Neo^r) obtenido de DNA2.0 Inc. (Nº de cat. pJ503-2) mediante los sitios de clonación Bsal.

Construcción de vector de transducción de células D13L-HA: la secuencia codificante de proteína D13 de codones optimizados sin la secuencia de etiqueta Flag C-terminal se amplificó por PCR a partir de pLL19 y se subclonó en el vector transposón piggyBac pJ503-2 (vector de expresión de mamífero piggyBac pHULK con CometGFP y Neo+) obtenido de DNA2.0 Inc. (nº de cat. 1503-2) mediante los sitios de clonación Bsal para producir pLL29. La clonación entre sitios Bsal mediante clonación In-Fusion (Clontech: clonación sin ligasas) elimina la secuencia codificante de GFP cometa y la sustituye por la secuencia codificante de proteína D13 nuevamente etiquetada con HA mediante recombinación homóloga in vitro. La secuencia codificante de la proteína D13Lcho-Tagged se encuentra ahora bajo el control del promotor humano factor 1-alfa de alargamiento (EF1a) y se coexpresará con el gen de resistencia a neomicina una vez ambos se hayan integrado establemente en el genoma de las células transfectadas. La integración estable en el genoma del huésped se encuentra mediada por la integración mediante transposón de la secuencia de ADN unida por los límites izquierdo y derecho del transposón del vector piggyBac. A continuación, se muestra un mapa plasmídico de pLL29.

La amplificación por PCR de la secuencia D13Lcho-etiqueta HA se llevó a cabo utilizando la pareja de cebadores siguiente:

Secuencia de cebador directo:

Inf-LL19-D13LC-Fw: 5'-AACACGTCTCGGGGGGCCGCCACCATGAACAACACCATCATCAA -3'

Secuencia de cebador inverso:

Inf-LL27-D13L-Rv;
5'-CAGGAAGACGCTTTTAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAGTTGTTATCGCCC
ATGATCT - 3'

La secuencia subrayada representa la secuencia codificante de HA, "tta" representa el codón de parada.

La doble inserción estable de los casetes de expresión de CP77-etiqueta Flag y de D13-etiquetado con HA en las células CHO mediante transducción simultánea con pLL07 y pLL29.

Se sembraron células CHO en un matraz T25 y se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente 50% en medio de cultivo RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep. Utilizando el reactivo de transfección Effectene de Qiagen (nº de cat. 301425), se transfectó 1 µg de pLL07 y 1 µg de pLL29 en el matraz T25 de células CHO confluyentes al 50% siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las células transfectadas se incubaron durante la noche en medio de cultivo (RPMI 1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep). Al día siguiente se cambió el medio por medio de cultivo fresco que contenía 500 µg/ml de geneticina y 250 µg/ml de higromicina-B para la selección de las células transducidas. Se cambió el medio de selección cada 2 a 3 días hasta la muerte y desprendimiento de la mayoría de las células, dejando colonias de las células que se habían derivado de células individuales. Al crecer las células transducidas a 90-100% de confluencia, se recuperaron utilizando TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp., nº de cat. 12563-029) y se sembraron en un matraz T75 para la expansión celular adicional. Dicha nueva línea celular policlonal se denominó p-LL07-LL29-CHO.

Verificación de la expresión de D13 y CP77 mediante rescate del virus Vaccinia y virus Vaccinia con delección de ORF de D13L

SCV505 es un virus Vaccinia que expresa proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y sólo se propaga en células CHO en presencia de proteína CP77. Se utilizó dicho virus en un estudio de infectividad de placas en p-LL07-LL29-CHO para verificar la expresión de CP77 por dicha línea celular. SCV104 es un virus Vaccinia en el que ORF de D13L ha sido sustituido por el promotor 025L del virus de la viruela vacuna más ORF que codifica la proteína CP77 y un casete de expresión de proteína fluorescente roja (DsRed Express2). Dicho virus no se propaga en ausencia de expresión en la línea celular de la proteína D13. Se utilizó dicho virus en un estudio de infectividad de placas en p-LL07-LL29-CHO para verificar la expresión de D13 por dicha línea celular.

Estudio de la infectividad de placas en la línea celular p-LL07-LL29-CHO

Se utilizaron diversas líneas celulares en el presente estudio para ayudar a valorar la expresión de D13 y CP77 por p-LL07-LL29-CHO debido a la infección por SCV505 (D13⁺ CP77⁻ EGFP⁺) y SCV104 (D13⁻ CP77⁺ DsRed⁺). Los resultados esperados en las líneas celulares siguientes eran los siguientes:

Vero: Esta línea celular es normalmente permisiva a la infección por virus Vaccinia. La formación de placas que indica la extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo según detección mediante fluorescencia verde de infección por SCV505, ya que este virus es normalmente infeccioso en dicha línea celular. Sin embargo, la falta de formación de placas detectada por la falta de fluorescencia roja o fluorescencia roja de sólo células individuales

debido a infección por SCV104 debe considerarse que indica que no se produce extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo debido a la falta de expresión de proteína D13 por la línea celular o el virus.

5 C11-LL19-HeLa: es una línea celular permisiva de virus Vaccinia que expresa la proteína D13 mediante transducción de pLL19. Se espera la formación de placas debido a la infección por SCV505, indicando extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo según detección de fluorescencia verde con independencia de la expresión en la línea celular de D13. Se espera la formación de placas debido a la infección por SCV104 ya que este virus ahora puede amplificarse en dicha línea celular debido a la expresión de proteína D13.

10 CHO: es una línea celular no permisiva de la infección por virus Vaccinia. No se espera formación de placas por las infecciones por SCV505 y SCV104 detectada por la falta de fluorescencia roja o verde o de sólo células individuales. Lo anterior indica que no se produce extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo debido a la falta de expresión de proteína D13 por la línea celular necesaria para rescatar SCV104, aunque este virus puede expresar CP77, y debido a la falta de expresión de proteína CP77 por la línea celular necesaria para rescatar SCV505.

15 p-LL07-LL29-CHO: es una línea celular CHO que expresa ambas proteínas, D13 y CP77. Se espera la formación de placas debido a la infección por SCV505, indicando extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo según detección de fluorescencia verde, que indica expresión en la línea celular de proteína CP77. Se espera la formación de placas debido a la infección por SCV104, indicando extensión célula a célula del virus amplificado con el tiempo según detección de fluorescencia verde, que indica expresión en la línea celular de proteína D13.

20 Organización de las líneas celulares: Se sembraron las líneas celulares Vero, CHO, C11-LL19-HeLa y p-LL07-LL29-CHO en dos juegos de múltiples placas de 6 pocillos (uno para la infección por SCV505 y el otro para la infección por SCV104) y se cultivaron en medio de cultivo correspondiente (tal como se indica a continuación) hasta el 100% de confluencia a 37°C/5% de CO₂.

- Vero, CHO: RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep
- C11-LL19-HeLa: RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep, más 1.000 µg/ml de geneticina
- p-LL07-LL29-CHO: RPMI-1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/pen-strep, más 500 µg/ml de geneticina y 250 µg/ml de higromicina B

30 Infección vírica: Se utilizó SCV104 y SCV505 para infectar las células a 0,001 ufp por célula mediante dilución del virus en MM (RPMI-1640/FBS al 2%/Glutamax 2 mM/pen-strep) hasta 10³ ufp/ml. Un virus por placa: se añadió 1 ml de virus diluido a cada pocillo para la infección. Cada pocillo de una placa de 6 pocillos contenía aproximadamente 1x10⁶ células en confluencia; por lo tanto, 1 ml de 10³ ufp/ml resulta en una m.o.i. de 0,001. Una m.o.i. de 0,001 garantizará la formación de placas a partir de células individuales infectadas. Se incubaron todas las placas a temperatura ambiente durante 1 hora de manera que el virus pudiese adsorberse a las células y después se añadió 1 ml de MM a cada pocillo y seguidamente se incubaron todas las placas a 37°C/5% de CO₂ estimulando la entrada vírica sincrona en las células seguido de la amplificación vírica, resultando en la extensión célula a célula con el tiempo. Se observó la formación de placas fluorescentes diariamente bajo un microscopio de fluorescencia.

35 Observación al microscopio: se observó la infección vírica y la formación de placas durante un periodo de cuatro días bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) con filtro de DsRed (nº de cat. U-MRFPHQ, Olympus) para el virus SCV104 y con el filtro de GFP (nº de cat. U-MGFPHQ, Olympus) para el virus SCV505. Se capturó la imagen utilizando software de imágenes digitales CellSens (Olympus).

Resultados:

40 Infección de células CHO por SV104 y SCV505 a una m.o.i. de 0,001: el día 1 después de la infección sólo podía observarse fluorescencia esporádica de células individuales, indicando que ambos virus habían entrado en las células pero que todavía no se habían amplificado para extender la infección a las células vecinas. Sin embargo, lo anterior se mantuvo entre los días 2 y 4 después de la infección, es decir, sólo se observaban infecciones de células individuales y no la extensión vírica a células vecinas con el tiempo.

50 Infección de células Vero por SCV104 y SCV505 a una m.o.i. de 0,001: la infección por SCV505 era la esperada, se formaron placas minúsculas el día 1 después de la infección, la totalidad de las cuales se incrementó en tamaño hasta un punto en el que todas las placas se fusionaron en una infección confluyente de las monocapas celulares el día 4. Lo anterior indicaba que el virus amplificado a partir del día 1 había extendido la infección hasta el total el día 4 después de la infección. Sin embargo, lo anterior fue completamente diferente con la infección por SCV104. El día 1 después de la infección sólo podía observarse fluorescencia esporádica de células individuales, que se mantuvo durante los siguientes 3 días. Lo anterior indica que SCV104 no pudo amplificarse ni propagarse en dicha línea celular, ya que el virus no poseía ORF de D13L y no podía iniciar el ensamblaje vírico después de la replicación del genoma del virus y además dicha línea celular no expresaba la proteína D13 que ayuda a rescatar la amplificación vírica.

Infección de células CII-LL19-HeLa (línea de células HeLa que expresa la proteína D13) con SCV104 y SCV505 a m.o.i. de 0,001: la infección por SV505 fue tal como se esperaba, se formaron placas pequeñas el día 1 después de la infección, que se agrandaron hasta el punto en que todas las placas se fusionaron formando una infección confluyente de las monocapas celulares el día 4. Lo anterior indicaba que el virus amplificado a partir del día 1 había extendido la infección hasta el total el día 4 después de la infección. La infección por SCV104 también produjo los mismos resultados, demostrando que la proteína D13 producida por dicha línea celular complementaba la falta de ORF de D13L en SCV104 y la cantidad producida por dicha línea celular era suficiente para proporcionar soporte a la amplificación vírica y la extensión de la infección de manera comparable a SCV505, que presentaba un ORF de D13L intacto.

Infección de células p-LL07-LL29-CHO (línea celular CHO que expresa ambas proteínas, D13 y CP77) con SCV104 y SCV505 a una m.o.i. de 0,001: para tanto SCV104 como SCV505 se observaron focos minúsculos de infección el día 1 después de la infección. A lo largo de los siguientes 3 días, dichos focos de infección se expandieron formando placas de tamaño creciente que finalmente se fusionaron en infecciones confluyentes el día 4 después de la infección. Lo anterior demuestra que CP77 se estaba expresando, ya que proporciona soporte a la amplificación y propagación de SCV505 y que también se expresaba la proteína D13, ya que proporciona soporte a la amplificación y propagación de SCV104.

Conclusión: Estos resultados demuestran que puede utilizarse una línea celular CHO que expresa las proteínas CP77 y D13 como sustrato celular para la producción y generación de un virus Vaccinia con delección de D13L. Durante la infección de células permisivas normales, un virus con delección de D13L no sería capaz de iniciar el ensamblaje vírico y, por lo tanto, no completaría su ciclo vital infeccioso, convirtiéndolo de esta manera en un excelente vector de administración de vacuna vírica para las vacunas de seres humanos y animales en términos de seguridad. Sin embargo, dicho vector Vaccinia altamente atenuado puede generarse en la línea celular de fácil uso biotecnológico CHO en el caso de que esta línea celular exprese la proteína de espectro de huéspedes de CHO (CP77) y la proteína de ensamblaje faltante (la proteína D13).

