

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 304 880**

21 Número de solicitud: 200700882

51 Int. Cl.:
C07K 14/18 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **03.04.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2008**

Fecha de la concesión: **13.10.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **27.10.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.10.2009

73 Titular/es: **Proyecto de Biomedicina CIMA, S.L.**
c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5, Planta Baja
31180 Zizur Mayor, Navarra, ES

72 Inventor/es: **Smerdou Picazo, Cristian;**
Casales Zoco, Erkuden;
Rodríguez Madoz, Juan Roberto;
Razquin Erro, Nerea;
Cuevas Labrador, Yolanda;
Ruiz Guillén, Marta y
Prieto Valtueña, Jesús

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

54 Título: **Uso de un vector viral mutado para la generación *in vitro* de líneas celulares estables.**

57 Resumen:

Uso de un vector viral mutado para la generación *in vitro* de líneas celulares estables. La presente invención se refiere al uso de vectores virales mutados para la generación *in vitro* de líneas celulares estables y la producción de proteínas de forma constitutiva. Mediante la transfección de líneas celulares con dicho vector mutado se consiguen líneas celulares no citopáticas las cuales, sorprendentemente, se mantienen estables y sintetizan proteínas heterólogas de forma constitutiva.

ES 2 304 880 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de un vector viral mutado para la generación *in vitro* de líneas celulares estables.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se puede englobar dentro del campo de la ingeniería genética. Concretamente la invención se refiere al uso de vectores virales mutados para la generación *in vitro* de líneas celulares estables y la producción de proteínas de forma constitutiva.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han desarrollado vectores de expresión de alfavirus a partir de diferentes virus, que incluyen el virus Sindbis (SIN) (34), el virus del Bosque de Semliki (SFV) (18) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) (25). Normalmente, los vectores de alfavirus están basados en replicones de ARN en los que los genes estructurales se han sustituido por un gen heterólogo. El replicón del alfavirus contiene una ORF que codifica la replicasa (Rep) vírica en su extremo 5', que se traduce cuando el ARN se transfecta en células eucariotas. La Rep se expresa como una poliproteína que se procesa, posteriormente, en cuatro subunidades (nsps 1 a 4) (30). La Rep sin procesar puede copiar el vector de ARN en una cadena negativa de ARN, un proceso que sólo tiene lugar durante las primeras 3 a 4 horas tras la transfección o infección. Una vez procesada, la Rep utilizará el ARN de cadena negativa como molde para sintetizar más moléculas del replicón. La Rep procesada también puede reconocer una secuencia interna en el ARN de cadena negativa, o promotor subgenómico, a partir del cual sintetizará un ARN de cadena positiva subgenómico que corresponde al extremo 3' del replicón. Este ARN subgenómico se traducirá para producir la proteína heteróloga en grandes cantidades. El ARN del replicón también se puede empaquetar en partículas víricas mediante la cotransfección de las células con uno o más ARN auxiliares que son capaces de proporcionar las proteínas estructurales víricas en trans (2, 4, 8, 25, 29) o utilizando líneas celulares estables empaquetadoras (24). La replicación de los vectores de alfavirus es citopática en la mayoría de las células de mamífero debido a mecanismos que todavía no se comprenden del todo (3, 9, 13). El efecto citopático inducido por estos vectores está mediado por apoptosis independiente de p53 y, normalmente, se produce entre las 48-72 horas después de la transfección o infección (14). Se sospecha que la nsp2, uno de los 4 componentes de la replicasa viral, podría tener un papel importante en la inducción de la apoptosis (11, 12). Los vectores citopáticos de alfavirus se han utilizado en una serie de aplicaciones que incluyen la producción y caracterización de proteínas *in vitro* (33), así como en estudios sobre vacunación y en terapia génica del cáncer (19, 26). Sin embargo, un inconveniente importante de los vectores originales es el hecho de que no se puedan utilizar en aplicaciones en las que se desea una expresión duradera del transgén. Para solventar este problema, varios grupos han identificado una serie de mutaciones en la replicasa de los alfavirus que pueden convertir estos vectores en no citopáticos, lo que permite una expresión más duradera de los productos recombinantes expresados por el vector. Estos estudios han conducido a la generación de vectores no citopáticos derivados de SIN (7, 22), SFV (20-22) y, más recientemente, de VEE y EEE (virus de la encefalitis equina oriental) (23). La mayoría de las mutaciones no citopáticas detectadas en los alfavirus se han localizado en la subunidad nsp2 de la Rep. Esta proteína contiene un dominio helicasa en el extremo amino y un dominio proteolítico en el extremo carboxilo, estando éste último implicado en el procesamiento de la Rep en sus cuatro subunidades (30). Se ha demostrado que las mutaciones no citopáticas descritas para nsp2 afectan bien al dominio proteolítico de nsp2 o bien a posiciones próximas a los sitios de escisión entre nsp1/2 o nsp2/3, alterando, de este modo, el procesamiento de la Rep. Un mutante no citopático aislado en SIN, que contenía un sólo cambio de aminoácido (P por L) en la posición 726 en nsp2, mostró un hiperprocesamiento de la Rep (7). Este mutante fue capaz de establecer replicación continua en células BHK de manera eficaz. La introducción de diferentes cambios de aminoácidos en la misma posición en este mutante demostró que existe una fuerte correlación positiva entre el nivel de replicación del ARN y la citopatogenicidad del vector. Este vector no citopático de SIN se ha utilizado ampliamente *in vitro*, ya que es capaz de proporcionar una expresión duradera del transgén con buenos niveles de estabilidad y niveles de expresión que eran aproximadamente el 4% de los descritos para el vector de SIN original (1).

Descripción de la invención**Breve descripción de la invención**

Los vectores de alfavirus pueden expresar niveles elevados de proteínas recombinantes en diferentes tipos de células. Sin embargo, esta expresión es transitoria debido a la naturaleza citopática de la replicación vírica. Para adaptar estos vectores para estudios a largo plazo, se aislaron mutantes no citopáticos del virus Sindbis (SIN), del virus del Bosque de Semliki (SFV) y del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). La mayoría de estos mutantes contenían cambios en nsp2, una subunidad de la replicasa vírica. Para generar nuevos vectores no citopáticos de SFV, se introdujeron las mutaciones descritas para crear el vector SIN no citopático, en una posición conservada en SFV. Curiosamente, se encontró que un replicón de SFV que contenía la mutación P718T en nsp2 y portaba el gen LacZ como gen heterólogo (SFV-LacZ), a pesar de que aparentemente era incapaz de replicarse en la mayoría de las células, daba lugar a variantes no citopáticas que formaban colonias que expresaban β -galactosidasa (β -gal) sin aplicarles selección. Se emitió la hipótesis de que las variantes no citopáticas se debían a mutaciones adaptativas secundarias. Para aislar estas variantes, se introdujo el gen de la puromicina N-acetil-transferasa (pac) en el mutante SFV-P718T y se seleccionaron los clones de las células BHK que eran resistentes a la puromicina. A partir de uno de los clones seleccionados se rescató un replicón no citopático que contenía una segunda mutación en la señal de localización

ES 2 304 880 B1

nuclear de nsp2 (R649H). Este doble mutante (SFV-S2-9) se replicaba a unos niveles que eran 60 veces menores que los del vector de SFV silvestre, hecho que correlacionaba con la ausencia de citopatogenicidad en las células transfectadas con el vector de la invención. Se observó un nivel similar de expresión de β -gal en células transfectadas con SFV-S2-9-LacZ y SFV-LacZ a las 24 horas de la transfección, que estaba en el rango de 15 pg/célula (figura 6).

5 Sorprendentemente el vector, en adelante vector de la invención, fue capaz de generar líneas celulares estables capaces de expresar β -gal durante al menos 10 pases en cultivo (el porcentaje de células que expresaban la β -gal, determinado en cada pase mediante la tinción con X-gal, varió entre el 70% y el 90% según el pase, pero estaba por encima del 85% en el pase 10, lo que indicó una gran estabilidad de la expresión del transgén en presencia de la selección, como puede comprobarse en la figura 7), siendo además la expresión constitutiva pues aumentó con el tiempo en las células transfectadas con SFV-S2-9-LacZ, alcanzando una estabilización a aproximadamente 30 pg de β -gal/célula a las 48 horas de la transfección. Es decir, mediante la transfección con el vector mutado se consiguió cuantitativamente el doble de expresión al logrado a las 24 horas de post-transfección cuando las células eran transfectadas con el vector silvestre.

15 El vector de la invención fue también capaz de generar líneas celulares estables capaces de expresar, de forma constitutiva, cardiotrofina 1 de rata a niveles similares a los obtenidos con el vector silvestre sin las mutaciones, que eran de aproximadamente 4.3 pg/célula. En las líneas analizadas se observó una alta estabilidad del vector, manteniéndose los niveles de expresión de cardiotrofina 1 durante al menos 10 pases.

20 Por otro lado la presente invención, tal y como se puede comprobar en el ejemplo 8, rompe un prejuicio establecido en el estado de la técnica al demostrar, que vectores mutados de SFV presentes en el estado de la técnica y definidos como no citopáticos, mantienen las características de citopatogenicidad.

25 Tal y como se expresa en la presente invención el término “línea celular estable” se refiere a líneas celulares donde el porcentaje de células que expresan la proteína heteróloga en el pase 10 es superior al 85%, pudiendo mantenerse o superarse dicho porcentaje en pases sucesivos o posteriores.

30 Por otro lado, el término “expresión constitutiva” se refiere a la capacidad adicional, que sorprendentemente presentan las líneas celulares estables arriba citadas, de expresar la proteína heteróloga a un nivel cuantitativamente alto (superior al 50% respecto al conseguido a las 24 horas de post-trasducción cuando las células se transducen con el vector silvestre).

35 Tal y como se conoce en el estado de la técnica, un replicón de ARN es una secuencia que se replica de forma unitaria utilizando como intermedio un ARN complementario que sirve como molde para producir más moléculas del ARN original. Para ello generalmente son necesarias secuencias específicas en los extremos del ARN. El replicón citado en la presente invención comprende el extremo 5' necesario para la replicación de SFV, la secuencia codificante de la encima replicasa de SFV con las mutaciones P718T y R649H en la región nsp2, un promotor subgenómico viral de SFV, genes de selección, genes heterólogos o de interés y el extremo 3' necesario para la replicación de SFV que contiene una secuencia terminal de poliadeninas (Poli A).

Descripción de la figuras

45 Figura 1. Evaluación de la citopatogenicidad de los vectores de SFV que llevan mutaciones derivadas de SIN. Los plásmidos pSFV-LacZ que contienen mutaciones P718T (pSFV-S2-LacZ) y P718F (pSFV-S3-LacZ) en nsp2 se construyeron tal y como se describe en los ejemplos. Se transcribió el ARN *in vitro* a partir de cada uno de estos plásmidos así como del pSFV3-LacZ original y se electroporó en células BHK que se sembraron en placas de 35 mm de diámetro con una confluencia baja y se tiñeron con X-gal después de cultivarse durante los tiempos indicados. En el caso de SFV-S2-LacZ o SFV-S3-LacZ, se dio un pase 1:5 a las células transfectadas con dichos vectores después de 96 horas en cultivo. Se muestra una representación esquemática del ARN de cada vector encima de cada conjunto de imágenes. Cap: círculo en el extremo izquierdo de los vectores; nsp: proteínas no estructurales; flecha horizontal: promotor subgenómico del SFV; An: poli A.

55 Figura 2. Células BHK resistentes a puomicina seleccionadas después de ser electroporadas con diferentes ARNs. Las células BHK se electroporaron con los vectores de ARN de SFV indicados o sin ARN (no RNA), se sembraron en placas de 35 mm de diámetro y se dejaron recuperar durante 24 horas antes de añadir la puomicina a 5 μ g/ml. Las placas se tiñeron con violeta de metilo en los tiempos indicados después de la transfección.

60 Figura 3. Localización intracelular de nsp2 en las células transfectadas con ARN del SFV. Las células BHK se electroporaron con los vectores de ARN de SFV o sin ARN (no RNA) y se analizaron mediante inmunofluorescencia a las 24 horas de la transfección. Como anticuerpos primarios se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón específicos de las formas nucleares (α nsp2-n) o citoplásmicas (α nsp2-c) de nsp2, y como anticuerpo secundario se utilizó un suero policlonal de conejo específico para IgGs de ratón conjugado con FITC. Los núcleos teñidos con dapi de las mismas células se visualizaron con un filtro de UV (Dapi).

65 Figura 4. Análisis de los ARN de SFV en las células BHK transfectadas. Se extrajo el ARN total de una línea celular estable de BHK obtenida después de la electroporación del replicón SFV-S2-9-pac y de la selección con puomicina (calle 1) o de las células BHK electroporadas con SFV-S2-9-pac (calles 2-4), SFV-pac (calle 5), SFV-

ES 2 304 880 B1

LacZ (calle 6) o coelectroporadas con los replicones SFV-S2-9-pac y SFV-pac (calle 7) y se analizó a las 24 horas (calles 2, 5 a 7), 48 horas (calle 3) o 72 horas (calle 4) de la electroporación. La presencia de los ARNs genómico (g) y subgenómico (sg) de SFV se analizó mediante transferencia Northern con un oligonucleótido marcado con ³²P específico del promotor subgenómico de SFV. Los números en la parte inferior de los geles indican la proporción de ARN subgenómico/genómico (sg/g) en cada caso. En la calle 7, se refieren a la proporción sg/g de SFV-S2-9-pac (pac) o de SFV-LacZ (LacZ), respectivamente. La parte izquierda del gel se expuso durante 72 horas mientras que la parte derecha se expuso durante 1 hora.

Figura 5. Expresión *in vitro* e *in vivo* de las proteínas no estructurales. A) El ARN de SFV-pac original (tipo silvestre) o los ARN de SFV-pac que contienen las mutaciones indicadas se tradujeron en lisados de reticulocitos de conejo en presencia de [³⁵S]-metionina y [³⁵S]-cisteína, y se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 8% y luego se autorradiografiaron. Dos geles que contenían las mismas muestras se corrieron tiempos diferentes para obtener una mejor separación de las bandas de peso molecular elevado (gel superior, migración más larga) y para detectar los monómeros nsp1 y 3 de peso molecular más pequeño (gel inferior, migración más corta). B) Análisis de la expresión de la replicasa en las células transfectadas. Los lisados de las células BHK control, de una línea celular estable de BHK obtenida después de la electroporación con el replicón SFV-S2-9-pac y selección con puromicina (S2-9) o de células electroporadas con los ARN de SFV-pac original (tipo silvestre) o del mutante SFV-RHR-pac (RHR) se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando un antisuero policlonal de conejo específico contra nsp2 (gel superior) o contra nsp3 (gel del centro). Como control interno, se analizaron las mismas muestras con un anticuerpo específico contra la β -actina.

Figura 6. Análisis de la expresión de β -gal. Se electroporaron células BHK con los ARNs indicados y se determinó el nivel de expresión de β -gal por célula a los tiempos indicados después de la electroporación. En el eje de abscisas se representa el tiempo post-transfección en horas y en el eje de ordenadas los picogramos de β -gal por célula.

Figura 7. Estabilidad de la expresión de β -gal en las células transfectadas con el vector SFV-S2-9-LacZ-pac. Las células BHK se electroporaron con ARN de SFV-S2-9-LacZ-pac y se seleccionaron en presencia de puromicina a 5 μ g/ml. Las células seleccionadas se pasaron cada 2-3 días con o sin puromicina y se determinó el porcentaje de células que expresaban β -gal en cada pase mediante tinción con X-gal. Los datos corresponden a la media de tres experimentos diferentes, mostrándose la desviación estándar. La figura muestra un campo típico de células BHK que contienen el vector SFV-S2-9-LacZ-pac pasadas 10 veces en presencia de puromicina y teñidas con X-gal. En el eje de abscisas se representa el número de pases y en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células teñidas de azul.

Figura 8. Representación esquemática de 3 ejemplos de realizaciones, en forma de ARN, del vector viral para la generación de líneas celulares estables y producción de proteínas estables. El replicón SFV está flanqueado por las secuencias 5' y 3' necesarias para la replicación de SFV, donde la secuencia 3' incorpora una secuencia terminal de poliadeninas (Poli A). Dentro del replicón se incluye la replicasa con las subunidades nsp1 a nsp4 y el promotor subgenómico de SFV solapado con nsp4 (SG1). Sobre nsp2 se representan las mutaciones R649H y P718T características de la replicasa del vector. El replicón incorpora también un gen de selección (PAC) y un gen de interés (GOI) que codifica la proteína recombinante que interesa producir de forma constitutiva. En los ejemplos A y C el replicón incorpora también un segundo promotor subgenómico (SG2) de manera que la expresión de PAC y GOI está controlada por un promotor SG distinto, indistintamente SG1 o SG2 según la construcción A o C elegida. En el ejemplo B la expresión de PAC y GOI está controlada por el mismo promotor SG1, produciendo una proteína híbrida que es cortada por proteasas en un sitio específico intercalado entre PAC y GOI. cap: estructura cap.

Figura 9. Evaluación del efecto citopático de SFV-LacZ. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-LacZ (vector silvestre) y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día).

Figura 10. Evaluación del efecto citopático de SFV-SF2A-LacZ. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-SF2A-LacZ y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día). Las células fueron pasadas 1:5 cuatro días tras la transfección.

Figura 11. Evaluación del efecto citopático de SFV-SF2C-LacZ. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-SF2C-LacZ y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día). Las células fueron pasadas 1:5 cuatro días tras la transfección.

Figura 12. Evaluación del efecto citopático de SFV-PD-LacZ. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-PD-LacZ y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día).

Figura 13. Evaluación del efecto citopático de SFV-S2-LacZ. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-S2-LacZ y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día). Las células fueron pasadas 1:5 cuatro días tras la transfección. Este mutante S2 fue capaz de dar lugar a la formación de colonias de células que expresan β -gal.

Figura 14. Evaluación del efecto citopático del vector SFV-S2-9-LacZ que lleva las mutaciones P718T y R649H. Se transcribió ARN *in vitro* a partir del plásmido pSFV-S2-9-LacZ, pSFV-S2-LacZ o pSFV-LacZ y se electroporó en células BHK. Las células se distribuyeron en placas de 35 mm a baja confluencia y se fijaron y tiñeron con X-gal a los tiempos indicados (d, día).

5

Figura 15. Análisis de la expresión de cardioproteína 1 de rata (CTr). A) Esquema de los dos vectores de SFV no citopáticos que portan el gen pac y el gen de la CTr. nsp, subunidades de la replicasa; SG, promotor subgenómico; 2A, autoproteasa 2A del virus FMDV. B) Análisis de la expresión de CTr. Se electroporaron células BHK con ARN de SFV-S2-9-CTr-pac (CTr-pac), SFV-S2-9-pac2A-CTr (Pac-2A-CTr) o SFV-S2-9-pac (S2-9-pac) como control negativo y se seleccionaron en presencia de puromicina a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células seleccionadas se lisaron y se analizó la expresión de CTr mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo específico para cardioproteína (gel superior). Como control de cantidad las mismas muestras se analizaron con un anticuerpo frente a actina (gel inferior). wtCT, lisado de células BHK transfectadas con SFV-CTr obtenido a las 24 h postransfección y utilizado como control positivo. M, marcadores de peso molecular (kDa).

15

Figura 16. Análisis de la estabilidad de la expresión de CTr en células BHK electroporadas con ARN de SFV-S2-9-pac2A-CTr (pac2A-CTr) y seleccionadas en presencia de puromicina a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células seleccionadas se pasaron cada 2-3 días hasta 10 pases sucesivos (p1 a p10), y en cada pase se analizó la expresión de CTr en lisados celulares mediante inmunotransferencia con un anticuerpo específico para cardioproteína. Como control de cantidad se utilizaron varias cantidades de CTr recombinante purificada (recCT). Se muestra un experimento representativo de dos realizados que dieron el mismo resultado de expresión y estabilidad. S2-9-pac, control negativo de células electroporadas con el vector SFV-S2-9-pac. M, marcadores de peso molecular (kDa).