EJEMPLO 1.4

Análisis de la expresión de las proteínas D13 y CP77 de la línea celular p-LL07-LL29-CHO mediante transferencia western

Información de los antecedentes

Las proteínas D13 y CP77 expresadas por p-LL07-LL29-CHO se encuentran etiquetadas y pueden detectarse utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la secuencia de la etiqueta de aminoácidos en los extremos C-terminales de las proteínas D13 y CP77. En ausencia de anticuerpos que reconozcan específicamente las proteínas D13 y CP77, puede llevarse a cabo el análisis de transferencia western utilizando dichos anticuerpos anti-etiqueta para confirmar la expresión de las proteínas D13 y CP77 en la línea celular p-LL07-LL29-CHO. El extremo C-terminal de la proteína D13 contiene la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de HA "YPYDVPDYA", en la que el extremo C-terminal de la proteína CP77 contiene la secuencia de aminoácidos de etiqueta Flag "DYKDDDDK".

Metodología de análisis de transferencia western

Se sembraron las líneas celulares siguientes en matraces T75 y se cultivaron hasta el 100% de confluencia en medio de cultivo (RPMI 1640/FBS al 10%/Glutamax 2 mM/Pen-Strep) que contenía los antibióticos de selección apropiados. CHO sin antibióticos de selección, p-LL07-LL29-CHO con 500 µg/ml de geneticina y 250 µg/ml de higromicina-B, p-LL07-CHO con 250 µg/ml de higromicina-B y C11-LL19-HeLa con 1.000 µg/ml de geneticina. Se desprendió la monocapa celular confluyente y se digirió para formar una suspensión de células individuales con TrypLE Select a 37°C durante 10 min. Se recuperaron las células de cada matraz y se peletizaron mediante centrifugación a 300xg durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Tras el lavado final, los pellets celulares se resuspendieron en 500 µl de PBS. Se añadió 4^x tampón de carga SDS-PAGE al extracto de proteínas, proporcionando una concentración final de 1^x y se calentó a 98°C durante 2 a 3 minutos. Las muestras de proteínas desnaturalizadas se sometieron a electroforesis a través de un gel premoldeado Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ de Biorad (gel en gradiente) durante 30 a 45 minutos a 200 V. Tras la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia durante 1 hora a 100 V.

Para la detección de las proteínas, la membrana de nitrocelulosa se incubó en leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión de anticuerpo no específicos. Para la detección de las proteínas etiquetadas con HA, la membrana se incubó a una dilución 1: 1.000 de anticuerpo anti-HA conjugado con HRP (Abcam, n° de cat. AB1265) en tampón de bloqueo durante la noche a 4°C. Para la detección de las proteínas etiquetadas con Flag, se incubó una membrana separada de nitrocelulosa de electrotransferencia en una dilución 1:1.000 de anticuerpo anti-Flag conjugado con HRP (Abcam, n° de cat. AB49763) en tampón de bloqueo durante la noche a 4°C. A continuación, se lavaron las membranas tres veces con PBS, 5 minutos cada lavado, y después se incubaron en sustrato de ECL (Thermo Scientific Pierce ECL, sustrato de transferencia

western, nº de cat. 32106) durante un par de minutos antes de obtener la imagen utilizando un sistema BioRad XRS gel doc.

Resultados

5 Detección de proteína D13 mediante la detección de la etiqueta HA: el anticuerpo anti-etiqueta HA fue capaz de detectar una proteína del tamaño esperado a partir de un extracto completo de proteínas celulares preparado a partir de p-LL07-LL29-CHO pero sin proteínas procedente de un extracto completo de proteínas celulares preparado a partir de células CHO. Lo anterior indicó claramente que p-LL07-LL29-CHO estaba expresando la proteína D13.

10 Detección de proteína CP77 mediante la etiqueta Flag: el anticuerpo anti-etiqueta Flag fue capaz de detectar una proteína del tamaño esperado de entre un extracto completo de proteínas celulares preparado a partir de p-LL07-LL29-CHO y p-LL07-CHO (línea celular CHO que expresa CP77) pero ninguna proteína de un extracto completo de proteínas celulares preparado a partir de células CHO. Lo anterior indica claramente que p-LL07-LL29-CHO y p-LL07-CHO estaban expresando la proteína CP77.

15 Detección de proteína D13 mediante detección de la etiqueta Flag: La proteína D13 expresada por C11-LL19-HeLa expresaba la proteína D13 con una etiqueta Flag C-terminal y en una transferencia western del extracto completo de proteínas celulares preparado a partir de dicha línea celular, el anticuerpo anti-etiqueta Flag fue capaz de detectar una proteína del tamaño esperado. Lo anterior indicó claramente que C11-LL19-HeLa estaba expresando la proteína D13.

20 Muchas modificaciones resultarán evidentes para el experto en la materia sin apartarse del alcance de la presente invención.

25

TABLA A

Resumen de identificadores de secuencia	
SECUENCIA ID nº	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de nucleótidos de CP77 de codones optimizados para la expresión en células de mamífero (CHO)
2	Secuencia de aminoácidos de CP77 codificada por SEC ID nº 1
3	Secuencia de nucleótidos de pLL07
4	Cebador directo para el gen de CP77-CHO del plásmido pPH51
5	Cebador inverso para el gen de CP77-CHO del plásmido pPH51
6	Secuencia de nucleótidos del gen K1L de Vaccinia Copenhagen (extracto de GenBank M35027.1)
7	Secuencia de aminoácidos de Vaccinia Copenhagen K1L (extracto de GenBank M35027.1) codificada por la SEC ID nº 6
8	VACV-COP-D13L-ORF
9	Secuencia de nucleótidos codificante de SEC ID nº 1 de codones optimizados para la expresión en células de hámster con etiqueta Flag C-terminal (DYKDDDK)
10	Cebador directo de Inf-LL19-D13LC
11	Cebador inverso de Inf-LH9-D13LC
12	Proteína etiqueta Flag
13	Péptido de proteína D13L
14	Cebador directo de Inf-PCR-D13L-F1
15	Cebador inverso de Inf-PCR-D13L-F1
16	Cebador directo de Inf-PCR-D13L-F2
17	Cebador inverso de Inf-PCR-D13L-F2
18	Casete de expresión de CP77+DsRed 2.903 pb
19	Casete de expresión de CP77+DsRed
20	Cebador directo para ID_D12L-LL04
21	Cebador inverso para ID_A2L_LL04
22	Vector de recombinación homóloga pLL09 para la delección de D13L de VACV-COP con CP77/selección con DsRed
23	pLL19 vector transductor mediado por transposón de codones optimizados para CHO etiqueta-D13L para la integración estable en el ADN genómico nuclear de la célula.

TABLA 1

Resultados de titulación			
	24h	48h	72h
CHO	53 ufp/ml	0	0
Vero	$8,5 \times 10^2$ ufp/ml	$14,25 \times 10^6$ ufp/ml	$27,7 \times 10^6$ ufp/ml

Rendimientos víricos (salida)

- 5 La cantidad de virus utilizada para la infección (entrada) fue de 4×10^4 ufp/ml. Para ayudar a la comparación, los rendimientos se expresan en múltiplos de 10^4 . Los valores presentan el rendimiento medio por punto temporal, es decir, el rendimiento en 3 ml recolectados (6 ml dividido por 2 pocillos).

	24 h	48 h	72 h
CHO	$0,0159 \times 10^4$ ufp	0	0
Vero	$0,255 \times 10^4$ ufp	4275×10^4 ufp	8310×10^4 ufp

- 10 Rendimiento de producción (proporción producido/introducido)

La tabla a continuación muestra el rendimiento de virus producido superior al nivel de entrada de cada línea celular en cada punto temporal de recolección, es decir, la proporción PRODUCIDO/INTRODUCIDO.

	24 h	48 h	72 h
CHO	0,004	0	0
Vero	0,06	1069	2078

15

TABLA 2

Resultados de titulación en ufp/ml			
Virus/línea celular	Dil.	Recuento	Título
VACV-COP/CHO	10^{-1}	0	0 ufp/ml
		0	
		0	
		0	
	Media	0	
VACV-COP/Vero	10^{-7}	2	$2,8 \times 10^7$ ufp/ml +/- 34%
		2	
		4	
		3	
	Media	2,8	
VACV-PH22/Vero	10^{-6}	8	$0,75 \times 10^7$ ufp/ml +/- 43%
		5	
		12	
		5	
	Media	7,5	
VACV-PH22/CHO	10^{-7}	6	$7,3 \times 10^7$ ufp/ml +/- 20%
		9	
		8	
		6	
	Media	7,3	

Producción media de virus de la infección por pocillo (rendimiento)

- 20 El volumen de extracto de virus por matraz era de 1 ml. El volumen de siembra en placa para la titulación era de 1 ml. Por lo tanto, el rendimiento vírico es igual a la titulación en ufp/ml multiplicado por 1 ml (volumen de siembra en placa)-

Virus	Línea celular	Rendimiento por matraz
VACV-COP	CHO	0 ufp
	Vero	$2,8 \times 10^7$ ufp
VACV-PH22	Vero	$0,75 \times 10^7$ ufp
	CHO	$7,3 \times 10^7$ ufp

25

Rendimiento por ufp de inóculo, es decir, ufp totales producidas a partir de 1 ufp de inóculo

Tamaño de inóculo por matraz: 1×10^5 ufp

5

TABLA 3

Virus	Línea celular	Rendimiento por ufp de inóculo
VACV-COP	CHO	ufp producidas/upf introducidas
	Vero	280 ufp/upf introducidas (280 ufp producidas por cada ufp utilizada para la inoculación)
VACV-PH22	Vero	75 ufp/upf introducidas (ufp producidas por cada ufp utilizada para la inoculación)
	CHO	730 ufp/upf introducidas (730 ufp producidas por cada ufp utilizada para la inoculación)

Ésta es la titulación de cada 1 ml de extracto vírico.

TABLA 4

Sustrato celular	Línea celular indicadora					
	143B			Vero		
	Titulación ufp/ml	SE	SE %	Titulación ufp/ml	SE	SE %
CHO	5,38E+03	5,74E+02	10,70%	7,25E+02	2,17E+02	30,00%
p-LL07-CHO	1,88E+08	2,45E+07	13,10%	3,95E+07	1,13E+07	28,50%
143B	2,73E+08	3,95E+07	14,50%	3,73E+07	5,45E+06	14,60%

10

La Tabla 4 proporciona la cantidad total de virus por cada 1 ml de extracto vírico.

Sustrato celular	Línea celular indicadora			
	143B		Vero	
	Rendimiento ufp	SE	Rendimiento ufp	SE
CHO	6,38E+03	5,74E+02	7,35E+02	2,17E+02
p-LL07-CHO	1,88E+08	2,45E+07	3,95E+07	1,13E+07
143B	2,73E+08	3,95E+07	3,73E+07	5,45E+06

TABLA B

Cepa	ORF	Genoma	Proteína
Copenhagen	COP-D13L	M35027	AAA48114
Lister clon 107	List-114	DQ121394	ABD52596
LC16mO	mO-149L	AY678277	AAW23819
LC16m8	M8-149L	AY678275	AAW23537
WR	WR-118	NC_006998	YP_233000
Dryvax-3737	VACV-114	DQ377945	ABD57648
Acambis-2000	VACAC2_129	AY313847	AAR17961
Acambis Clon 3	VACCL3-129	AY313848	AAQ93215
CVA	CVA-124	AM501482	CAM58288
Tiantan Clon 10	TT10-148	JX489137	AGJ91839
Cepa GRI-90 del virus de la viruela vacuna	CPXV-GRI-E13L	X94355	CAD90667
Virus de la viruela vacuna Brigton Red	CPXV-131	NC_003663	NP_619914

15

BIBLIOGRAFÍA

Altschul et al. Nucleic Acids Research 25:3389-3402, 1997).

Ausubel et al. (1999) Current Protocols in Molecular Biology (suplemento nº 47), John Wiley & Sons, New York

Boshart et al. (1985) Cell 41:521

Brooks et al. (1995) J. Virol. 69(12):7688-7698

Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4:761

Drillien R. et al. (1978) J Virol. 28(3):843-50

Gorman et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777

Ham RG. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53: 288-293

Hsiao JC, et al. (2006) J. Virol. 80(15):7714-28

Kibler et al. (2011) PLOSONE 6(11)

Meisinger-Henschel et al. (2007) J. Gen. Viral. 88(12):3249-3259

Murphy et al. (1995) Virus Taxonomy Springer Verlag:79-87

Puck TT, et al. (1958) J. Exp. Med. 108:945-956

30

Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, N.Y.