20

Descripción detallada de la invención

25

Los vectores de alfavirus presentan varias ventajas, como niveles elevados de expresión del transgén, amplio tropismo y fácil manipulación. La citopatogenicidad que estos vectores producen en la mayoría de las células de vertebrados puede ser ventajosa en algunas aplicaciones, como la vacunación o la terapia génica del cáncer, en la que la apoptosis de las células transducidas puede conducir a la liberación de antígenos que podrían ser captados por las células inmunitarias, lo que favorecería una respuesta inmune contra el antígeno recombinante expresado o contra los antígenos tumorales, respectivamente (19). Sin embargo, el uso de estos vectores en aplicaciones en las que se necesita una expresión duradera del transgén está obstaculizado por su naturaleza citopática. La posibilidad de adaptar los vectores de alfavirus para expresión a largo plazo ha sido explorada por laboratorios diferentes, lo que ha conducido al aislamiento de variantes no citopáticas de SIN, SFV, VEE y EEE (7, 20-23). En la mayoría de los casos, las mutaciones no citopáticas se han aislado utilizando vectores que llevan un gen heterólogo que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico eucariótico, como la puromicina o el G418. Cuando las células transfectadas con este tipo de vector se incubaron en presencia del antibiótico, sólo se seleccionaron las que albergaban replicones no citopáticos mutantes que expresaban el gen de la resistencia. Aunque la mayoría de los mutantes de alfavirus que se han descrito llevan mutaciones en nsp2, estas mutaciones alteran diferentes residuos de la proteína en diferentes virus, a pesar de existir un elevado grado de homología de secuencia entre los diferentes alfavirus. Tomando como base esta homología de secuencia, se investigó el efecto de una mutación no citopática bien caracterizada de SIN, que afectaba el residuo 726 de nsp2 en este virus, en el contexto de SFV. Las mutaciones P726L y P726T han sido descritas como no citopáticas por Frolov y col. (7) y Perri y col. (22), respectivamente. En el primer estudio, el residuo 726 también se mutó a todos los otros posibles amino ácidos, lo que generó una colección de mutantes de SIN con diferentes grados de citopatogenicidad. Frolov y col. pudieron establecer una correlación entre el nivel de replicación del ARN y la citopatogenicidad, llegando a la conclusión de que cambios en el residuo 726 que reducían los niveles de ARN a menos del 5% de los niveles observados en el vector silvestre producían un fenotipo no citopático (7). Se eligieron dos cambios diferentes, P726T y P726F, que habían sido capaces de reducir los niveles de ARN en SIN al 5,1% y al 1,6% de los niveles silvestres, respectivamente, y se introdujeron las correspondientes mutaciones en la posición 718 de nsp2 de SFV, generándose los mutantes S2 y S3, respectivamente. Ninguno de estos cambios fue capaz de producir un fenotipo no citopático en SFV por sí mismo. Los estudios realizados transfectando células BHK con estos mutantes en los que se había incorporado el gen indicador LacZ demostraron que sólo un pequeño porcentaje de las células transfectadas podían mantener la replicación del vector. El mutante S2 (P718T) parecía ser más estable que el S3 (P718F), y dio lugar a colonias grandes de células que expresaban β -gal en ausencia de selección. Por lo tanto se intuyó que estas colonias contenían replicones con mutaciones adaptativas adicionales. Para seleccionar estas colonias e identificar las posibles mutaciones secundarias presentes en los replicones, se clonó el gen de la N-acetil-transferasa (pac) en el mutante S2 de SFV y se aislaron las colonias de las células cultivadas en presencia de puromicina. En uno de los clones analizados, se encontró una segunda mutación en la posición 649 de nsp2 (R649H) que, en combinación con la mutación P718T, fue capaz de proporcionar un fenotipo no citopático para el vector SFV. La mutación R649H afecta la señal de localización nuclear ⁶⁴⁸R_{RR} del SFV que se ha descrito que es la responsable del transporte parcial de nsp2 al núcleo de la célula (27). El cambio de Arg por Hys en la posición 649 constituye un cambio muy conservador, que podría explicar el hecho de que no se observara ningún efecto evidente sobre el transporte al núcleo de nsp2 ni en el doble mutante S2-9 ni en el mutante sencillo R649H. El último mutante no mostró ninguna reducción en la citopatogenicidad al compararse con el vector SFV original, lo que indicó que ambas mutaciones en las posiciones 649 y 718 eran necesarias para eliminar el efecto citopático. Fazakerley y col. habían descrito un cambio más drástico en la posición 649 (R649D), que condujo a la atenuación de la neurovirulencia de SFV en el contexto de un genoma vírico completo (6). En ese caso, la mutación R649D interrumpió completamente el transporte de nsp2 al núcleo, aunque no

65

suprimió el efecto citopático del virus sobre las células BHK. Todos estos datos sugieren que la secuencia ⁶⁴⁸RRR de nsp2 podría estar implicada en la citopatogenicidad del SFV.

5 El mutante S2-9 pudo replicarse a niveles que eran aproximadamente 60 veces más bajos que los observados para el vector SFV de tipo silvestre, lo que podría explicar la ausencia de citopatogenicidad de este vector. El nivel del ARN subgenómico en S2-9 era sólo 30 veces más bajo que el del vector SFV de tipo silvestre, lo que indicó que la proporción de los ARN subgenómico/genómico había aumentado aproximadamente dos veces en el mutante no citopático. Esta proporción fue incluso mayor al poco tiempo de la transfección, lo que sugiere que la síntesis del ARN genómico en el vector no citopático podría estar retrasada en relación con la del ARN subgenómico. Tanto la disminución de la cantidad de ARN como el aumento de la proporción de los ARNs subgenómico/genómico observados para S2-9 fueron muy similares a los descritos en los vectores de SIN que contienen mutaciones no citopáticas en la posición 726 de nsp2 (7, 22). Sin embargo, estos resultados se contradecían con los descritos por Perri y col. para los mutantes de SFV no citopático, en los que la cantidad de los ARNs mutantes era mayor que la del virus de tipo silvestre, y en el que también disminuyeron las proporciones de los ARN subgenómico/genómico (22), lo que sugiere que en los mutantes de SFV aislados por este grupo podrían estar implicados mecanismos diferentes para el establecimiento de la replicación duradera. El menor nivel de replicación del ARN en S2-9 no se debía a un efecto en cis de las mutaciones presentes en la secuencia del ARN, ya que una replicasa de tipo silvestre aportada en trans por el vector original de SFV permitía recuperar los niveles de los ARNs genómico y subgenómico de S2-9 hasta valores próximos a los del vector SFV de tipo silvestre. Varios estudios realizados con los mutantes de alfavirus han demostrado que las mutaciones no citopáticas en nsp2 pueden alterar la actividad proteolítica de esta proteína, lo que conduce, bien a un hiperprocesamiento de la replicasa (7), o bien a un procesamiento más lento de esta poliproteína (22). En la presente invención no se detectaron diferencias claras en el procesamiento de la replicasa entre el mutante S2-9 y el vector de tipo silvestre, ni mediante traducción *in vitro*, ni mediante análisis por inmunotransferencia.

25 A pesar de los bajos niveles de replicación del mutante S2-9, la cantidad de β -galactosidasa (β -gal) producida por el vector SFV-S2-9-LacZ a las 24 horas de la transfección fue muy similar a la obtenida con un vector de SFV de tipo silvestre que expresa el mismo transgén. El nivel de expresión de S2-9 aumentó aproximadamente dos veces a tiempos más tardíos tras la transfección, lo que correlaciona con el aumento observado en los niveles de ARN. El nivel de expresión de la proteína recombinante en otros vectores no citopáticos descritos ha mostrado una gran variabilidad, que oscila desde sólo el 4% de la expresión de tipo silvestre en el caso del mutante de SIN P726L (1) al 1000% en el caso del doble mutante SFV-PD desarrollado por Lundström *et al* (21). Sin embargo, el carácter no citopático de este vector quedó cuestionado cuando los mismos autores mostraron que la expresión de β -gal o GFP en células BHK infectadas con un vector SFV-PD que porta LacZ o GFP como gen marcador alcanza un máximo a las 48 horas para después disminuir drásticamente en los 3-4 días subsiguientes (20). En este aspecto cabe añadir que el ejemplo 8 de la presente invención rompe un prejuicio en el estado de la técnica al demostrar que el vector SFV-PD desarrollado por Lundström *et al* (21) es citopático. Algunos mutantes adicionales descritos por este grupo que contienen mutaciones termosensibles también fueron capaces de expresar niveles elevados de proteínas recombinantes, pero solamente a la temperatura permisiva (20, 21). La razón por la que el mutante S2-9 podía expresar mayores cantidades de la proteína recombinante que el vector de tipo silvestre que tiene unos niveles de ARN mucho más bajos podría estar relacionada con la fuerte inhibición de la síntesis de proteínas inducida por este último vector. Dos publicaciones recientes señalan que la fosforilación de eIF2alfa es el mecanismo mediante el cual los alfavirus inducen una inhibición de la traducción en la célula hospedadora a tiempos tardíos durante la infección (15, 31). Al mismo tiempo, estos autores demuestran que el elemento potenciador de la traducción presente en el extremo 5' del gen de la cápsida permite una traducción eficaz de la poliproteína estructural viral en presencia del eIF2alfa fosforilado. Se ha demostrado que cuando el potenciador de la traducción de la cápsida se fusiona en fase con el extremo amino de una proteína recombinante en el vector de SFV o de SIN, aumenta el nivel de expresión de la proteína recombinante unas 8 veces (10, 28). Este efecto no se observó en el contexto del vector S2-9, probablemente porque en las células transfectadas con este vector no se estaba produciendo inhibición de la traducción por fosforilación de eIF2alfa. La ausencia de inhibición de la síntesis de proteínas en las células transfectadas con el vector S2-9 podría ser la responsable de que se generen niveles de expresión elevados con unos niveles de ARN más bajos que los alcanzados con el vector de SFV silvestre.

55 La eficacia de empaquetamiento del mutante S2-9 era aproximadamente 6 logaritmos más baja que la del vector de SFV silvestre que lleva el mismo transgén. Esto se podría deber o bien a los bajos niveles de replicación del ARN o a una deficiencia en el empaquetamiento del doble mutante de SFV. Los experimentos de empaquetamiento en los que se replicó el ARN de S2-9 a niveles casi normales mediante la cotransfección de las células con un vector de SFV de tipo silvestre fueron sólo capaces de aumentar unas 15 veces el título de las partículas víricas de S2-9, lo que indicó que los bajos niveles de ARN eran responsables sólo parcialmente de la baja eficacia de empaquetamiento de este vector. El vector del SFV que contiene sólo la mutación R649H se empaquetó a los niveles del SFV silvestre, mientras que el vector de SFV que contiene solamente la mutación P718T (SFV-S2) se empaquetó de forma deficiente. Aunque el hecho de que el vector SFV-S2 no sea capaz de replicarse en la mayoría de las células transfectadas podría ser el factor responsable de esta baja eficacia de empaquetamiento, todo indica que esta mutación sola o en combinación con la mutación R649H afecta a la encapsidación del ARN del SFV en partículas víricas. Las señales de empaquetamiento del SFV se han cartografiado en una región del genoma que comprende los nucleótidos 2767 a 2824 (32), y que no se superpone con ninguna de las mutaciones presentes en S2-9, localizadas en las posiciones 3643 (R649H) y 3849-51 (P718T). Sin embargo, no se puede descartar que estas mutaciones pudieran afectar a la estructura secundaria del ARN genómico, alterando la accesibilidad de las señales de empaquetamiento. Serán necesarios más estudios de mutagénesis para determinar la función precisa de estas secuencias en el empaquetamiento del SFV.

ES 2 304 880 B1

Se demostró también que el vector SFV-S2-9 se podía utilizar eficazmente para generar líneas celulares estables BHK que expresen proteínas recombinantes de forma constitutiva. Para ese propósito, el vector debe contener, además de las mutaciones P718T y R649H, el transgén deseado y un gen de resistencia a un antibiótico útil para la selección de las células que han sido eficazmente transducidas. Utilizando LacZ como el transgén indicador y el gen pac como gen de selección, generamos una línea celular que mostraba una estabilidad muy elevada, expresando β -gal aproximadamente el 85% de las células después de 10 pases en el cultivo, y con unos niveles de expresión que eran similares a los del vector SFV silvestre. Esto contrasta con lo que se había observado en una línea celular similar generada con un vector de SIN no citopático que llevaba la mutación P726L en nsp2 y el gen LacZ como gen indicador y que expresaba β -gal a niveles aproximadamente 25 veces más bajos que el vector SIN silvestre (1). En este último caso, la expresión de LacZ se perdió en el 45% de las células después de 5 pases, aunque se podía alcanzar una mayor estabilidad con este sistema si la línea celular se derivaba de una población clonada de células que expresaban la β -gal.

El vector SFV-S2-9 también fue capaz de generar líneas celulares estables que expresaban cardiotrofina 1 de rata (CTr) de forma constitutiva. En particular, el vector SFV-S2-9-pac2A-CTr, en el que el gen pac y el gen que codifica la CTr están fusionados en fase usando la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) como conector, dio lugar a la generación de líneas estables que mantuvieron una expresión de cardiotrofina elevada, y similar a la obtenida con un vector de SFV silvestre, durante al menos 10 pases en cultivo.

El vector SFV-S2-9-pac puede utilizarse para la generación rápida de líneas estables de células de mamífero capaces de producir proteínas recombinantes en grandes cantidades.

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere al uso de un vector viral basado en el virus del Bosque de Semliki (SFV) para la generación *in vitro* de líneas celulares estables con capacidad de expresar constitutivamente proteínas heterólogas. Dicho vector viral contiene un replicón de SFV cuya replicasa comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2.

Cada una de estas mutaciones afecta a un triplete de nucleótidos, situados ambos en la secuencia que codifica para la subunidad o proteína no estructural nsp2 de la replicasa. La mutación P718T indica que la Prolina (P), situada en la posición 718 de la secuencia de la proteína nsp2 codificada por el vector salvaje, es sustituida por una Treonina (T) en la proteína nsp2 codificada por el vector mutado. Del mismo modo, la mutación R649H indica que la Arginina (R) situada en la posición 649 es sustituida por una Histidina (H) en la subunidad nsp2 que codifica el vector mutado. Ambas posiciones 718 y 649 se refieren a la posición del aminoácido sustituido en la secuencia de la subunidad nsp2 ya cortada y procesada.

En una realización concreta de la invención, se utiliza un vector viral que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2:

- La SEQ ID NO: 1 incluye el extremo 5' necesario para la replicación de SFV, la replicasa de SFV con las mutaciones P718T y R649H en nsp2 y, solapado con la replicasa, un promotor subgenómico viral de SFV;
- La SEQ ID NO: 2 incluye el extremo 3' necesario para la replicación de SFV que contiene una secuencia terminal de poliadeninas (Poli A).

Estas dos secuencias conjuntamente constituyen el esqueleto del vector y entre ellas se intercalan los genes de selección y los genes heterólogos que codifican para las proteínas de interés.

En una realización particular, el vector de SFV utilizado para la generación *in vitro* de líneas celulares estables comprende:

- a) el gen de interés (GOI) que codifica para la proteína heteróloga, cuya expresión está controlada por un promotor subgenómico de SFV; y preferentemente también
- b) un gen de selección, y cuya expresión está controlada también por un promotor subgenómico de SFV, que puede ser el mismo promotor que controla la expresión del gen de selección u otro distinto.

El gen de selección y el gen de interés GOI están situados dentro del replicón de SFV, entre el promotor subgenómico solapado en la replicasa y el extremo 3' necesario para la replicación de SFV (Figura 8).

En una realización particular el gen de interés GOI se sitúa corriente abajo del promotor subgenómico (SG1) solapado en la replicasa y su expresión está controlada por dicho promotor SG1. A continuación se incorpora otro promotor subgenómico SG2 que controla la expresión del gen de selección, que se sitúa corriente abajo de SG2 (Figura 8A).

En otra realización particular, el vector se construye también con los mismos 2 promotores subgenómicos SG1 y SG2 pero permutando las posiciones del gen de interés y del gen de selección, de manera que SG1 controla la expresión del gen de selección y SG2 la expresión del gen de interés GOI (Figura 8C).

ES 2 304 880 B1

En otra realización particular alternativa, corriente abajo del promotor subgenómico SG1 se introduce una construcción que comprende: el gen de selección y el gen de interés GOI, fusionados en fase con un conector interpuesto de DNA que corresponde a la secuencia que codifica un sitio de corte autoproteolítico post-traduccional (Figura 8B). Este conector de DNA con una secuencia codificante del sitio de corte autoproteolítico puede derivarse de un virus, por ejemplo un picornavirus. En una realización más particular codifica la región 2A de la poliproteína del virus de la fiebre aftosa (FMDV). De esta manera se produce la cotraducción de ambos genes (de selección y GOI) en una única poliproteína, que después de la traducción es cortada rápidamente mediante rotura en el sitio de corte autoproteolítico produciendo la proteína de selección y la proteína heteróloga de interés. La utilización de estos sitios de rotura autoproteolítica postraduccional ha sido descrita previamente en EP00736099 y también por Ryan y Drew (35), particularmente la utilización de la secuencia codificante de la región 2A de FMDV, cuyo contenido se incluye en su integridad por referencia.

En una realización particular, el vector de la invención incluye como gen de selección el gen pac, que codifica para el enzima puromicina N-acetil-transferasa, cuya expresión confiere a las células portadoras del vector resistencia al antibiótico puromicina. De esta manera, añadiendo al medio puromicina será posible seleccionar las células portadoras del vector de entre aquellas que no han sido transfectadas o que lo han perdido.

El gen pac podría ser sustituido por cualquier otro gen que confiera resistencia a un antibiótico tóxico para células de mamífero, como por ejemplo el gen que confiere resistencia a higromicina (hph) o el gen que confiere resistencia a neomicina (neoR). Podría sustituirse también por otro gen que permita sintetizar un nutriente esencial que sea omitido en el medio de cultivo, o por cualquier otro gen que ofrezca una ventaja selectiva a las células transfectadas.

El gen de interés podría ser cualquier gen o ácido nucleico que codifica una proteína indicadora (β -gal,...), o una proteína terapéutica, o cualquier otra proteína o polipéptido recombinante de interés.

En una realización particular, el gen de interés codifica para una proteína terapéutica seleccionada entre el factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), la cardiotrofina 1 (CT1), la oncostatina M (OSM), el interferón alfa (por ejemplo IFN α 5), la anfiregulina (AR), el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), el receptor endotelial de la proteína C/proteína C activada (EPCR) o anticuerpos de interés terapéutico o diagnóstico.

De esta manera, el conjunto “replicasa mutada -gen de interés- gen de selección” flanqueado por las secuencias 5' y 3' necesarias para la replicación forma un replicón de ARN que es capaz de autoamplificarse dentro de la célula.

El vector de la invención puede ser utilizado en forma de ARN o también en forma de ADN.

Cuando se utiliza en forma de ARN, el vector se completa con la adición de una estructura de cap en su extremo 5'.

Cuando se utiliza en forma de ADN, el vector completo incluiría un promotor eucariótico, por ejemplo el promotor CMV, la secuencia del replicón de SFV en cualquiera de las realizaciones definidas previamente, y una secuencia señal de la terminación de la transcripción, por ejemplo una secuencia señal derivada de SV40. De esta manera, el vector se transcribe a ARN dentro de las células transfectadas donde se autoamplificará.

Las construcciones de ARN o ADN para la preparación del vector de la invención pueden obtenerse mediante métodos convencionales de biología molecular, recogidos en manuales generales de laboratorio, por ejemplo en “Molecular cloning: a laboratory manual” (Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3ª ed. Cold Spring Harbor, Nueva York) o en “Current protocols in molecular biology” (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman y K. Struhl Eds, vol. 2. Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, Nueva York, N. Y.. Actualizado hasta Septiembre 2006.

En un segundo aspecto la invención se refiere a una línea celular estable con capacidad de expresar constitutivamente proteínas heterólogas o recombinantes, caracterizada porque es una línea celular transfectada con un vector viral de la invención, que contiene un replicón de SFV cuya replicasa comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2, en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente al definir el vector de la invención.

En una realización particular es una línea celular estable que está transfectada con un vector de la invención cuyo replicón de SFV comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En un aspecto adicional la invención se refiere a un método para la generación *in vitro* de líneas celulares estables con capacidad de sintetizar proteínas heterólogas de forma constitutiva que comprende:

I. transfectar células con un vector viral que contiene un replicón de SFV cuya replicasa comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2, por ejemplo una replicasa que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2;

II. seleccionar las células estables, generadas en el paso I; y

III. crecer y mantener las células estables.

ES 2 304 880 B1

La célula que se transfecta es una línea celular eucariótica que permite la replicación del vector. Está línea celular puede ser una línea procedente de mamífero. En una realización particular, es una línea celular derivada de fibroblastos de riñón de hámster, por ejemplo la línea BHK-21.