Shisler et al. (2004) J. Virol. 78(7):3553-3560

Spehner D, et al. (1988) J Virol., 62(4):1297-1304

5 Werden SJ, et al. (2008) Chapter 3: Poxvirus Host Range Genes. en: Advances in Virus Research, 71

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Sementis Limited

<120> PREPARACIÓN DE VECTOR VÍRICO

<130> 35226179/WJP

15 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 2031

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia de nucleótidos de CP77 de codones optimizados para la expresión en células de mamífero (CHO)

<400> 1

```

atgttcgact acctggaaaa tgaggaagtg gccctggacg agctgaagca gatgctgcgg      60
gaccgggacc ccaacgacac ccggaaccag ttcaagaaca acgccctgca cgcctacctg      120
ttaaacgagc actgcaacaa cgtggaagtg gtcaagctgc tgctggactc cggcaccaac      180
cccctgcaca agaactggcg gcagctgacc cccctgggcg agtacaccaa ctcccggcac      240
ggcaaagtga acaaggatat cgccatggtg ctgctggaag ctaccggcta ctccaacatc      300
aacgacttca acatcttcac ctacatgaag tccaagaacg tggacatcga cctgatcaag      360
gtgctggtgg aacacggcct cgacttctcc gtgaagtgcg agaagcacca ctccgtgatc      420
gagaactacg tgatgaccga cgaccccgtg cctgagatca tcgacctgtt catcgagaac      480
ggctgctccg tgatctacga ggacgaggac gacgagtacg gctacgccta cgaggaatac      540
cactcccaga acgacgacta ccagccccgg aactgcggca ccgtgctgca cctgtacatc      600
atctcccacc tgtactccga gagcgactcc cggctcttgcg tgaaccccga ggtggtcaag      660
tgcctgatca accacggcat caaccctcc agcatcgata agaactactg caccgccctg      720
cagtactaca tcaagtcctc ccacatcgac atcgatatcg tgaagctgct gatgaagggc      780
atcgacaaca ccgctacag ctacatcgac gacctgacct gctgcacccg gggcatcatg      840
gccgactacc tgaacagcga ctaccggtac aacaaggacg tggacctgga tctggtcaaa      900
ctgttctctg aaaacggcaa gcctcacggc atcatgtgct ccatcgtgcc cctgtggcgg      960
aacgacaaaag agacaatctc cctgatcctg aaaacatga actccgacgt gctgcagcat     1020
atcctgatcg agtacatcac cttctccgat atcgacatct ctctggtcga gtacatgctg     1080
gaatacggcg ctgtggtcaa caaagaggcc atccacggct acttcaagaa catcaacatc     1140
gactcctaca ccatgaagta cctgctgaaa aaagagggcg gcgacgccgt caaccacctg     1200
gacgacggcg agatccccat cggccacctg tgcaagagca actacggccg gtacaacttt     1260
    
```

ES 2 670 034 T3

tacaccgaca cctaccggca gggcttccgg gacatgtcct acgcctgccc catcctgtcc 1320
 accatcaaca tetgcctgcc ctacctgaag gacatcaata tgatcgataa gcggggcgag 1380
 aactgctgc acaaggccgt gcgctacaac aagcagtcct tgggtgcccct gctgctggaa 1440
 agcggctccg acgtgaacat ccgggtccaac aacggctaca cctgtatcgc tatcgccatc 1500
 aacgagtccc ggaacatcga gctgctgaat atgctgctgt gccacaagcc taccctggac 1560
 tgcgtgatcg actccctgcg cgagatcagc aacatcgtgg acaacgccta cgccatcaag 1620
 cagtgcacga gatacgccat gattatcgac gactgcatct cctccaagat ccccgagtcc 1680
 atctccaagc actacaacga ctacattgac atctgcaacc aggaactgaa cgagatgaag 1740
 aaaatcatcg tgggcccga caccatgttc agcctgatct tcaccgatca cggcgccaag 1800
 atcatccacc gctacgcaa caaccccag ctgcgggcct actacgagtc caagcagaac 1860
 aagatctacg tcgaggtcta cgacatcatc agcaacgcca tcgtgaagca caacaagatt 1920
 cacaagaaca tcgagtcctg ggacgacaac acctacatct ccaacctgcc ctataccatc 1980
 aagtacaaga tcttcgagca gcaggattac aaggatgacg atgacaagtg a 2031

<210> 2
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CP77 codificado por la SEC ID nº 1

10

<400> 2
 Met Phe Asp Tyr Leu Glu Asn Glu Glu Val Ala Leu Asp Glu Leu Lys
 1 5 10 15
 Gln Met Leu Arg Asp Arg Asp Pro Asn Asp Thr Arg Asn Gln Phe Lys
 20 25 30
 Asn Asn Ala Leu His Ala Tyr Leu Phe Asn Glu His Cys Asn Asn Val
 35 40 45
 Glu Val Val Lys Leu Leu Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro Leu His Lys
 50 55 60
 Asn Trp Arg Gln Leu Thr Pro Leu Gly Glu Tyr Thr Asn Ser Arg His
 65 70 75 80
 Gly Lys Val Asn Lys Asp Ile Ala Met Val Leu Leu Glu Ala Thr Gly
 85 90 95
 Tyr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Asn Ile Phe Thr Tyr Met Lys Ser Lys

ES 2 670 034 T3

	100							105							110
Asn	Val	Asp	Ile	Asp	Leu	Ile	Lys	Val	Leu	Val	Glu	His	Gly	Phe	Asp
	115						120					125			
Phe	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	His	His	Ser	Val	Ile	Glu	Asn	Tyr	Val
	130					135					140				
Met	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Pro	Glu	Ile	Ile	Asp	Leu	Phe	Ile	Glu	Asn
145					150					155					160
Gly	Cys	Ser	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Tyr	Gly	Tyr	Ala
				165					170						175
Tyr	Glu	Glu	Tyr	His	Ser	Gln	Asn	Asp	Asp	Tyr	Gln	Pro	Arg	Asn	Cys
			180					185						190	
Gly	Thr	Val	Leu	His	Leu	Tyr	Ile	Ile	Ser	His	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ser
		195					200							205	
Asp	Ser	Arg	Ser	Cys	Val	Asn	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Cys	Leu	Ile	Asn
	210					215					220				
His	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ile	Asp	Lys	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ala	Leu
225					230					235					240
Gln	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Ser	Ser	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ile	Val	Lys	Leu
				245					250					255	
Leu	Met	Lys	Gly	Ile	Asp	Asn	Thr	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Asp	Asp	Leu
			260					265						270	
Thr	Cys	Cys	Thr	Arg	Gly	Ile	Met	Ala	Asp	Tyr	Leu	Asn	Ser	Asp	Tyr
		275					280					285			
Arg	Tyr	Asn	Lys	Asp	Val	Asp	Leu	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Phe	Leu	Glu
	290					295					300				
Asn	Gly	Lys	Pro	His	Gly	Ile	Met	Cys	Ser	Ile	Val	Pro	Leu	Trp	Arg
305					310					315					320
Asn	Asp	Lys	Glu	Thr	Ile	Ser	Leu	Ile	Leu	Lys	Thr	Met	Asn	Ser	Asp
				325					330					335	
Val	Leu	Gln	His	Ile	Leu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Thr	Phe	Ser	Asp	Ile	Asp
			340					345						350	

ES 2 670 034 T3

Ile Ser Leu Val Glu Tyr Met Leu Glu Tyr Gly Ala Val Val Asn Lys
 355 360 365

Glu Ala Ile His Gly Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr
 370 375 380

Met Lys Tyr Leu Leu Lys Lys Glu Gly Gly Asp Ala Val Asn His Leu
 385 390 400

Asp Asp Gly Glu Ile Pro Ile Gly His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Gly
 405 410 415

Arg Tyr Asn Phe Tyr Thr Asp Thr Tyr Arg Gln Gly Phe Arg Asp Met
 420 425 430

Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr
 435 440 445

Leu Lys Asp Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Gly Glu Thr Leu Leu His
 450 455 460

Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Gln Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Glu
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Gly Tyr Thr Cys Ile
 485 490 495

Ala Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met Leu
 500 505 510

Leu Cys His Lys Pro Thr Leu Asp Cys Val Ile Asp Ser Leu Arg Glu
 515 520 525

Ile Ser Asn Ile Val Asp Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Gln Cys Ile Arg
 530 535 540

Tyr Ala Met Ile Ile Asp Asp Cys Ile Ser Ser Lys Ile Pro Glu Ser
 545 550 555 560

Ile Ser Lys His Tyr Asn Asp Tyr Ile Asp Ile Cys Asn Gln Glu Leu
 565 570 575

Asn Glu Met Lys Lys Ile Ile Val Gly Gly Asn Thr Met Phe Ser Leu
 580 585 590

Ile Phe Thr Asp His Gly Ala Lys Ile Ile His Arg Tyr Ala Asn Asn
 595 600 605

ES 2 670 034 T3

Pro Glu Leu Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Lys Gln Asn Lys Ile Tyr Val
 610 615 620

Glu Val Tyr Asp Ile Ile Ser Asn Ala Ile Val Lys His Asn Lys Ile
 625 630 635 640

His Lys Asn Ile Glu Ser Val Asp Asp Asn Thr Tyr Ile Ser Asn Leu
 645 650 655

Pro Tyr Thr Ile Lys Tyr Lys Ile Phe Glu Gln Gln Asp Tyr Lys Asp
 660 665 670

Asp Asp Asp Lys
 675

<210> 3
 <211> 11742
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de pLL07

10

<400> 3
 tcagaattgg ttaattgggt gtaacactga ccctatttg tttatTTTTc taaatacatt 60
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaa 120
 ggaagaatat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg 180
 atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa 240
 tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagtgtt tctgaaacat ggcaaaggta 300
 gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc 360
 cacttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctcaccactg 420
 cgatccccgg aaaaacagcg ttccaggtat tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata 480
 ttgttgatgc gctggcagtg ttctgcgcc ggttgactc gattcctgtt tgtaattgtc 540
 cttttaacag cgatcgcgta tttcgcctcg ctccaggcgca atcacgaatg aataacggtt 600
 tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga 660
 aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct 720
 cacttgataa cttatTTTT gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag 780
 tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg gaactgcctc ggtgagtttt 840
 ctcttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatattggtat tgataatcct gatatgaata 900
 aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaact catgaccaa atccctaac 960
 gtgagttacg cgcgcgctcg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 1020

ES 2 670 034 T3

ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	1080
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg	1140
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt tagcccacca	1200
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	1260
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga	1320
taagcgcag cggtcgggct gaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	1380
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga	1440
agggagaaag gcggacaggt atccggaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	1500
ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg	1560
acttgagcgt cgatttttgt gatgctctgc agggggcgg agcctatgga aaaacgccag	1620
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc	1680
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	1740
tctcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat caatattggc	1800
tattggccat tgcatacgtt gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt	1860
ccaatatgac cgccatgttg gcattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg	1920
gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgcta cataacttac ggtaaatggc	1980
ccgctcggct gaccgcccga cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgtccc	2040
atagtaacgc caataggagc tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact	2100
gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaaagtc cggcccctat tgacgtcaat	2160
gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttctact	2220
tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgtc attaccatgc tgatgcggtt ttggcagtac	2280
accaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac	2340
gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac	2400
cccgccccgt tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggaggctta tataagcaga	2460
gctcgtttag tgaaccgtca gatcactaga agctttattg cggtagttta tcacagttaa	2520
attgctaacg cagtcaggcc aacatgggct ctagcctgga cgacgagcac atcctgagcg	2580
ccctgctgca gagcgacgac gaactggtgg gcgaggacag cgacagcgag gtcagcgacc	2640
acgtgtccga ggacgacgtg cagtcgcaca ccgaggaagc cttcatcgac gaggtgcacg	2700
aagtgcagcc taccagcagc ggctccgaga tcctggacga gcagaacgtg atcgagcagc	2760
ctggcagctc cctggccagc aacagaatcc tgacctgcc ccagagaacc atcagaggca	2820
agaacaagca ctgctggtcc acctccaaga gcaccaggcg gagcagagtg tccgccctga	2880

ES 2 670 034 T3

acatcgtgcg gagccagagg ggccccacca gaatgtgcag aaacatctac gaccccctgc 2940
 tgtgcttcaa gctgttcttc accgacgaga tcatcagcga gatcgtgaag tggaccaacg 3000
 ccgagatcag cctgaagagg cgggagagca tgaccagcgc caccttcaga gacaccaacg 3060
 aggacgagat ctacgccttc ttcggcatcc tggatgatgac cgccgtgaga aaggacaacc 3120
 acatgagcac cgacgacctg ttcgacagat ccctgagcat ggtgtacgtg tccgtgatga 3180
 gcagagacag attcgacttc ctgatcagat gcctgagaat ggacgacaag agcatcagac 3240
 ccaccctgcg ggagaacgac gtgttcaccc ccgtgcgga gatctgggac ctgttcaccc 3300
 accagtgcac ccagaactac acccctggcg cccacctgac catcgatgag cagctgctgg 3360
 gcttcagagg cagatgcccc ttcagagtgt acatccccaa caagcccagc aagtacggca 3420
 tcaagatcct gatgatgtgc gacagcggca ccaagtacat gatcaacggc atgccctacc 3480
 tgggcagagg caccagaca aacggcgtgc ccctggcga gtactacgtg aaagaactga 3540
 gcaagcctgt gcatggcagc tgcaggaaca tcacatgcga caactggttc accagcatcc 3600
 ccctggccaa gaacctctg caggaacctt acaagctgac catcgtgggc accgtgcgga 3660
 gcaacaagcg ggagatccca gaggtgctga agaacagcag atccagacct gtgggaacaa 3720
 gcatgttctg cttcgacggc cccctgacct tgggtgctta caagcccagg cccgccaaga 3780
 tgggtgtacct cctgtccagc tgcgacgagg acgccagcat caacgagagc accggcaagc 3840
 cccagatggt gatgtactac aaccagacca agggcggcgt ggacacctg gaccagatgt 3900
 gcagcgtgat gacatgcagc agaaagacca acagatggcc tatggccctg ctgtacggca 3960
 tgatcaatat cgcctgcac aacagcttca tcatctacag ccacaacgtg tccagcaagg 4020
 gcgagaaggt gcagagccgg aagaaattca tgcggaaacct gtacatgagc ctgacctcca 4080
 gcttcatgag aaagagactg gaagccccc cctgaagag atacctccgg gacaacatca 4140
 gcaacatcct gcccaaggaa gtgccaggaa caagcgacga cagcaccgag gaacctgtga 4200
 tgaagaagag gacctactgc acctactgtc ccagcaagat cagaagaaag gccaacgcca 4260
 gctgcaagaa atgcaaaaa gtgatctgcc gggagcacia catcgacatg tgcagagct 4320
 gtttctgatt cagacatgat aagatacatt gatgagttt gacaaaccac aactagaatg 4380
 cagtgaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 4440
 ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcatc attttatgtt tcaggttcag 4500
 ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taagcaggtt 4560
 taaccotaga aagatagtct gcgtaaaatt gacgcatgca ttcttgaaat attgctctct 4620
 ctttetaaat agcgcgaatc cgtcgtgtg catttaggac atctcagtcg ccgcttgag 4680
 ctcccgtag gcgtgcttgt caatgcggtg agtgtcactg attttgaact ataacgaccg 4740
 cgtgagtcaa aatgacgcat gattatcttt tacgtgactt ttaagattta actcatacga 4800

ES 2 670 034 T3

taattatatt gttatttcat gttctactta cgtgataact tattatatat atattttcct	4860
gttatagata tctttcttta tgttttaaat gcactgacct cccacattcc ctttttagta	4920
aaatattcag aaataattta aatacatcat tgcaatgaaa ataaatgttt tttattaggc	4980
agaatccaga tgctcaaggc ccttcataat atccccagc ttagtagttg gacttaggga	5040
acaaaggaac ctttaataga aattggacag caagaaagcg agctattcct ttgccctcgg	5100
acgagtgctg gggcgctcgt ttccactatc ggcgagtact tctacacagc catcggtcca	5160
gacggccgcg cttctgcggg cgatttgtgt acgcccgaca gtcccggctc cggatcggac	5220
gattgcgtcg catcgaccct gcgcccagc tgcacatcg aaattgccgt caaccaagct	5280
ctgatagagt tggcaagac caatgcccag catatacgcc cggagccgcg gcgatcctgc	5340
aagctccgga tgcctccgct cgaagtagcg cgtctgctgc tccatacaag ccaaccacgg	5400
cctccagaag aagatgttgg cgacctgta ttgggaatcc ccgaacatcg cctcgctcca	5460
gtcaatgacc gctgttatgc ggccattgtc cgtcaggaca ttgttgagc cgaaatccgc	5520
gtgcacgagg tgccggactt cggggcagtc ctcggcccaa agcatcagct catcgagagc	5580
ctgcgcgacg gacgcactga cgggtgctgc catcacagtt tgccagtgat acacatgggg	5640
atcagcaatc gcgcatatga aatcacgcca tgtagtgtat tgaccgattc cttgcggtcc	5700
gaatgggccc aaccgcctcg tctggetaag atcggccgca gcgatcgcac ccatggcctc	5760
cgcgaccggc tgcagaacag cgggcagttc ggtttcaggc agatcttgca acgtgacacc	5820
ctgtgcacgg cgggagatgc aataggtcag gctctcgctg aattcccaa tgtcaagcac	5880
ttccggaatc gggagcgcgg ccgatgcaaa gtgccgataa acataacgat cttttagtaa	5940
accatcggcg cagctattta cccgcaggac atatccacgc cctcctacat cgaagctgaa	6000
agcacgagat tcttcgccct ccgagagctg catcaggtcg gacacgctgt cgaacttttc	6060
gatcagaaac ttctcgacag acgtcgcggt gagttcaggc tttttcatgg tggcggacga	6120
aaggcccgga gatgaggaag aggagaacag cgcggcagac gtgcgctttt gaagcgtgca	6180
gaatgccggg cctccggagg accttcgggc gcccgccccg cccctgagcc cgcctcctgag	6240
cccgccccg gaccacccc ttcccagcct ctgagcccag aaagcgaagg agcaaagctg	6300
ctattggccg ctgccccaaa ggcctaccgg cttccattgc tcagcgggtc tgtccatctg	6360
cacgagacta gtgagtcgtg ctacttccat ttgtcacgtc ctgcacgacg cgagctgcgg	6420
ggcggggggg aacttcctga ctaggggagg agtagaaggt ggcgcgaagg ggccaccaa	6480
gaacggagcc ggttggegcc taccgggtgga tgtggaatgt gtgcgaggcc agaggccact	6540
tgtgtagcgc caagtgccca gcggggctgc taaagcgcac gctccagact gccttgggaa	6600
aagcgcctcc cctaccgggt agagaaactt gatctgtcgc cgcaattcaa gcttcgtgag	6660

ES 2 670 034 T3

gctccggtgc ccgtcagtga cctgctatac tctggagacg gcacatcgcc cacagtcccc 6720
gagaagttag gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac 6780
tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtgggg agaaccgtat 6840
ataagtgcag tagtcgocgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc cagaacacag 6900
gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggctt ggcctcttta cgggttatgg cccttgctgt 6960
ccttgaatta cttccacctg gctccagtac gtgattcttg atcccagctt ggagccaggg 7020
gcgggccttg cgctttagga gccccttcgc ctogtgcctg agttgagcc tggcctgggc 7080
gctggggccg ccgcgtgcga atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgtt gctttcgata 7140
agtctctagc catttaaaat ttttgatgac gtgctgcgac gctttttttc tggcaagata 7200
gtcttgtaaa tgcgggccag gatctgcaca ctggattttc ggtttttggg ccgcggcccg 7260
gcgacggggc ccgtgcgtcc cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc 7320
caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg 7380
cgcccgctg tatcgccccg ccctggcgcg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt 7440
gagcggaaag atggccgctt cccggccctg ctccaggggg ctcaaaatgg aggacgcggc 7500
gctcgggaga gcgggcgggt gagtcaacca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag 7560
ccgtcgtctc atgtgactcc acggagtacc gggcgcctgc caggcacctc gattagttct 7620
ggagcttttg gagtacgtcg tcttttaggtt ggggggaggg gttttatgcg atggagtttc 7680
cccacactga gtgggtggag actgaagtta ggcagcttg gcaactgatg taattctcct 7740
tggaaatttg cctttttgag tttgatottt ggttcattct caagcctcag acagtgttct 7800
aaagttttt tcttccattt caggtgtcgt gaacacgtct cggggggccg ccaccatgtt 7860
cgactacctg gaaaatgagg aagtggccct ggacgagctg aagcagatgc tgcgggaccg 7920
ggaccccaac gacaccogga accagttcaa gaacaacgcc ctgcacgcct acctgtttaa 7980
cgagcactgc aacaacgtgg aagtgttcaa cgtgctgctg gactccggca ccaacccctt 8040
gcacaagaac tggcggcagc tgacccccct gggcaggtac accaaactcc ggcacggcaa 8100
agtgaacaag gatatcgcca tgggtcgtctt ggaagctacc ggctactcca acatcaacga 8160
cttcaacatc ttcacctaca tgaagtcaa gaacgtggac atcgacctga tcaaggtgct 8220
ggtggaacac ggcttcgact tctccgtgaa gtgcgagaag caccactccg tgatcgagaa 8280
ctacgtgatg accgacgacc ccgtgcctga gatcatcgac ctgttcatcg agaacggctg 8340
ctccgtgatc tacgaggacg aggacgacga gtacggctac gcctacgagg aataccactc 8400
ccagaacgac gactaccagc cccggaactg cggcaccgtg ctgcacctgt acatcatctc 8460
ccacctgtac tccgagagcg actcccggtc ttgcgtgaac cccgaggtgg tcaagtgcct 8520
gatcaaccac ggcacacacc cctccagcat cgataagaac tactgcaccg ccctgcagta 8580

ES 2 670 034 T3

ctacatcaag tcctcccaca tcgacatcga tatcgtgaag ctgctgatga agggcatcga	8640
caacaccgcc tacagctaca tcgacgacct gacctgctgc acccggggca tcatggccga	8700
ctacctgaac agcgactacc ggtacaacaa ggacgtggac ctggatctgg tcaaactggt	8760
cctggaaaac ggcaagcctc acggcatcat gtgctccatc gtgcccctgt ggcggaacga	8820
caaagagaca atctccctga tcctgaaaac catgaactcc gacgtgctgc agcatatcct	8880
gatcgagtac atcaccttct ccgatatcga catctctctg gtcgagtaca tgctggaata	8940
cggcgctgtg gtcaacaaag aggccatcca cggctacttc aagaacatca acatcgactc	9000
ctacaccatg aagtacctgc tgaaaaaaga gggcgggcgc gccgtcaacc acctggacga	9060
cggcgagatc cccatcgccc acctgtgcaa gagcaactac ggccggtaca acttttacac	9120
cgacacctac cggcagggct tccgggacat gtcctacgcc tgccccatcc tgtccaccat	9180
caacatctgc ctgccctacc tgaaggacat caatatgatc gataagcggg gcgagacact	9240
gctgcacaag gccgtgocct acaacaagca gtcctgtgtg tcctgtctgc tggaaagcgg	9300
ctccgacgtg aacatccggt ccaacaacgg ctacacctgt atcgctatcg ccatcaacga	9360
gtcccgaac atcgagctgc tgaatatgct gctgtgccac aagcctacc tggactgcgt	9420
gatcgactcc ctgcgcgaga tcagcaacat cgtggacaac gcctacgcca tcaagcagtg	9480
catcagatac gccatgatta tcgacgactg catctcctcc aagatccccg agtccatctc	9540
caagcactac aacgactaca ttgacatctg caaccaggaa ctgaacgaga tgaagaaaat	9600
catcgtgggc ggcaacacca tgttcagcct gatcttcacc gatcacggcg ccaagatcat	9660
ccaccgctac gccacaacc ccgagctgcg ggccctactac gagtccaagc agaacaagat	9720
ctacgtogag gtctacgaca tcatcagcaa cgccatcgtg aagcacaaca agattcacia	9780
gaacatcgag tccgtggacg acaacacctc catctccaac ctgccctata ccatcaagta	9840
caagatcttc gagcagcagg attacaagga tgacgatgac aagtgaaaa gcgtcttct	9900
gttctcatca catcatatca aggttatata ccatcaatat tgccacagat gttacttagc	9960
cttttaatat ttctctaatt tagtgtatat gcaatgatag ttctctgatt tctgagattg	10020
agtttctcat gtgtaatgat tatttagagt ttctcttca tctgttcaa tttttgtcta	10080
gttttatttt ttactgattt gtaagacttc tttttataat ctgcatatta caattctctt	10140
tactggggtg ttgcaaatat tttctgtcat tctatggcct gacttttctt aatggttttt	10200
taattttaa aataagtctt aatattcatg caatctaatt aacaatcttt tctttgtggt	10260
taggactttg agtcataaga aatttttctc tacactgaag tcatgatggc atgcttctat	10320
attattttct aaaagattta agttttgccc ttctccattt agacttataa ttcactggaa	10380
ttttttgtg tgtatggtat gacatatggg ttccctttta ttttttacct ataaatatat	10440