5 La transfección de las células se realiza mediante cualquier procedimiento convencional, físico o químico, que permita la introducción del vector viral de la invención en las células, por ejemplo por electroporación o por conjugación del material genético con lípidos catiónicos. Estos procedimientos servirían para la transfección del vector como ARN y como ADN.

10 En una realización particular la transfección se realiza por electroporación (“Current protocols in molecular biology”; Ausubel FM *et al.*; citado *supra*).

La selección de las células estables se realizará de manera distinta en función del gen de selección incorporado en el vector SFV con el que se transfectan las células. Como ya se ha explicado anteriormente, la expresión del gen de
15 selección confiere a las células transfectadas una ventaja que permite su selección. Bastará con someter a las células a las condiciones selectivas para las células transfectadas. Cuando se utiliza el gen pac como gen de selección, su expresión en las células transfectadas las hace resistentes a la puomicina. En este caso, bastará con añadir puomicina al medio de cultivo para eliminar las células no transfectadas o que hayan perdido el vector.

20 Las células estables se crecen y mantienen en medios y condiciones convencionales de cultivo, en función del tipo celular transfectado, y manteniéndolas bajo el estímulo selectivo para las células transfectadas (por ejemplo en presencia de puomicina). Cuando las células son BHK-21 se crecen en las condiciones ya descritas (“Current protocols in molecular biology”; Ausubel FM *et al.*; citado *supra*).

25 En otro aspecto la invención se refiere al uso de esta línea celular estable, transfectada con el vector de la invención, para la producción *in vitro* de proteínas.

En otro aspecto adicional la invención se refiere también a un método para la producción *in vitro* de proteínas recombinantes que comprende:

30 I. transfectar células con un vector viral que contiene un replicón de SFV cuya replicasa comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2, por ejemplo una replicasa que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2;

35 II. seleccionar las células estables, generadas en el paso I;

III. crecer y mantener las células estables; y

40 IV. extraer la proteína.

Los pasos I, II y III corresponden propiamente a la generación de la línea celular estable que expresa constitutivamente la proteína recombinante de interés. En este caso, la célula se transfectará con un vector viral SFV de la invención que incluya como gen de interés el gen que codifica la proteína recombinante que queremos producir. Como ya se ha indicado anteriormente, este gen está insertado en el vector en una posición tal que su expresión está
45 controlada por un promotor subgenómico de SFV.

La proteína recombinante a producir puede ser una proteína indicadora (β -gal,...), o una proteína terapéutica, o cualquier otra proteína o polipéptido recombinante de interés.

50 En una realización particular, es una proteína terapéutica seleccionada entre el factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), la cardiotrofina 1 (CT1), la oncostatina M (OSM), el interferón alfa (por ejemplo, IFN α 5), la anfiregulina (AR), el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), el receptor endotelial de la proteína C/proteína C activada (EPCR) o anticuerpos de interés terapéutico o diagnóstico.

55 Los pasos para la generación de la línea celular estable se realizarán como se ha descrito anteriormente en el método para la generación de líneas celulares estables.

La extracción de la proteína se realiza a partir de un lisado celular cuando la proteína recombinante sea intracelular, o a partir del sobrenadante de las células estables cuando se trate de proteínas recombinantes de secreción.

60 Para la extracción puede utilizarse cualquier procedimiento convencional de extracción y purificación de proteínas adecuado para la extracción de la proteína concreta que se desea producir, dependiendo de la naturaleza de la proteína. Entre otros, podrían utilizarse procedimientos de separación por tamaño y/o carga eléctrica (precipitación en sulfato amónico, filtración en gel, ultracentrifugación, electroforesis, electroenfoque,...), por inmunopurificación (columna de
65 afinidad, inmunoprecipitación,...), separación por unión a un ligando específico.

Los siguientes ejemplos tienen el objetivo de ilustrar la invención sin pretender ser limitantes de la misma.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

5 Construcción y caracterización de vectores de SFV que llevan mutaciones no citopáticas derivadas del SIN

Un posible enfoque para generar nuevos vectores no citopáticos de alfavirus es introducir las mutaciones previamente descritas en otros alfavirus, aprovechándose de la homología de secuencia compartida por los diferentes virus de este género. Siguiendo este enfoque, se evaluó el efecto de las mutaciones no citopáticas descritas en el virus SIN en un vector de expresión derivado de SFV. Previamente, se había demostrado que las mutaciones que afectaban el residuo 726 de la subunidad nsp2 de la Rep de SIN reducen considerablemente la citopatogenicidad de este virus, hecho que correlacionaba con un menor nivel de replicación del ARN en los mutantes (7, 22). Dos mutaciones que afectaban a este residuo, P726T y P726F, que se habían descrito como parcialmente citopáticas y no citopáticas para el SIN, respectivamente, se introdujeron en el residuo homólogo de nsp2 en el vector pSFV-1, lo que generó los mutantes pSFV-S2 y pSFV-S3, que llevaban las mutaciones P718T o P718F en nsp2, respectivamente. Para evaluar la citopatogenicidad de estos nuevos vectores, se clonó el gen indicador LacZ a continuación del promotor subgenómico viral, lo que generó los vectores pSFV-S2-LacZ y pSFV-S3-LacZ. Se sintetizó el ARN *in vitro* para cada uno de estos plásmidos y se electroporó en células BHK-21, que se cultivaron y en las que se analizó la expresión de β -gal mediante tinción con X-gal a diferentes tiempos tras la transfección (figura 1). A diferencia de las células electroporadas con el ARN del SFV-LacZ control en las que, a las 24 horas de la transfección, más del 95% de las células expresaron β -gal y mostraron un fenotipo citopático, sólo un pequeño porcentaje de las células transfectadas con los ARNs de SFV-S2-LacZ o de SFV-S3-LacZ expresaron β -gal a las 24 horas tras la transfección, sin mostrar una morfología citopática. En el caso de SFV-S2-LacZ, el número de células positivas aumentó con el tiempo, siendo capaces de formar grandes colonias de células que expresaban β -gal 5 días después de la electroporación. Este efecto fue mucho más atenuado en SFV-S3-LacZ, con el que nunca se observaron colonias azules a día 5 después de la tinción con X-gal. Estos datos sugieren que las mutaciones P718T y P718F podrían estar bloqueando la replicación vírica o la expresión del transgén, pero que dan lugar a variantes no citopáticas con una frecuencia relativamente elevada que podrían ser el resultado de mutaciones adaptativas secundarias durante la transcripción *in vitro* o la replicación del SFV.

30 Ejemplo 2

Selección y cartografía de los replicones derivados de SFV-S2 que contienen mutaciones adaptativas nuevas

Para seleccionar las poblaciones de células que contienen replicones no citopáticos de SFV, se sustituyó el gen indicador LacZ en el plásmido pSFV-S2-LacZ por el gen que codifica el marcador de selección dominante puromicina N-acetil-transferasa (pac) que confiere resistencia a la puromicina, lo que generó el plásmido pSFV-S2-pac. Utilizando este plásmido como molde, se sintetizó ARN *in vitro* y se electroporó en células BHK-21. A las 24 horas de la electroporación, se añadió puromicina a 5 μ g/ml, lo que condujo a la selección de colonias resistentes al fármaco que, posteriormente, se expandieron. Para identificar las posibles mutaciones adaptativas en los replicones presentes en las células seleccionadas, se extrajo el ARN total de clones individuales, y se amplificó por RT-PCR con cebadores específicos un fragmento de 3,9 kb de la replicasa de SFV que comprende la secuencia completa de nsp2. Se eligió amplificar la región nsp2 de la replicasa porque en esta región se habían cartografiado la mayoría de las mutaciones no citopáticas descritas en los alfavirus. El fragmento de ADNc rescatado de cada clon se subclonó en el plásmido pSFV-pac original sustituyendo la secuencia de la nsp2 de tipo silvestre. Para comprobar si se habían rescatado mutaciones no citopáticas, se sintetizó ARN *in vitro* de cada uno de los nuevos plásmidos y se utilizó para electroporar células BHK-21. A las 24 horas de la transfección, se añadió la puromicina a 5 μ g/ml y se tiñeron las células con violeta de metilo a diferentes tiempos para comparar su crecimiento con el observado en las células transfectadas con el mutante SFV-S2-pac inicial o con el SFV-pac original. Uno de los clones, el SFV-S2-9-pac, mostró un claro fenotipo no citopático, ya que confirió resistencia a la puromicina a la mayoría de las células transfectadas (figura 2). Otros clones probados mostraron un patrón similar al del SFV-S2 y no se analizaron más en este estudio. Las células transfectadas con el SFV-pac original mostraron un claro efecto citopático y la mayoría de ellas murieron antes del día 4. La secuenciación del fragmento de nsp2 de pSFV-S2-9-pac mostró que, además de la mutación original P718T, había una segunda mutación adaptativa en la posición 649 de nsp2 en la que se había sustituido Arg por Hys. Esta nueva mutación afecta la señal de localización nuclear ⁶⁴⁸RRR (27) de la nsp2 de SFV que, en SFV-S2-9, cambia a ⁶⁴⁸RHR.

55 Ejemplo 3

Efecto de la mutación R649H sobre la citopatogenicidad y sobre la localización nuclear de nsp2

Para comprobar el efecto de la mutación R649H por sí misma sobre la citopatogenicidad de SFV, se introdujo esta mutación en el plásmido pSFV-pac, generándose de esta forma el plásmido pSFV-RHR-pac. Se transcribió el ARN de este plásmido y se electroporó en células BHK-21, que se dejaron recuperar durante 24 horas. Entonces se añadió la puromicina a 5 μ g/ml y se analizó el crecimiento de las células a diferentes tiempos tiñendo las células con violeta de metilo tal y como se describió anteriormente (figura 2, columna derecha). El SFV-RHR-pac mostró un patrón muy similar al observado para el vector original SFV-pac, induciendo un fuerte efecto citopático temprano que condujo a la muerte de la mayoría de las células antes del día 4. Estos resultados sugieren que la ausencia de citopatogenicidad del vector SFV-S2-9 se debía a la combinación de las mutaciones P718T y R649H. Para comprobar el efecto de la mutación R649H sobre la localización nuclear de la nsp2, se transfectaron células BHK-21 con el ARN de los vectores

ES 2 304 880 B1

que contenían esta mutación (SFV-S2-9-pac y SFV-RHR-pac) o con vectores que no la contenían (SFV-pac y SFV-S2-pac) y se analizaron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de la forma nuclear o de la forma citoplásmica de nsp2 de SFV, respectivamente (figura 3). En todos los casos, se detectó nsp2 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células transfectadas, lo que sugiere que la mutación RHR no afectaba el transporte al núcleo de esta proteína.

Ejemplo 4

Replicación del ARN en las células transfectadas con SFV-S2-9-pac

Para determinar el nivel de replicación del ARN del doble mutante no citopático de SFV, se electroporaron células BHK-21 con ARN de SFV-S2-9-pac, se extrajo el ARN total a las 24, 48 y 72 horas de la electroporación y se analizó mediante transferencia “Northern” con un oligonucleótido marcado con ³²P específico de la secuencia del promotor subgenómico de SFV, que está presente tanto en el ARN genómico como en el ARN subgenómico (figura 4, calles 2 a 4). La cantidad de los ARNs genómico y subgenómico de SFV-S2-9-pac, así como la proporción entre ellos, se comparó con la obtenida en células transfectadas con ARN de SFV-pac a las 24 horas de la electroporación (figura 4, calle 5). Los ARNs genómicos y subgenómicos de SFV-S2-9-pac aumentaron con el tiempo y parecieron alcanzar un pico a las 48 horas de la electroporación. Se observaron unos niveles de ARN similares en una línea celular de BHK resistente a la puromicina obtenida con el vector SFV-S2-9-pac (figura 4, calle 1). En todos los casos, los ARNs de SFV-S2-9 se produjeron en mucha menor cantidad que la obtenida en células transfectadas con ARN del SFV-pac original (obsérvese que la calle 5 estuvo expuesta 72 veces más que las calles 1 a 4). La proporción de los ARNs subgenómico/genómico observada en las células transfectadas con SFV-S2-9-pac y seleccionadas con puromicina fue aproximadamente 1,5 veces mayor que la observada en células transfectadas con SFV-pac (figura 4, números de la parte inferior). Sin embargo, en las células transfectadas con SFV-S2-9-pac no seleccionadas esta proporción fue considerablemente mayor, especialmente a las 24 horas después de la transfección, pero disminuyó con el tiempo, lo que indicó que la síntesis del ARN genómico en el doble mutante podría estar retrasada en relación con la del ARN subgenómico. También se detectaron dos bandas adicionales de ARN con un tamaño intermedio entre los ARNs genómicos y subgenómicos en las células transfectadas con SFV-S2-9-pac (figura 4, calles 1 a 4). Estas bandas no se caracterizaron pero podrían corresponder a ARNs defectivos interferentes que pueden aparecer durante la replicación del doble mutante de SFV. Finalmente, para determinar si se podían recuperar los bajos niveles de replicación del ARN de SFV-S2-9-pac con una replicasa de tipo silvestre suministrada *in trans*, se electroporaron las células BHK-21 simultáneamente con los ARNs de SFV-S2-9-pac y de SFV-LacZ (vector silvestre). Después de 24 horas, se extrajo el ARN total de las células coelectroporadas y se analizó mediante transferencia “Northern” (figura 4, calle 7). Los ARNs de las células electroporadas con el SFV-pac original (figura 4, calle 5) y SFV-LacZ (figura 4, calle 6) se analizaron en el mismo gel y se utilizaron como marcadores de tamaño molecular para cada uno de los ARNs genómicos y subgenómicos. Los ARNs genómicos y subgenómicos de SFV-LacZ y SFV-S2-9-pac se detectaron fácilmente en las células coelectroporadas después de exponer el gel durante 1 hora, lo que indicó que la replicasa de tipo silvestre era capaz de, al menos parcialmente, recuperar la replicación del doble mutante. Sin embargo, aunque la cantidad de ambos ARNs subgenómicos era muy similar, el ARN genómico de SFV-LacZ se produjo a unos niveles aproximadamente 2-3 veces mayores que los del mutante SFV-S2-9-pac.

Ejemplo 5

Procesamiento de la replicasa en el mutante SFV-S2-9

La menor cantidad de ARN detectada en las células transfectadas con el replicón de SFV-S2-9-pac se podría deber a una alteración en el procesamiento de la replicasa. La replicasa de SFV se sintetiza como la poliproteína nsp1234 que, con posterioridad, se escinde en sus componentes monoméricos maduros mediante la actividad proteasa presente en el dominio del extremo carboxilo de nsp2 (30), en el que se han cartografiado las mutaciones P718T y R649H. Para examinar el efecto de estas mutaciones sobre el procesamiento de la replicasa, los ARNs de SFV-S2-9-pac, SFV-RHR-pac y SFV-S2-pac sintetizados *in vitro* se tradujeron mediante incubación con lisados de reticulocitos de conejo en presencia de [³⁵S]-metionina y [³⁵S]-cisteína. Se comparó el patrón de procesamiento de la replicasa en estos mutantes con el obtenido para el ARN SFV-pac original mediante SDS-PAGE seguida de autorradiografía (figura 5A). No se observó ninguna diferencia en el procesamiento de la replicasa entre los tres mutantes analizados y la replicasa de tipo silvestre, lo que dio lugar a una acumulación similar de los monómeros nsp en todos los casos. Para determinar si el procesamiento de la replicasa resultaba afectado *in vivo*, los lisados de una línea celular BHK-21 resistente a la puromicina portadora del vector SFV-S2-9-pac o de células BHK-21 transfectadas con ARN de SFV-pac original o con ARN de SFV-RHR-pac obtenidos a las 24 horas de la electroporación se analizaron mediante inmunotransferencia con un antisuero de conejo específico contra nsp2 (figura 5B, panel superior) o contra nsp3 (figura 5B, panel central) como anticuerpos primarios, respectivamente. En ambos casos, las muestras derivadas de SFV-pac y de SFV-RHR-pac mostraron un patrón muy similar, pues expresaban cantidades comparables de los monómeros nsp2 y nsp3. La cantidad de nsp2 y nsp3 en la línea celular resistente a puromicina BHK-SFV-S2-9-pac fue aproximadamente 1,5 veces más baja, lo que se podía deber a la menor replicación de este vector. Aunque sólo se detectaron cantidades insignificantes de productos de alto peso molecular en las muestras analizadas, se podían observar algunas bandas diferenciales entre SFV-S2-9 y los otros dos vectores con el antisuero contra nsp2, lo que podría indicar una pequeña alteración del procesamiento de la replicasa de S2-9 *in vivo*.

Ejemplo 6

Expresión del transgén y empaquetamiento del replicón SFV-S2-9

5 Para determinar el nivel de expresión del gen heterólogo en el mutante SFV-S2-9, se clonó el gen indicador LacZ a continuación del promotor subgenómico de SFV en este vector, lo que generó el plásmido pSFV-S2-9-LacZ. Se sintetizó *in vitro* ARN a partir de este plásmido y se utilizó para electroporar células BHK-21, en las que se analizó la expresión de β -gal a diferentes tiempos después de la electroporación. Se transfectaron células también con ARN del vector SFV-LacZ original, pero sólo se analizaron a las 24 horas tras la electroporación, debido al efecto citopático inducido por este vector. Se observó un nivel similar de expresión de β -gal en las células transfectadas con SFV-S2-9-LacZ y SFV-LacZ a las 24 horas de la transfección, siendo éste de aproximadamente 15 pg/célula (figura 6). Este nivel de expresión aumentó con el tiempo en las células transfectadas con SFV-S2-9-LacZ, alcanzando una estabilización a aproximadamente 30 pg de β -gal/célula a las 48 horas de la transfección. Para determinar la eficacia de empaquetamiento del doble mutante SFV-S2-9, se coelectroporaron células BHK-21 con ARN de SFV-S2-9-LacZ y los ARNs auxiliares SFV-helper-S2 y SFV helper-C-S219A tal y como está descrito (29). Se recogieron los sobrenadantes de las células a las 24 horas de la electroporación y se titularon sobre monocapas de células BHK-21 mediante tinción con X-gal. El ARN de SFV-S2-9-LacZ se empaquetó con poca eficacia, lo que proporcionó unos títulos de 7×10^3 pv/ml, que eran mucho más bajos que los obtenidos con el SFV-LacZ original (5×10^9 pv/ml). Para comprobar si la presencia de la replicasa de tipo silvestre podría aumentar la eficacia de empaquetamiento del doble mutante S2-9, se coelectroporaron las células BHK-21 con los ARNs de SFV-S2-9-LacZ, SFV-pac y ambos ARNs SFV auxiliares. En este caso, se observó que el vector SFV original era capaz de aumentar con moderación la producción de partículas de SFV-S2-9-LacZ, que alcanzaron un título de 1×10^5 pv/ml a las 24 horas de la electroporación, que se determinó mediante la tinción con X-gal de las células BHK infectadas. El empaquetamiento del ARN SFV-pac original disminuyó aproximadamente 5 veces en las células en las que este vector se coelectroporó con SFV-S2-9-LacZ ($2,6 \times 10^8$ pv/ml), en comparación con los títulos obtenidos cuando el SFV-pac se empaquetó solo ($1,2 \times 10^9$ pv/ml), lo que se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta de las células infectadas utilizando un antisuero policlonal de conejo específico contra la nsp2 del SFV como anticuerpo primario. Para determinar el efecto que cada una de las dos mutaciones individuales presentes en SFV-S2-9 tienen sobre el empaquetamiento, se coelectroporaron las células BHK-21 con ambos ARNs auxiliares de SFV y con los ARNs de SFV-RHR-pac o SFV-S2-pac, y se titularon las partículas víricas tal y como se describió anteriormente para SFV-pac. SFV-RHR-pac se empaquetó con títulos elevados ($6,5 \times 10^8$ pv/ml) mientras que SFV-S2-pac mostró una eficacia muy baja de empaquetamiento (2×10^4 pv/ml).