ES 2 670 034 T3

ttccctgttt ttctaataaaa gaaaaagatc atcattttcc cattgtaaaa tgccatattt 10500
 ttttcatagg tcacttacat atatcaatgg gtctgtttct gagctctact ctattttatc 10560
 agcctcactg tctatcccca cacatctcat gctttgctct aaatcttgat atttagtgga 10620
 acattctttc ccattttggt ctacaagaat atttttgta ttgtctttgg gctttctata 10680
 tacattttga aatgagggtg acaagttaat aatcaacctc tggattacaa aatttgtaa 10740
 agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta 10800
 atgcctttgt atcatgctat tgcttcccggt atggctttca ttttctcctc cttgtataaa 10860
 tcctggttgc tgtctcttta tgaggagtgt tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg 10920
 tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc 10980
 ctttccggga ctttcgcttt cccctccct attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc 11040
 cttgcccgtc gctggacagg ggctcggctg ttgggcaactg acaattcctg ggtgtgtcog 11100
 gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg ccacctgat tctgcgcggg 11160
 acgtccttct gctacgtccc ttgggcccctc aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg 11220
 ctgccggctc tgcggcctct tccgcctctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc 11280
 ctttgggccg cctccccgca tgcctgcta ttgtcttgcc aatcctcccc cttgctgtcc 11340
 tgccccaccc cccccccag aatagaatga cacctactca gacaatgca tgcaatttc 11400
 tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg gcacctcca gggcaagga aggcacgggg 11460
 gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta gaagcacat ttgttacttt atagaagaa 11520
 ttttgagttt ttgttttttt ttaataaata aataaacata aataaattgt ttgttgaatt 11580
 tattattagt atgtaagtgt aaatataata aaacttaata tctattcaa ttaataaata 11640
 aacctcgata tacagaccga taaaacacat gcgtcaattt tacgcatgat tatctttaac 11700
 gtacgtcaca atatgattat ctttctaggg ttaagaagac tg 11742

5 <210> 4
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo para el gen de CP77-CHO del plásmido pPH51

<400> 4
 aacacgtctc ggggggccgc caccatgttc gactacctgg aaaatgagga agtg 54

15 <210> 5
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso para el gen de CP77-CHO del plásmido pPH51

<400> 5
 caggaagacg ctttttctact tgtcatcgtc atccttgtaa tcctgctgct cgaagatctt 60
 gtact 65

25

ES 2 670 034 T3

<210> 6
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos del gen de K1L de Vaccinia Copenhagen (extracto de Genbank M35027.1)

<400> 6
 atggatctgt cacgaattaa tacttggaag tctaagcagc tgaaaagctt tctctctagt 60
 aaagatacat ttaaggcgga tgtccatgga catagtgcct tgtattatgc aatagctgat 120
 aataacgtgc gtctagtatg tacggtgttg aacgctggag cattgaaaaa tcttctagag 180
 aatgaatttc cattacatca ggcagccaca ttagaagata ccaaaatagt aaagattttg 240
 ctattcagtg gaatggatga ttcacaattt gatgacaaag gaaacaccgc attgtattat 300
 gcggttgata gtggtaacat gcaaacggtg aaactgtttg ttaagaaaaa ttggagactg 360
 atgttctatg gaaaaactgg atggaaaact tcattttatc atgccgtcat gcttaatgat 420
 gtaagtattg tatcatactt tctttcagaa ataccatcta cttttgatct ggctattctc 480
 cttagttgta ttcacaccac tataaaaaat ggacacgtgg atatgatgat tctcttgctc 540
 gactatatga cgtcgacaaa caccaataat tcccttctct tcattccgga cattaattg 600
 gctatagata ataaagacat tgagatgta caggctctgt tcaaatacga cattaatattc 660
 tactctgtta atctggaaaa tgtactattg gatgatgccg aaataactaa gatgattata 720
 gaaaagcatg ttgaatacaa gtctgactcc tatacaaaag atctcgatat cgtcaagaat 780
 aataaattgg atgaataat tagcaaaaac aaggaactca gactcatgta cgtcaattgt 840
 10 gtaaagaaaa actaa 855

<210> 7
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de K1L de Vaccinia Copenhagen (extracto de Genbank M35027.1) codificada por la SEC ID nº 6

20

<400> 7
 Met Asp Leu Ser Arg Ile Asn Thr Trp Lys Ser Lys Gln Leu Lys Ser
 1 5 10 15

ES 2 670 034 T3

Phe Leu Ser Ser Lys Asp Thr Phe Lys Ala Asp Val His Gly His Ser
 20 25 30

Ala Leu Tyr Tyr Ala Ile Ala Asp Asn Asn Val Arg Leu Val Cys Thr
 35 40 45

Leu Leu Asn Ala Gly Ala Leu Lys Asn Leu Leu Glu Asn Glu Phe Pro
 50 55 60

Leu His Gln Ala Ala Thr Leu Glu Asp Thr Lys Ile Val Lys Ile Leu
 65 70 75 80

Leu Phe Ser Gly Met Asp Asp Ser Gln Phe Asp Asp Lys Gly Asn Thr
 85 90 95

Ala Leu Tyr Tyr Ala Val Asp Ser Gly Asn Met Gln Thr Val Lys Leu
 100 105 110

Phe Val Lys Lys Asn Trp Arg Leu Met Phe Tyr Gly Lys Thr Gly Trp
 115 120 125

Lys Thr Ser Phe Tyr His Ala Val Met Leu Asn Asp Val Ser Ile Val
 130 135 140

Ser Tyr Phe Leu Ser Glu Ile Pro Ser Thr Phe Asp Leu Ala Ile Leu
 145 150 155 160

Leu Ser Cys Ile His Thr Thr Ile Lys Asn Gly His Val Asp Met Met
 165 170 175

Ile Leu Leu Leu Asp Tyr Met Thr Ser Thr Asn Thr Asn Asn Ser Leu
 180 185 190

Leu Phe Ile Pro Asp Ile Lys Leu Ala Ile Asp Asn Lys Asp Ile Glu
 195 200 205

Met Leu Gln Ala Leu Phe Lys Tyr Asp Ile Asn Ile Tyr Ser Val Asn
 210 215 220

Leu Glu Asn Val Leu Leu Asp Asp Ala Glu Ile Thr Lys Met Ile Ile
 225 230 235 240

Glu Lys His Val Glu Tyr Lys Ser Asp Ser Tyr Thr Lys Asp Leu Asp
 245 250 255

Ile Val Lys Asn Asn Lys Leu Asp Glu Ile Ile Ser Lys Asn Lys Glu
 260 265 270

Leu Arg Leu Met Tyr Val Asn Cys Val Lys Lys Asn
 275 280

5 <210> 8
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VACV-COP-D13L ORF

ES 2 670 034 T3

<400> 8

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

Lys Arg Ser Asn Val Phe Ala Val Asp Ser Gln Ile Pro Thr Leu Tyr
 20 25 30

Met Pro Gln Tyr Ile Ser Leu Ser Gly Val Met Thr Asn Asp Gly Pro
 35 40 45

Asp Asn Gln Ala Ile Ala Ser Phe Glu Ile Arg Asp Gln Tyr Ile Thr
 50 55 60

Ala Leu Asn His Leu Val Leu Ser Leu Glu Leu Pro Glu Val Lys Gly
 65 70 75 80

Met Gly Arg Phe Gly Tyr Val Pro Tyr Val Gly Tyr Lys Cys Ile Asn
 85 90 95

His Val Ser Ile Ser Ser Cys Asn Gly Val Ile Trp Glu Ile Glu Gly
 100 105 110

Glu Glu Leu Tyr Asn Asn Cys Ile Asn Asn Thr Ile Ala Leu Lys His
 115 120 125

Ser Gly Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Asp Ile Ser Ile Gly Leu Thr Pro
 130 135 140

Asn Asp Thr Ile Lys Glu Pro Ser Thr Val Tyr Val Tyr Ile Lys Thr
 145 150 155 160

Pro Phe Asp Val Glu Asp Thr Phe Ser Ser Leu Lys Leu Ser Asp Ser
 165 170 175

Lys Ile Thr Val Thr Val Thr Phe Asn Pro Val Ser Asp Ile Val Ile
 180 185 190

ES 2 670 034 T3

Arg Asp Ser Ser Phe Asp Phe Glu Thr Phe Asn Lys Glu Phe Val Tyr
 195 200 205
 Val Pro Glu Leu Ser Phe Ile Gly Tyr Met Val Lys Asn Val Gln Ile
 210 215 220
 Lys Pro Ser Phe Ile Glu Lys Pro Arg Arg Val Ile Gly Gln Ile Asn
 225 230 235 240
 Gln Pro Thr Ala Thr Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Ser Leu Ser
 245 250 255
 Val Tyr Thr Lys Pro Tyr Tyr Gly Asn Thr Asp Asn Lys Phe Ile Ser
 260 265 270
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Gln Asp Glu Lys Asp Tyr Ile Asp Ala Tyr Val
 275 280 285
 Ser Arg Leu Leu Asp Asp Leu Val Ile Val Ser Asp Gly Pro Pro Thr
 290 295 300
 Gly Tyr Pro Glu Ser Ala Glu Ile Val Glu Val Pro Glu Asp Gly Ile
 305 310 315 320
 Val Ser Ile Gln Asp Ala Asp Val Tyr Val Lys Ile Asp Asn Val Pro
 325 330 335
 Asp Asn Met Ser Val Tyr Leu His Thr Asn Leu Leu Met Phe Gly Thr
 340 345 350
 Arg Lys Asn Ser Phe Ile Tyr Asn Ile Ser Lys Lys Phe Ser Ala Ile
 355 360 365
 Thr Gly Thr Tyr Ser Asp Ala Thr Lys Arg Thr Ile Phe Ala His Ile
 370 375 380
 Ser His Ser Ile Asn Ile Ile Asp Thr Ser Ile Pro Val Ser Leu Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Gln Arg Asn Val Tyr Asn Gly Asp Asn Arg Ser Ala Glu Ser
 405 410 415
 Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile Asn Asp Pro Phe Ile Lys Gly Ile Asp
 420 425 430
 Phe Lys Asn Lys Thr Asp Ile Ile Ser Arg Leu Glu Val Arg Phe Gly
 435 440 445

ES 2 670 034 T3

Asn Asp Val Leu Tyr Ser Glu Asn Gly Pro Ile Ser Arg Ile Tyr Asn
 450 455 460

Glu Leu Leu Thr Lys Ser Asn Asn Gly Thr Arg Thr Leu Thr Phe Asn
 465 470 475 480

Phe Thr Pro Lys Ile Phe Phe Arg Pro Thr Thr Ile Thr Ala Asn Val
 485 490 495

Ser Arg Gly Lys Asp Lys Leu Ser Val Arg Val Val Tyr Ser Thr Met
 500 505 510

Asp Val Asn His Pro Ile Tyr Tyr Val Gln Lys Gln Leu Val Val Val
 515 520 525

Cys Asn Asp Leu Tyr Lys Val Ser Tyr Asp Gln Gly Val Ser Ile Thr
 530 535 540

Lys Ile Met Gly Asp Asn Asn
 545 550

<210> 9
 <211> 1680
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de codones optimizados para CHO codificante de SEC ID nº 1

<400> 9
 atgaacaaca ccatcatcaa ctccctgata ggcggcgacg actccatcaa gcggtccaac 60
 gtgttcgccc tggactccca gatccccacc ctgtacatgc cccagtacat ctccctgtcc 120
 ggcgtgatga ccaacgacgg ccctgacaac caggctatcg cctccttcga gatccgggat 180
 cagtacatca cgcacctgaa ccacctggtg ctgtccctgg aactgcccga agtgaagggc 240
 atgggcagat tcggctacgt gccctacgtg gggtacaagt gcatcaacca cgtgtccatc 300
 tccagctgca acggcgtgat ctgggaaatc gagggcgagg aactgtacaa caactgcatt 360
 aacaacacaa tcgccctgaa gcactccggc tactcctccg agctgaacga catctccatc 420
 ggctgaccc ccaacgacac catcaaagaa ccctccaccg tgtacgtgta catcaagacc 480
 cccttcgacg tgaagatac cttctccagc ctgaagctgt ccgactcaa gatcaccgtg 540
 accgtgacct tcaaccctgt gtccgacatc gtgatccggg actccagett cgacttcgag 600
 acattcaaca aagaatttgt gtacgtgccc gagctgtcct tcatcggcta catggtcaag 660
 aacgtgcaga tcaagcccag cttcatcgag aagcctogga gagtgatcgg ccagatcaac 720

ES 2 670 034 T3

cagcctaccg ccaccgtgac agaggtgcac gccgccacat ccctgagcgt gtacaccaag 780
 ccctactacg gcaacaccga caacaagttc atctcctacc ccggctacag ccaggacgag 840
 aaggactaca tcgacgccta cgtgtcccgg ctgctggacg acctcgtgat cgtgtctgat 900
 ggcccccta ccggctaccc tgagtctgcc gagatcgtgg aagtgcccgga ggacggcatc 960
 gtcagcatcc aggacgccga tgtgtatgtg aagatcgaca acgtgccaga caacatgtcc 1020
 gtgtacctgc acaccaacct gctgatgttc ggcaccogga agaattcctt catctacaac 1080
 atctccaaga agttctccgc catcaccggc acctactccg acgccaccaa ggggaccatc 1140
 ttcgcccaca tctcccacag catcaacatc atcgacacct ccatccccgt gtccctgtgg 1200
 acctctcaga gaaacgtgta caacggcgac aacagatccg ccgagtcca ggccaaggac 1260
 ctgttcatca acgaccctt catcaagggc atcgacttca agaacaagac cgacatcatc 1320
 tcccggctgg aagtgcgctt cggcaacgac gtgctgtact ccgagaacgg ccctatcagc 1380
 cggatctaca acgagctgct gaccaagtcc aacaacggca ccagaaccct gacctttaa 1440
 tttaccccc aagatcttctt ccggcccacc acctacccg ctaacgtgtc cagaggcaag 1500
 gacaagctga gcgtgcgggt ggtgtactcc acctggacg tgaaccacc catctactac 1560
 gtgcagaaac agctgggtgt cgtgtgcaac gatctgtaca aggtgtccta cgaccagggc 1620
 gtgtccatta ccaagatcat gggcgataac aacgactaca aggacgacga cgacaagtga 1680

5 <210> 10
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> cebador sintético

10 <400> 10
 aacacgtctc ggggggccgc caccatgaac aacacatca tcaa 44

15 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> cebador sintético

<400> 11
 caggaagacg cttttcact tgcgtcgtc gtcctgtag 40

20 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> proteína etiqueta Flag

<400> 12
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

30 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> péptido D13L

ES 2 670 034 T3

Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp Leu
 260 265 270

Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr
 275 280 285

Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu Phe Leu Glu
 290 295 300

Asn Gly Lys Pro His Gly Ile Met Cys Ser Ile Val Pro Leu Trp Arg
 305 310 315 320

Asn Asp Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ile Leu Lys Thr Met Asn Ser Asp
 325 330 335

Val Leu Gln His Ile Leu Ile Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Ile Asp
 340 345 350

Ile Ser Leu Val Glu Tyr Met Leu Glu Tyr Gly Ala Val Val Asn Lys
 355 360 365

Glu Ala Ile His Gly Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr
 370 375 380

Met Lys Tyr Leu Leu Lys Lys Glu Gly Gly Asp Ala Val Asn His Leu
 385 390 395 400

Asp Asp Gly Glu Ile Pro Ile Gly His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Gly
 405 410 415

Arg Tyr Asn Phe Tyr Thr Asp Thr Tyr Arg Gln Gly Phe Arg Asp Met
 420 425 430

Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr
 435 440 445

Leu Lys Asp Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Gly Glu Thr Leu Leu His
 450 455 460

Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Gln Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Glu
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Gly Tyr Thr Cys Ile
 485 490 495

Ala Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met Leu
 500 505 510

ES 2 670 034 T3

Leu Cys His Lys Pro Thr Leu Asp Cys Val Ile Asp Ser Leu Arg Glu
515 520 525

Ile Ser Asn Ile Val Asp Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Gln Cys Ile Arg
530 535 540

Tyr Ala Met Ile Ile Asp Asp Cys Ile Ser Ser Lys Ile Pro Glu Ser
545 550 555 560

Ile Ser Lys His Tyr Asn Asp Tyr Ile Asp Ile Cys Asn Gln Glu Leu
565 570 575

Asn Glu Met Lys Lys Ile Ile Val Gly Gly Asn Thr Met Phe Ser Leu
580 585 590

Ile Phe Thr Asp His Gly Ala Lys Ile Ile His Arg Tyr Ala Asn Asn
595 600 605

Pro Glu Leu Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Lys Gln Asn Lys Ile Tyr Val
610 615 620

Glu Val Tyr Asp Ile Ile Ser Asn Ala Ile Val Lys His Asn Lys Ile
625 630 635 640

His Lys Asn Ile Glu Ser Val Asp Asp Asn Thr Tyr Ile Ser Asn Leu
645 650 655

Pro Tyr Thr Ile Lys Tyr Lys Ile Phe Glu Gln Gln
660 665

<210> 19
<211> 2903
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencia del casete de expresión de CP77+DsRed

<400> 19
gcgcgcacac taaattattt tttattaata attgtacaag tttttgatct ggtataaata 60
cattcaaaaa tgataattta atgacattag ttgtgcgggt gtatagagtt cacagtagct 120
cattcacttc tattcagtca aaatgtttga ttatctggaa aatgaggagg tggctctoga 180
tgaacttaaa cagatgttga gagatagaga tcctaatgat accaggaacc aattcaagaa 240
taatgctcta catgcatacc ttttcaatga gcactgtaat aatggtgagg ttgtcaaact 300
actactagac agtggacta atccattaca caaaaattgg agacagctta ctccattagg 360
ggaatacaca aatagtagac atggtaaagt taataaggat atagcgatgg ttctactaga 420

ES 2 670 034 T3

agctactgga tatagcaaca taaatgactt taatatattc acctatatga aatccaaaaa 480
 tgtagatatt gacttgataa aggtattggt agaacatgga tttgatttta gtgttaaatg 540
 cgaaaaacat cattcagtta tagaaaatta tgtaatgaca gatgatcctg ttcctgaaat 600
 tattgattta ttcatagaaa atggatgcag tgttatttat gaggacgagg atgatgagta 660
 cggatacgcg tatgaagaat atcactcaca aatgacgat tatcaaccac gaaattgagg 720
 tacagtatta catctgtata tcatctctca tctgtattca gaggcggatt cgagatcatg 780
 tgtgaaccgg gaagttgta aatgtctgat taatcatgga atcaaccat cttctataga 840
 taaaaactat tgtacagctc ttcaatatta tattaagtca tctcatatag atatagacat 900
 cgttaaattg ttaatgaaag gaatagataa cacggcttat tcatatatag acgatctaac 960
 atgttgact cgaggaatta tggctgatta tctaaatagt gattatagat acaataaaga 1020
 tgtagattta gatttggtca aattgttttt ggagaatgga aaaccgcacg gaataatgtg 1080
 tagtattgta ccaactatgga gaaatgataa ggaaaccatc tctttgatat tgaaaacaat 1140
 gaactcggat gtccccaac atataactaat tgagtatata acattcagcg atactgatat 1200
 ctctctagtg gaatacatgt tggaatatgg agctgtggta aataaagagg ctattcacgg 1260
 atactttaa aatattaata ttgattctta cacgatgaaa tatctactaa aaaaggagg 1320
 gggagatgcc gtcaatcacc tcgatgatgg agagatcccg attggacacc tatgtaaatc 1380
 caactatgga cgttataatt tctacactga tacatacaga cagggttttc gtgatatgtc 1440
 ttatgcttgc ccaattctta gtactataaa catttgccca ccttatctta aagacattaa 1500
 catgattgac aaacgaggag aaacacttct tcacaaggct gttagatata ataaacaatc 1560
 tctagtgtct ttactgctag aatccggttc agatgtcaac attagatcaa ataacggata 1620
 tacatgtata gccattgcaa tcaacgaatc tagaaacatt gaactgctga acatgetatt 1680
 atgtcataaa cctacattag attgtgtgat tgattcattg agagaaatat ctaacatagt 1740
 agataatgcc tatgctataa aacaatgat tagatatgcc atgattatag atgactgtat 1800
 atcgtctaag attccagagt ccataagtaa acaactataat gattatatag atatttgcaa 1860
 tcaagaattg aacgagatga aaaaaataat agtgggaggc aacactatgt tctcattaat 1920
 atttactgat catggagcta aaattattca tcggatgcc aataatccag aattacgtgc 1980
 gtattatgag tcaaaacaaa ataaaatata cgtggaagta tatgatatta tttccaatgc 2040
 gatagtgaag cataataaaa ttcataaaaa catagaatca gttgatgaca atacctacat 2100
 ttctaatttg cttataacca tcaaatataa aatattcgag caacaataag tattttttat 2160
 caaaaaattg aaattttatt tttttttttt ggaatataaa taatatggat agcactgaga 2220
 acgtcatcaa gcccttcatg cgcttcaagg tgcacatgga gggctccgtg aacggccacg 2280

ES 2 670 034 T3

	agttcgagat cgagggcgag ggcgagggca agccctacga gggcaccag accgccaagc	2340
	tgcaggtgac caagggcggc cccctgccct tgcctgga catcctgtcc cccagttcc	2400
	agtacggctc caaggtgtac gtgaagcacc ccgccacat ccccgactac aagaagctgt	2460
	ccttccccga gggcttcaag tgggagcgcg tgatgaactt cgaggacggc ggcgtggtga	2520
	ccgtgaccca ggactcctca ctgcaggacg gcacctcat ctaccacgtg aagttcatcg	2580
	gcgtgaactt cccctccgac ggcctcgtaa tgcagaaga gactctgggc tgggagccct	2640
	ccaccgagcg cctgtacccc cgcgacggcg tgctgaaggc cgagatccac aaggcgtga	2700
	agctgaaggc cggcggccac tacctggtgg agttcaagtc aatctacatg gccaagaagc	2760
	ccgtgaagct gcccggtac tactacgtgg actccaagct ggacatcacc tcccacaacg	2820
	aggactacac cgtggtggag cagtacgaac gcgccgagc ccgccaccac ctgttccagt	2880
	agtttttata tttaatgcg cgc	2903
	<210> 20	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
	<400> 20	
10	tacaaaatca aataatggtc gaaac	25
	<210> 21	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> cebador sintético	
15	<400> 21	
	tgccaagaaa acactcctc taagacaat	29
	<210> 22	
20	<211> 6809	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> vector de recombinación homóloga pLL09 para la delección de D13L de VACV-COP con CP77/selección con DsRed	
	<400> 22	
	tgcgcggtt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
	ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
	accatagcgt gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggccc	240
	attcgccatt caggtgcgc aactgttggg aaggcgcgac ggtgcgggcc tcttcgctat	300
30	tacgccagct ggcgaaaggc ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccaggtg	360

ES 2 670 034 T3

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg acccggggat 420
 cacgaaaaat aatagtaacc aattagtatg ggaaaacttt ttagcacata tgagatctaa 480
 aaaacgtggt actatggtag aggattatgg acacgagtac gttttttag atgagaggtt 540
 ttctacttgc tcattagaag tataaaaaaa tagttccgta attaaatggc taagcgagta 600
 agccttcag atgtggttat ttcagcacct aaagcagtct ttaagcccg taagaagaa 660
 gcactcgctt gtatactacc aaagtattat aaatctatgg cagatgtgct tattaagaca 720
 aatagtgtaa ttgataagtg ttggttttgt aatcaagatt tggtttttag acctattagt 780
 attgagacat acaagggtgg tgaagtaggg tatttctgtt ctaaaatatg tagggattcg 840
 ttggcttcta tggttaagtc tcacgtagct cttagagaag aacccaaaaat ttctttgttg 900
 cctttagtat tctatgaaga taaggaaaag gttataaata caataaactt actaagagat 960
 aaagacggcg tttacggaag ctgttacttt aaggaaaact cacaaattat agatatttct 1020
 ctacggagtt tattgtaagc tttttccacg cgcacactaa attattttttt attaataatt 1080
 gtacaagttt ttgatctggt ataaatacat tcaaaaatga taatttaatg acattagttg 1140
 tgcgggtgta tagagttcac agtagctcat tcacttctat tcagtcaaaa tgtttgatta 1200
 tctggaaaat gaggaggtgg ctctcgatga acttaaacag atggtgagag atagagatcc 1260
 taatgatacc aggaaccaat tcaagaataa tgctctacat gcataccttt tcaatgagca 1320
 ctgtaataat gttgaggttg tcaaactact actagacagt ggtactaato cattacacaa 1380
 aaattggaga cagcttactc cattagggga atacacaaat agtagacatg gtaaagttaa 1440
 taaggatata gcgatggttc tactagaagc tactggatat agcaacataa atgactttaa 1500
 tatattcacc tatatgaaat ccaaaaatgt agatattgac ttgataaagg tattggtaga 1560
 acatggattt gatttttagtg ttaaattgca aaaacatcat tcagttatag aaaattatgt 1620
 aatgacagat gatcctgttc ctgaaattat tgatttattc atagaaaatg gatgcagtgt 1680
 tatttatgag gacgaggatg atgagtacgg atacgcgtat gaagaatato actcacaaaa 1740
 tgacgattat caaccacgaa attgcggtac agtattacat ctgtatatca tctctcatct 1800
 gtattcagag tcggattcga gatcatgtgt gaaccggaa gttgttaaat gtctgattaa 1860
 tcatggaatc aacctatctt ctatagataa aaactattgt acagctcttc aatattatat 1920
 taagtcatct catatagata tagacatcgt taaattgtta atgaaaggaa tagataacac 1980
 ggcttattca tatatagacg atctaacatg ttgtactoga ggaattatgg ctgattatct 2040
 aaatagtgat tatagataca ataaagatgt agatttagat ttggtcaaat tgtttttgga 2100
 gaatggaaaa ccgcacggaa taatgtgtag tattgtacca ctatggagaa atgataagga 2160
 aacctatctt ttgatattga aaacaatgaa ctoggatgct ctccaacata tactaattga 2220
 gtatataaca ttcagcgata tcgatatctc tctagtggaa tacatgttgg aatatggagc 2280