Ejemplo 7

35 *Producción de una línea celular estable que expresa LacZ utilizando el vector SFV-S2-9*

Tal y como se ha demostrado en este estudio, se puede utilizar el vector SFV-S2-9-pac para seleccionar las células que son capaces de mantener el replicón en presencia de puromicina. Para estudiar si era posible utilizar este tipo de vector para generar líneas celulares estables que expresen otros transgenes, se introdujo el gen indicador LacZ en pSFV-S2-9-pac, lo que generó el plásmido pSFV-S2-9-LacZ-pac, en el que los genes pac y LacZ están colocados en cadenas abajo de promotores subgenómicos independientes. Se sintetizó *in vitro* el ARN de este plásmido y se electroporó en las células BHK-21. A las 24 horas de la electroporación, se añadió puromicina a $5 \mu\text{g/ml}$ y, cuando las células seleccionadas alcanzaron la confluencia, se realizaron diez pases en presencia del antibiótico durante un periodo de 30 días. El porcentaje de células que expresaban β -gal, determinado en cada pase mediante tinción con X-gal, varió entre el 70% y el 90% según el pase, pero estaba por encima del 85% en el pase 10, lo que indicó una gran estabilidad de la expresión del transgén en presencia de selección (figura 7). Cuando las células seleccionadas se pasaron sin puromicina, el porcentaje de las células que expresaban β -gal disminuyó muy rápidamente, estando por debajo del 5% después de 3 pases. El nivel de la expresión de β -gal en las células seleccionadas con puromicina se determinó después de 6 y 8 pases, alcanzando 13 y 18 pg/célula, respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos en las células transfectadas con el vector SFV-LacZ original a las 24 horas de la transfección, lo que indica que las líneas celulares generadas con el vector SFV-S2-9 se podían utilizar para expresar proteínas recombinantes en grandes cantidades.

Ejemplo 8

55 *Evaluación de otros mutantes no citopáticos de SFV previamente definidos*

Las mutaciones que habían sido descrito previamente como no citopáticas para SFV se introdujeron en el gen de la subunidad nsp2 de la replicasa de SFV, en el plásmido pSFV-1, que contiene la secuencia del vector. Estas mutaciones incluyeron:

- L1 OT (cambio de TTG por ACC): mutante SF2A (22).
- L713P (cambio de CTA por CCT): mutante SF2C (22).

65 Además, el plásmido pSFV-PD que contiene la secuencia del vector de SFV con las mutaciones S259P y R650D en nsp2 fue cedido amablemente por el Dr. K. Lundström (21).

ES 2 304 880 B1

De esta forma se generaron (u obtuvieron) los plásmidos pSFV-SF2A, pSFV-SF2C y pSFV-PD, en los que se clonó el gen LacZ bajo el control del promotor subgenómico viral, obteniéndose los plásmidos: pSFV-SF2A-LacZ, pSFV-SF2C-LacZ y pSFV-PD-LacZ, respectivamente.

5 Estos plásmidos se utilizaron para sintetizar ARN *in vitro*, que fue electroporado en células BHK-21. Tras la electroporación las células fueron distribuidas en diferentes placas que se fijaron y tiñeron con X-gal a diferentes tiempos posttransfección. La tinción con X-gal produce una coloración azul en las células que están expresando β -gal a partir del gen LacZ, lo cual nos permite determinar el número de células que portan el vector y que han sobrevivido a diferentes tiempos así como analizar la morfología de las mismas, que es un indicador de citopatogenicidad. En este experimento se utilizó como control negativo células electroporadas con ARN de SFV-LacZ, que es citopático para las células BHK. Asimismo se utilizó como control positivo ARN de SFV-S2-LacZ, que lleva la mutación P718T en nsp2 y da lugar a un fenotipo no citopático en un cierto porcentaje de las células.

15 Como puede observarse en las figuras 10 y 12 los mutantes SFV-SF2A y SFV-PD mostraron un fenotipo muy similar al del vector silvestre de SFV, induciendo un fuerte efecto citopático en las células transfectadas, que se tradujo en la aparición de numerosos cuerpos apoptóticos a partir del día 3 y en una casi total ausencia de expresión a tiempos largos (7 días). Los datos referentes al carácter citopático del vector SFV-PD están además apoyados por resultados publicados posteriormente por el propio K. Lundström en los que se muestra como la expresión de β -gal o GFP en células BHK infectadas con un vector SFV-PD que porta LacZ o GFP como gen marcador alcanza un máximo a las 20 48 horas para después disminuir drásticamente en los 3-4 días subsiguientes (20, ver figura 2 de esta referencia). El mutante SFV-SF2C mostró un fenotipo algo menos citopático, pero a día 3 aparecen muchos cuerpos apoptóticos y aunque aparentemente a día 4 hay niveles altos de expresión, esta desaparece casi completamente a día 7, indicando que probablemente este mutante permita expresiones algo más prolongadas que el vector silvestre, pero sin dejar de ser citopático. El vector SFV-S2 es el único que no da lugar a la aparición de cuerpos apoptóticos y que permite mantener la expresión durante al menos 7 días dando lugar a la aparición de colonias. El vector SFV-S2-9 que porta las mutaciones P718T y R649H se seleccionó a partir de una de las colonias obtenidas con SFV-S2 cuando el gen LacZ se substituyó por el gen pac en dicho vector. En la figura 14 se incluyen fotos de células transfectadas con ARN del vector SFV-S2-9-LacZ y teñidas a diferentes tiempos con X-gal. El vector S2-9 no produjo efecto citopático en las células transfectadas, que fueron capaces dividirse.

30 Ejemplo 9

Construcciones de plásmidos

35 Previamente se han descrito los plásmidos pSFV-1 y pSFV3-LacZ, que fueron proporcionados amablemente por el Dr. P. Liljeström (Instituto Karolinska, Estocolmo) (18). Para construir los plásmidos pSFV-S2 y pSFV-S3, un fragmento de 3,5 kb que contenía el área de la nsp2 a mutagenizar se extrajo de pSFV-1 con SacI/XhoI y se subclonó en el plásmido pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, EE. UU.) digerido con las mismas enzimas, lo que generó el plásmido Blu-nsp2. Se introdujeron las mutaciones P718T y P718F en la nsp2 en este plásmido mediante PCR de entrecruzamiento. Se combinaron en secuencia los cebadores externos SF3669-VS (SEQ ID NO: 3) y SF4096-RS (SEQ ID NO: 4) con los pares de oligonucleótidos diseñados para introducir las respectivas mutaciones. Para S2, el par de oligonucleótidos internos utilizados fue mutS2-VS (SEQ ID NO: 5) y mutS2-RS (SEQ ID NO: 6) que se solapan en 25 nucleótidos y en los que el codón CCC que codifica la Pro 718 en nsp2 se ha mutado a ACG que codifica Thr (subrayada). Para S3, los oligonucleótidos internos utilizados fueron mutS3-RS (SEQ ID NO: 7) y mutS3-RS (SEQ ID NO: 8) que se solapan en 25 nucleótidos y en los que el codón CCC que codifica la Pro 718 de la nsp2 se ha mutado a TTT que codifica Phe (subrayada). La PCR de entrecruzamiento se realizó con la Pfu y produjo fragmentos de ADN de 430 pb que se digirieron con EagI/NarI y se clonaron en Blu-nsp2 después de digestión parcial con EagI y digestión total con NauI, lo que generó los plásmidos Blu-nsp2-S2 o Blu-nsp2-S3, respectivamente. Se confirmó la presencia de las mutaciones S2 o S3 en estos plásmidos por secuenciación. Finalmente, un fragmento SacI/XhoI de 3,5 kb que contenía la nsp2 mutada se extrajo de Blu-nsp2-S2 o de Blu-nsp2-S3 y se subclonó en pSFV-1 digerido con las mismas enzimas, lo que generó los plásmidos pSFV-S2 y pSFV-S3, respectivamente. Para clonar LacZ en estos plásmidos, un fragmento de ADN de 3,86 kb que contenía este gen se extrajo con XbaI/XmaI de pSFV3-LacZ y se clonó en pSFV-S2 o pSFV-S3 digeridos con las mismas enzimas, lo que generó los plásmidos pSFV-S2-LacZ y pSFV-S3-LacZ, respectivamente.

55 Para generar el plásmido p.SFV-pac, un fragmento de ADN de 0,95 kb que contenía el gen de la puromicina N-acetil-transferasa (pac) se extrajo del plásmido pBSpac (5) (amablemente proporcionado por el Dr. J. Ortin, CNB, Madrid, España) mediante digestión con NotI y HpaI. Después de hacer romo el extremo NotI con Klenow, se clonó este fragmento en pSFV-1 digerido con SmaI, lo que generó pSFV-pac. El plásmido pSFV-S2-pac se generó al sustituir el fragmento SacI/XhoI de 3,5 kb que contenía la mayor parte de la nsp2 en pSFV-pac por el mismo fragmento obtenido de Blu-nsp2-S2, que contiene la mutación S2.

65 El plásmido pSFV-S2-9-LacZ se generó al sustituir el fragmento RsrII/XhoI de 3,2 kb en pSFV3-LacZ por el mismo fragmento obtenido de pSFV-S2-9-pac que cubre el área de la replicasa que contiene las mutaciones P718T y R649H de nsp2. Para generar el doble vector pSFV-S2-9-LacZ-pac, un casete de 1,9 kb que contenía el promotor subgenómico de SFV seguido del gen pac se extrajo de pSFV-pac con MscI/SpeI, y se clonó en pSFV-S2-9-LacZ digerido con SmaI/SpeI.

ES 2 304 880 B1

Para generar pSFV-RHR-pac, primero se introdujo la mutación R649H de nsp2 en Blu-nsp2 por PCR. Brevemente, se obtuvo un fragmento de PCR de 1,67 kb con los oligonucleótidos SF1947-VS (SEQ ID NO: 9) y SF3623-S29-RS (SEQ ID NO: 10) con la Pfu utilizando el pSFV-1 como molde. En el último oligonucleótido se ha sustituido el codón CGC por CAC, lo que conduce a la mutación R649H en nsp2 (subrayada; adviértase que el cebador contiene la secuencia reversa). La secuencia de este oligonucleótido abarca el sitio NarI de nsp2 próximo a la mutación R649H (señalado en cursiva). El fragmento de PCR se digirió con BstEII/NarI, lo que dio lugar a un fragmento de ADN de 1,36 kb que se clonó en Blu-nsp2 digerido con las mismas enzimas, lo que generó, de este modo, Blu-nsp2-RHR. Finalmente, un fragmento SacI/XhoI de 3,5 kb que contenía la nsp2 mutada se extrajo del Blu-nsp2-RHR y se subclonó en pSFV-pac digerido con las mismas enzimas, lo que generó el plásmido pSFV-RHR-pac.