ES 2 670 034 T3

tgtggtaaat aaagaggcta ttcacggata ctttaaaaaat attaatatg attcttacac	2340
gatgaaatat ctactaaaaa aggaaggggg agatgccgtc aatcatctcg atgatggaga	2400
gatcccgatt ggacacctat gtaaatccaa ctatggacgt tataatttct acactgatac	2460
atacagacag ggTTTTcgtg atatgtctta tgcttgccca attcttagta ctataaacat	2520
ttgcctacct tatcttaaag acattaacat gattgacaaa cgaggagaaa cacttcttca	2580
caaggctggt agatataata aacaatctct agtgtcttta ctgctagaat cgggttcaga	2640
tgtcaacatt agatcaaata acggatatac atgtatagcc attgcaatca acgaatctag	2700
aaacattgaa ctgctgaaca tgctattatg tcataaacct acattagatt gtgtgattga	2760
ttcattgaga gaaatatcta acatagtaga taatgcctat gctataaaac aatgtattag	2820
atatgccatg attatagatg actgtatatc gtctaagatt ccagagtcca taagtaaaca	2880
ctataatgat tatatagata tttgcaatca agaattgaac gagatgaaaa aaataatagt	2940
gggaggcaac actatgttct cattaatatt tactgatcat ggagctaaaa ttattcatcg	3000
gtatgccaat aatccagaat tacgtgcgta ttatgagtca aaacaaaata aaatatacgt	3060
ggaagtatat gatattatTTT ccaatgcgat agtgaagcat aataaaattc ataaaaacat	3120
agaatcagtt gatgacaata cctacatttc taatttgcct tataccatca aatacaaaat	3180
attcgagcaa caataagtat tttttatcaa aaaattgaaa ttttattttt tttttttgga	3240
atataaataa tatggatagc actgagaacg tcatcaagcc ctccatgcgc ttcaaggtgc	3300
acatggaggg ctccgtgaac ggccacgagt tcgagatcga gggcgagggc gagggcaagc	3360
cctacgaggg caccagacc gccaaagctgc aggtgaccaa gggcgggccc ctgcccttcg	3420
cctgggacat cctgtcccc cagttccagt acggctccaa ggtgtacgtg aagcaccocg	3480
ccgacatccc cgactacaag aagctgtcct tccccagggc cttcaagtgg gagegcgtga	3540
tgaacttcga ggacggcggc gtggtgaccg tgaccagga ctccctactg caggacggca	3600
ccttcatcta ccacgtgaag ttcatoggcg tgaacttccc ctccgacggc cccgtaatgc	3660
agaagaagac tctgggctgg gagccctcca ccgagcgcct gtacccccgc gacggcgtgc	3720
tgaagggcga gatccacaag gcgctgaagc tgaagggcgg cggccactac ctggtggagt	3780
tcaagtcaat ctacatggcc aagaagcccg tgaagctgcc cggctactac tacgtggact	3840
ccaagctgga catcacctcc cacaacgagg actacaccgt ggtggagcag tacgaacgcg	3900
ccgagggccc ccaccactg ttcagtagt ttttatattt aaatgcgcgc aataatggaa	3960
caagaaccct aacttttaac tttacaccaa agatattctt taggccgaca actattacgg	4020
ccaatgtatc tagggggaaa gataaactat ctgttcgagt agtttattcc accatggatg	4080
tcaaccatcc aatctattat gtacaaaaac aattggtagt tgtatgtaat gacctgtata	4140

ES 2 670 034 T3

aggtatctta cgatcaaggg gtaagtatta ccaagattat gggagataat aactaataat 4200
 aatgaaaaca aactatagag ttgtaaagtg atgaaattgt aaaaaatato cgggagggaa 4260
 cgcattgtct tcttccattt tatgaaacat tgccagaact taatctgtct ctaggtaaaa 4320
 gccattacc tagtctggaa tacggagcta attactttct tcagatttct agagttaatg 4380
 atctaaatag aatgccgacc gacatgttaa aactttttac acatgatato atgttaccag 4440
 aaagcgatct agataaagtc tatgaaattt taaagattaa tagcgtaaag tattatggga 4500
 ggagtactaa agcggagcgc gtagttgccg acctcagcgc gatcctctag agtcgacctg 4560
 caggcatgca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 4620
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 4680
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 4740
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgc gtttgcgtat 4800
 tgggcgctct tccgcttctc cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 4860
 agcggtatca gctcactcaa agcgggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4920
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agcgcgcgtt 4980
 gctggcgttt tccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaato gacgctcaag 5040
 tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 5100
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 5160
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt 5220
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcaoga acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt 5280
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccg ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 5340
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 5400
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa 5460
 gccagttacc ttcgaaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaaa ccaccgctgg 5520
 tagcgggtgt ttttttggtt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 5580
 agatccttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 5640
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5700
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 5760
 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 5820
 ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 5880
 gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5940
 aaggcccgag cgcagaagtg gtccctcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 6000
 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 6060

ES 2 670 034 T3

tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc 6120
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 6180
 cggctcctccg atcgttggtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 6240
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 6300
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 6360
 gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa 6420
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 6480
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 6540
 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 6600
 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt taccagggtt attgtctcat 6660
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt 6720
 tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 6780
 aatataggcgt atcacgaggc cctttcgtc 6809

<210> 23
 <211> 11161
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> pLL19 vector transductor mediada por transposón de codones optimizados para CHO etiqueta-D13L para la integración en el ADN genómico nuclear de la célula

10

<400> 23
 tcagaattgg ttaattggtt gtaaacactga cccctatttg tttatttttc taaatacatt 60
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaa 120
 ggaagaatat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg 180
 atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa 240
 tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt tctgaaacat ggcaaaggta 300
 gcggtgcaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc 360
 cacttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctcaccactg 420
 cgatccccgg aaaaacagcg ttccaggtat tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata 480
 ttgttgatgc gctggcagtg ttctcgccc ggttgactc gattcctgtt tgtaattgtc 540
 cttttaacag cgatcgcgta tttcgcctcg ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt 600
 tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga 660
 aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagc cgtcactcat ggtgatttct 720

ES 2 670 034 T3

cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag 780
 tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg gaactgcctc ggtgagtttt 840
 ctccctcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata 900
 aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaact catgacccaa atcccttaac 960
 gtgagttacg cgcgcgctcg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 1020
 ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 1080
 accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 1140
 cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt tagcccacca 1200
 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 1260
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 1320
 taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 1380
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga 1440
 agggagaaag gcggacaggt atccggtaa cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 1500
 ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg 1560
 acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag 1620
 caacgcgcc ttttaacgg tccctggcct ttgctggcct tttgctcaca tgttcttcc 1680
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 1740
 tctcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat caatattggc 1800
 tattggccat tgcatacgtt gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt 1860
 ccaatatgac cggcatggtg gcattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg 1920
 gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgta cataacttac ggtaaatggc 1980
 ccgctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc 2040
 atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact 2100
 gcccacttg cagtacatca agtgtatcat atgccaaagtc cgccccctat tgacgtcaat 2160
 gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttctact 2220
 tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgtc attaccatgc tgatgcggtt ttggcagtac 2280
 accaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac 2340
 gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac 2400
 cccgccccgt tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga 2460
 gctcgtttag tgaaccgtca gatcactaga agctttattg cggtagttta tcacagttaa 2520
 attgetaacg cagtcaggcc aacatgggct ctagcctgga cgacgagcac atcctgagcg 2580
 ccctgctgca gagcgacgac gaactggtgg gcgaggacag cgacagcgag gtcagcgacc 2640

ES 2 670 034 T3

acgtgtccga ggacgacgtg cagtccgaca ccgaggaagc cttcatcgac gaggtgcacg 2700
 aagtgcagcc taccagcagc ggctccgaga tcctggacga gcagaacgtg atcgagcagc 2760
 ctggcagctc cctggccagc aacagaaatcc tgaccctgcc ccagagaacc atcagaggca 2820
 agaacaagca ctgctggtcc acctccaaga gcaccaggcg gagcagagtg tccgccctga 2880
 acatcgtgcg gagccagagg ggccccacca gaatgtgcag aaacatctac gaccccctgc 2940
 tgtgcttcaa gctgttcttc accgacgaga tcatcagcga gatcgtgaag tggaccaacg 3000
 ccgagatcag cctgaagagg cgggagagca tgaccagcgc caccttcaga gacaccaacg 3060
 aggacgagat ctacgccttc ttccgcatcc tggatgatgac cgcctgaga aaggacaacc 3120
 acatgagcac cgacgacctg ttcgacagat ccctgagcat ggtgtacgtg tccgtgatga 3180
 gcagagacag attcgacttc ctgatcagat gcctgagaat ggacgacaag agcatcagac 3240
 ccaccctgcg ggagaacgac gtgttcaccc ccgtgcggaa gatctgggac ctgttcatcc 3300
 accagtgcac ccagaactac acccctggcg cccacctgac catcgatgag cagctgctgg 3360
 gcttcagagg cagatgcccc ttcagagtgt acatcccca caagcccagc aagtacggca 3420
 tcaagatcct gatgatgtgc gacagcggca ccaagtacat gatcaacggc atgccctacc 3480
 tgggcagagg caccagaca aacggcgtgc ccctgggcga gtactacgtg aaagaactga 3540
 gcaagcctgt gcatggcagc tgcaggaaca tcacatgcga caactggttc accagcatcc 3600
 ccctggccaa gaacctctg caggaaccct acaagctgac catcgtgggc accgtgcgga 3660
 gcaacaagcg ggagatccca gagtgctga agaacagcag atccagacct gtgggaacaa 3720
 gcattgtctg cttcgacggc cccctgaccc tgggtgtccta caagccaag cccgccaaga 3780
 tgggtgacct cctgtccagc tgcgacgagg acgccagcat caacgagagc accggcaagc 3840
 cccagatggt gatgtactac aaccagacca agggcggcgt ggacacctg gaccagatgt 3900
 gcagcgtgat gacatgcagc agaaagacca acagatggcc tatggccctg ctgtacggca 3960
 tgatcaatat cgcctgcatc aacagcttca tcatctacag ccacaacgtg tccagcaagg 4020
 gcgagaaggt gcagagccgg aagaaattca tgcggaacct gtacatgagc ctgacctca 4080
 gcttcatgag aaagagactg gaagcccca ccctgaagag atacctccgg gacaacatca 4140
 gcaacatcct gcccaaggaa gtgccaggaa caagcgacga cagcaccgag gaaccctgga 4200
 tgaagaagag gacctactgc acctactgtc ccagcaagat cagaagaaag gccaacgcca 4260
 gctgcaagaa atgcaaaaa gtgatctgcc gggagcacia catcgacatg tgccagagct 4320
 gtttctgatt cagacatgat aagatacatt gatgagttt gacaaaccac aactagaatg 4380
 cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 4440
 ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 4500

ES 2 670 034 T3

ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taagcaggtt 4560
 taaccctaga aagatagtct gcgtaaaatt gacgcatgca ttcttgaat attgctctct 4620
 ctttctaagt agcgcgaatc cgtcgtgtg catttaggac atctcagtcg ccgcttgag 4680
 ctcccgtgag gcgtgcttgt caatgcggta agtgtcactg attttgaact ataacgaccg 4740
 cgtgagtcaa aatgacgcat gattatcttt tacgtgactt ttaagattta actcatacga 4800
 taattatatt gttatttcat gtttacttta cgtgataact tattatata atattttctt 4860
 gttatagata tctttcttta tgttttaaat gcaactgacct cccacattcc ctttttagta 4920
 aaatattcag aaataattta aatacatcat tgcaatgaaa ataaatgttt ttatttaggc 4980
 agaatccaga tgctcaaggc ccttcataat atccccagt ttagtagttg gacttaggga 5040
 acaaaggaac ctttaataga aattggacag caagaaagcg agtcagaaga actcgtcaag 5100
 aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaa gcacgaggaa 5160
 gcggtcagcc cattcgcgc caagttcttc agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc 5220
 ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt 5280
 ttccaccatg atattcggca agcagcctc gccatgggtc acgacgagat cctcgcctc 5340
 gggcatgccc gccttgagcc tggcgaacag ttgggtggc gcgagccct gatgttcttc 5400
 gtccagatca tctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgag 5460
 atgtttcgtc tgggtggtcga atggacaggt agccggatca agcgtatgca gccgccgat 5520
 tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg 5580
 ccccggaact tcgccaata gcagccagtc ccttcccgtc tcagtgaaa cgtcgagcac 5640
 agctgagcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgctt cgtcctgag 5700
 ttcatcagc gcaccggaca ggtcgttctt gacaaaaaga accgggccc cctgctgga 5760
 cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagc catagccgaa 5820
 tagcctctcc acccaagcgg ccggagagcc tgcgtgcaat ccatcttgtt caatcatggt 5880
 ggcgagcaga aggcccgag atgaggaaga ggagaacagc gcggcagacg tgcgcttttg 5940
 aagcgtgagc aatgccgggc ctccggagga ccttcgggag cccgccccgc ccctgagccc 6000
 gccctgagc ccgccccgg acccaccctc tcccagcctc tgagcccaga aagcgaagga 6060
 gcaaagctgc tattggccgc tgccccaaag gcctaccgc ttccattgct cagcgggtgct 6120
 gtccatctgc acgagactag tgagtcgtgc taactccatt tgtcacgtcc tgcacgagc 6180
 gagctgcccg gcggggggga acttctgac taggggagga gtagaaggcg gcgcaaggc 6240
 gccaccaaag aacggagccg gttggcgcct accggtggat gtggaatgtg tgcgagcca 6300
 gaggccactt gtgtagcgc aagtgccag cggggtgctt aaagcgcagc ctccagactg 6360
 ccttgggaaa agcgcctccc ctaccggta gagaaacttg atctgtcgc gcaattcaag 6420

ES 2 670 034 T3

cttcgtgagg ctccggtgcc cgtcagtgac ctgctatact ctggagacgg cacatcgccc 6480
 acagtccccg agaagttggg aggggtcggc aattgaaccg gtgcctagag aaggtggcgc 6540
 ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttcccga gggtggggga 6600
 gaaccgtata taagtgcagt agtcgocgtg aacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgcc 6660
 agaacacagg taagtgccgt gtgtggttcc cgcgggcctg gcctctttac gggttatggc 6720
 ccttgcgtgc cttgaattac ttccacctgg ctccagtagc tgattcttga tcccagagtg 6780
 gagccagggg cgggccttgc gcttaggag ccccttcgcc tcgtgcttga gttgaggcct 6840
 ggcctgggcg ctggggccgc cgcgtgcgaa tctgggtggca ccttcgcgcc tgtctcgtg 6900
 ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacg tgctgcgacg ctttttttct 6960
 ggcaagatag tcttgtaaat gcgggccagg atctgcacac tggatatttcg gtttttgggc 7020
 ccgcggccgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgcacatg ttcggcgagg cggggcctgc 7080
 gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct gctctggtgc 7140
 ctggcctcgc gccgccgtgt atcgcgccgc cctgggcggc aaggctggcc cggtcggcac 7200
 cagttcgtg agcggaaaaga tggccgcttc ccggccctgc tccagggggc tcaaaatgga 7260
 ggacgcggcg ctccgggagag cgggcgggtg agtcaccac acaaaggaaa agggcctttc 7320
 cgtcctcagc cgtcgttca tgtgactcca cggagtaccg ggcgcctcc aggcacctcg 7380
 attagttctg gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg ttttatgca 7440
 tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg cacttgatgt 7500
 aattctcctt ggaatttggc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc aagcctcaga 7560
 cagtgttca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg aacacgtctc ggggggccgc 7620
 caccatgaa caacaccatc atcaactccc tgatcggcgg cgacgactcc atcaagcgg 7680
 ccaacgtgtt cgccgtggac tcccagatcc ccaccctgta catgccccag tacatctccc 7740
 tgtccggcgt gatgaccaac gacggccctg acaaccaggc tatcgcctcc ttcgagatcc 7800
 gggatcagta catcaccgcc ctgaaccacc tgggtcgtgc cctggaactg cccgaagtga 7860
 agggcatggg cagattcggc tacgtgccct acgtgggcta caagtgcac aaccacgtgt 7920
 ccctctccag ctgcaacggc gtgatctggg aatcgaggg cgaggaactg tacaacaact 7980
 gcattaacaa cacaatgcc ctgaagcact ccggctactc ctccgagctg aacgacatct 8040
 ccctcggcct gacccccaac gacaccatca aagaaccctc caccgtgtac gtgtacatca 8100
 agacccccct cgacgtggaa gataccttct ccagcctgaa gctgtccgac tccaagatca 8160
 ccgtgaccgt gaccttcaac cctgtgtccg acatcgtgat ccgggactcc agcttcgact 8220
 tcgagacatt caacaaagaa tttgtgtacg tgcccagct gtccttcac ggctacatgg 8280

ES 2 670 034 T3

tcaagaacgt gcagatcaag cccagcttca tcgagaagcc tcggagagtg atcggccaga	8340
tcaaccagcc taccgccacc gtgacagagg tgcacgccgc cacatccctg agcgtgtaca	8400
ccaagcccta ctacggcaac accgacaaca agttcatctc ctaccccggc tacagccagg	8460
acgagaagga ctacatcgac gcctacgtgt cccggetgct ggacgacctc gtgatcgtgt	8520
ctgatggccc ccctaccggc taccctgagt ctgccgagat cgtggaagtg cccgaggacg	8580
gcatcgtcag catccaggac gccgatgtgt atgtgaagat cgacaacgtg ccagacaaca	8640
tgtccgtgta cctgcacacc aacctgctga tgttcggcac ccggaagaat tccttcatct	8700
acaacatctc caagaagttc tccgccatca ccggcaccta ctccgacgcc accaagcggg	8760
ccatcttcgc ccacatctcc cacagcatca acatcatcga cacctccatc cccgtgtccc	8820
tgtggacctc tcagagaaac gtgtacaacg gcgacaacag atccgccgag tccaaggcca	8880
aggacctgtt catcaacgac cccttcatca agggcatcga cttcaagaac aagaccgaca	8940
tcctctccc gctggaagtg cgcttcggca acgacgtgct gtactccgag aacggcccta	9000
tcagccggat ctacaacgag ctgctgacca agtccaacaa cggcaccaga accctgacct	9060
ttaactttac cccaagatc ttcttccggc ccaccacat caccgctaac gtgtccagag	9120
gcaaggacaa gctgagcgtg cgggtggtgt actccacat ggacgtgaa caccctctct	9180
actacgtgca gaaacagctg gtggtcgtgt gcaacgatct gtacaagtg tcctacgacc	9240
agggcgtgtc cattaccaag atcatggcg ataacaacga ctacaaggac gacgacgaca	9300
agtgaaaaag cgtcttctctg ttctcatcac atcatatcaa ggttatatac catcaatatt	9360
gccacagatg ttacttagcc ttttaattt totctaattt agtgtatatg caatgatagt	9420
tctctgattt ctgagattga gtttctcatg tgtaatgatt atttagagtt tctotttcat	9480
ctgttcaaat ttttgtctag ttttatttt tactgatttg taagacttct ttttataatc	9540
tgcatattac aattctcttt actggggtgt tgcaaatatt ttctgtcatt ctatggcctg	9600
acttttctta atggtttttt aattttaaaa ataagtctta atattcatgc aatotaatta	9660
acaatctttt ctttgtggtt aggactttga gtcataagaa atttttctct aactgaagt	9720
catgatggca tgcttctata ttattttcta aaagatttaa agttttgcct tctccattta	9780
gacttataat tcaactggaat tttttgtgt gtatggtatg acatatgggt tcccttttat	9840
ttttacata taaatatatt tccctgtttt tctaaaaaag aaaaagatca tcattttccc	9900
attgtaaaat gccatatttt ttctataggt caottacata tatcaatggg tctgtttctg	9960
agctctactc tattttatca gcctcactgt ctatccccac acatctcatg ctttgctcta	10020
aatcttgata tttagtgga cattctttcc cattttgttc tacaagaata tttttgttat	10080
tgtctttggg ctttctatat acattttgaa atgaggttga caagttaata atcaacctct	10140
ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc cttttacgct	10200

ES 2 670 034 T3

atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta tggctttcat	10260
tttctcctcc ttgtataaat cctgggtgct gtctctttat gaggagtgtg ggcccgttgt	10320
caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg gttggggcat	10380
tgccaccacc tgcagctcc tttccgggac tttcgtttc cccctcccta tggccacggc	10440
ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt tgggcactga	10500
caattccgtg gtgttgctgg ggaatcatc gtcctttcct tggctgctcg cctgtgttg	10560
cacctggatt ctgcgcggga cgctcttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcga	10620
ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgcctcttc gccttcgccc	10680
tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgcat cgcctgctat tgtcttgcca	10740
atcctcccc ttgctgtcct gcccacccc acccccaga atagaatgac acctactcag	10800
acaatgcgat gcaatttcct cattttatta ggaaaggaca gtgggagtgg caccttccag	10860
ggtcaaggaa ggcacggggg aggggcaaac aacagatggc tggcaactag aaggcacatt	10920
tgttacttta tagaagaaat tttgagtttt tgtttttttt taataaataa ataaacataa	10980
ataaattggt tgttgaattt attattagta tgtaagtgta aatataataa aacttaatat	11040
ctattcaaat taataaataa acctcgatat acagaccgat aaaacacatg cgtcaatttt	11100
acgcatgatt atctttaacg tacgtcacia tatgattatc tttctagggt taagaagact	11160
g	11161

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula de mamífero modificada en la que el genoma de la célula ha sido modificado para comprender una secuencia codificante de CP77 bajo el control de un promotor constitutivo, de manera que la línea celular modificada proporciona soporte a la propagación de un poxvirus que es menos capaz o es incapaz de propagarse en la célula no modificada y en la que el genoma de la célula comprende además una secuencia codificante de D13L bajo el control de un promotor constitutivo.
- 10 2. Célula según la reivindicación 1, en la que el genoma de la célula comprende además una secuencia codificante de K1L bajo el control de un promotor.
3. Célula según la reivindicación 1 o 2, en la que la célula es una línea celular continua.
- 15 4. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula es una célula CHO.
5. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la célula es una célula humana, una célula de primate, una célula de hámster o una célula de conejo.
- 20 6. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la expresión del gen K1L se encuentra bajo el control de un promotor de mamífero constitutivo.
7. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la expresión del gen CP77 proporciona soporte a la propagación del virus, generando rendimientos víricos equivalentes a los observados en una línea celular permisiva.
- 25 8. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la expresión del gen CP77 proporciona soporte a una proporción de amplificación de la replicación vírica superior a 500.
- 30 9. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que CP77 se encuentra codificado por una secuencia contigua de nucleótidos de codones optimizados para la expresión en células de mamífero.
- 35 10. Procedimiento para la propagación de un ortopoxvirus que no se propaga en células CHO, en el que el procedimiento comprende propagar el poxvirus in vitro en una línea celular de mamífero, en la que la línea celular es modificada para codificar y expresar CP77 bajo el control de un promotor constitutivo y expresar D13L bajo el control de un promotor constitutivo.
- 40 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la línea celular modificada se modifica para codificar y expresar K1L bajo el control de un promotor.
12. Procedimiento según la reivindicación 10 o 11, en el que la línea celular modificada es una célula humana, una línea celular de primate, una línea celular de hámster o una línea celular de conejo.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la línea celular es una línea celular CHO.