Ejemplo 10

Transcripción y transfección del ARN

Los ADN plasmídicos purificados se hicieron lineales mediante digestión con SpeI y se transcribieron en presencia de un análogo de cap (New England Biolabs, EE. UU.) utilizando la polimerasa SP6 (Amersham-Pharmacia). Los ARNs sintetizados *in vitro* se transfectaron en células BHK-21 mediante electroporación tal y como se describió previamente (17).

Ejemplo 11

Empaquetamiento de los replicones

El empaquetamiento del ARN recombinante de SFV en partículas víricas (pv) se realizó mediante la coelectroporación de las células BHK-21 con el ARN recombinante y con ambos ARNs auxiliares SFV helper-S2 y helper-C-S219A tal y como está descrito (29). Las partículas de SFV que llevaban LacZ como gen indicador se titularon por tinción con X-gal de las células BHK-21 infectadas con diluciones seriadas del virus. Para las partículas de SFV que llevaban el gen pac, la titulación se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta de las células BHK-21 infectadas con un antisuero policlonal de conejo específico contra la nsp2 de SFV como anticuerpo primario (E. Casales, resultados sin publicar).

Ejemplo 12

Selección y pases de las líneas celulares resistentes a la puromicina

Se prepararon una solución de puromicina (Sigma, St. Louis, EE. UU.) 1 mg/ml en MEM, se filtró, alicuoteó y se guardó a -20°C. Después de la transfección de las células BHK con los ARNs recombinantes de SFV que llevaban el gen pac, se permitió que las células se recuperaran durante 24 horas antes de añadir la puromicina a 5 µg/ml. Para seleccionar las células resistentes a la puromicina, se reemplazó el medio cada 2 a 3 días por un medio nuevo que contenía puromicina. Tras la selección, siempre se hacían los pases de las células en presencia de puromicina a la concentración indicada. En el caso de las células transfectadas con SFV-S2-pac, se clonaron focos individuales, se expandieron y se guardaron congelados en nitrógeno líquido. El medio utilizado para crecer las células fue BHK-21 Glasgow MEM (Invitrogene, EE.UU.) suplementado con de suero fetal bovino al 5%, medio triptosa fosfato (Invitrogene, EE.UU.) al 10%, glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, estreptomycin a 100 µg/ml y penicilina a 100 IU/ml (medio BHK completo).

Ejemplo 13

Cartografía de las mutaciones adaptativas

El ARN celular total de las células resistentes a la puromicina obtenidas después de la transfección con el ARN del SFV-S2-pac se aisló con el kit RNeasy (Qiagen, Alemania). Se utilizaron 5 µg de ARN de cada clon para sintetizar un ADNc con la transcriptasa inversa de M-MLV (Promega, Madison, EE. UU.) utilizando un oligonucleótido de sentido negativo complementario a los nucleótidos 4977 a 5010 del SFV (SEQ ID NO: 11) como cebador. Después de la transcripción inversa, se amplificaron los ADNc mediante 30 ciclos de PCR con Taq Plus Long (Stratagene, La Jolla, EE. UU.), con el mismo cebador de sentido negativo y un oligonucleótido de sentido positivo complementario a los nucleótidos 1040 a 1074 de SFV (SEQ ID NO: 12). El fragmento resultante de 3971 pb se digirió con BcII (1106) y Bsu36I (4916) y se clonó en los correspondientes sitios de pSFV-pac. El ADN plasmídico derivado de cada clon individual se hizo lineal y se utilizó como molde para sintetizar el ARN *in vitro*, que se transfectó posteriormente en las células BHK-21 para determinar su capacidad para conferir resistencia a la puromicina. Cuando la subregión comprendida entre las posiciones 1106 a 4916 fue capaz de permitir la supervivencia y la división de las células en presencia de puromicina, como fue el caso del clon S2-9, se secuenció completamente a partir de dos clones plasmídicos independientes.

65

ES 2 304 880 B1

Ejemplo 14

Análisis del ARN

5 Se extrajo el ARN total de las células transfectadas o de determinadas líneas celulares utilizando un minikit de RNeasy (Qiagen, Alemania) y se analizó mediante transferencia Northern. Se fraccionaron por tamaño 3 μ g de ARN total en un gel de agarosa al 1,2% con formaldehído, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-N+, Amersham) y se hibridó con un oligonucleótido marcado con 32 P específico del promotor subgenómico de SFV (SEQ ID NO: 13). Se determinaron las cantidades relativas de los ARNs genómicos y subgenómicos de SFV utilizando un PhosphorImager (Cyclone, Packard, EE. UU.) y el software Optiquant (versión 4.0, Packard).

Ejemplo 15

Análisis de la expresión y el procesamiento de la replicasa

15 Para los experimentos de la traducción *in vitro*, los ARNs de SFV primero se transcribieron *in vitro* tal y como se describió previamente, se purificaron con el kit RNeasy (Qiagen, Alemania), se mezclaron con lisados de reticulocitos de conejo tratados con nucleasa (Promega) en presencia de una mezcla de [35 S]-metionina y [35 S]-cisteína (Amersham, EE. UU.) y se incubaron durante 90 minutos a 30°C según las instrucciones del fabricante. Cada reacción de traducción contenía 2,3 μ g de ARN transcrito purificado. Las reacciones de traducción se finalizaron al añadir el tampón de carga de Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8% seguido de una autorradiografía. Para los experimentos de análisis por inmunotransferencia, se obtuvieron lisados de las células BHK-21 transfectadas con los vectores de SFV mediante incubación en un tampón que contenía Igepal al 1% (Sigma, EE. UU.), Tris HCl a 50 mM, pH 7,6, NaCl a 150 mM, EDTA a 2 mM y PMSF a 1 μ g/ml (Sigma, St. Louis, EE. UU.), se clarificaron por centrifugación durante 6 minutos a 6000 rpm en una microcentrífuga refrigerada y se cuantificaron mediante un análisis de Bradford. Los lisados se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con antisueros policlonales de conejo específicos contra la nsp2, la nsp3 de SFV (E. Casales, resultados sin publicar) o actina (Sigma, St. Louis, EE. UU.) como anticuerpos primarios, respectivamente. Se utilizó un antisuero de oveja específico para inmunoglobulinas de conejo conjugado con HRP como anticuerpo secundario. Se visualizaron las proteínas utilizando Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los estudios de localización nuclear, se realizó la inmunofluorescencia indirecta de las células transfectadas utilizando como anticuerpo primario un Acm específico contra la nsp2 citoplásmica de SFV (amablemente proporcionado por W. Bodemer) o un Acm específico contra la nsp2 nuclear de SFV (amablemente proporcionado por el Dr. L. Kaariainen) (16).

Ejemplo 16

Análisis de la expresión de β -gal

40 Se lisaron las células transfectadas tal y como se describió anteriormente y se midió la actividad total de la β -gal presente en el lisado tal y como está descrito (17), o se tiñeron a los tiempos indicados con X-gal. La cantidad de la proteína producida por cada célula se obtuvo al dividir la cantidad media de β -gal detectada por placa entre la cantidad media de las células transfectadas en cada placa.

Ejemplo 17

Obtención de líneas celulares estables productoras de cardiotrofina 1 utilizando el vector SFV-S2-9: construcción de plásmidos

50 Con objeto de generar líneas celulares estables que expresen constitutivamente cardiotrofina, proteína de interés terapéutico, se generaron plásmidos basados en SFV-S2-9-pac incorporando el gen de la cardiotrofina de rata (CTr) según 2 realizaciones distintas:

- 55 - el plásmido pSFV-S2-9-CTr-pac, en el que los genes pac y CTr están colocados cadena abajo de promotores subgenómicos independientes (Figura 15A); y
- el plásmido pSFV-S2-9-pac2A-CTr, construido siguiendo la estructura general descrita en la Figura 8B, que contenía el gen pac y el gen CTr fusionados cadena abajo de un único promotor subgenómico (figura 15A).

60 En este segundo plásmido se introdujo entre los dos genes la secuencia de la autoproteasa 2A de FMDV (SEQ ID NO:14) (35) para permitir la liberación de la cardiotrofina de la proteína de fusión (Figura 15-A).

65 Para construir el plásmido pSFV-S2-9-CTr-pac previamente se generó el vector de clonaje pSFV-S2-9-mcs-pac, que contiene la replicasa de SFV-S2-9, un primer promotor subgenómico seguido de un sitio múltiple de clonaje y un segundo promotor subgenómico seguido del gen pac.

ES 2 304 880 B1

Brevemente se hibridaron los oligonucleótidos SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, generándose un fragmento de DNA sintético con extremos 5' protuberantes compatibles con BamHI, y cuya secuencia contiene un sitio múltiple de clonaje con dianas para los enzimas AvrII, ApaI, NruI y BstBI, tres codones de terminación de la traducción en las tres posibles fases de lectura y la secuencia del promotor subgenómico de SFV. Este fragmento se clonó en el sitio BamHI de pSFV-S2-9-pac generándose el plásmido pSFV-S2-9-mcs-pac.

En una segunda etapa se sintetizó un fragmento de PCR de 645 pb que contenía el gen de la cardiotrofina de rata a partir del plásmido pRSET-CTr (36) utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, que hibridan con el comienzo y el final del gen CTr respectivamente y contienen sitios BamHI en los extremos para facilitar el clonaje. El fragmento de PCR se digirió con BamHI y se clonó en el sitio BamHI de pSFV-S2-9-mcs-pac, obteniéndose el plásmido pSFV-S2-9-CTr-pac. De una manera similar el mismo fragmento de PCR fue clonado en pSFV-1 digerido con BamHI, generándose el plásmido pSFV-CTr.

Para construir el plásmido pSFV-S2-9-pac2A-CTr se generó previamente el vector de clonaje pSFV-S2-9-pac2A, que contiene la secuencia del vector SFV-S2-9-pac en la que el gen pac está fusionado en fase en su extremo 3' con la secuencia de la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (35), conteniendo al final de esta secuencia el sitio de clonaje SmaI/XmaI. Brevemente, utilizando el plásmido pSFV-S2-9-pac como molde se hizo una PCR cruzada con los oligonucleótidos externos: SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, e internos: SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, generándose un fragmento de ADN de 842 pb que se digirió con BamHI y XmaI y se clonó en pSFV-S2-9-pac digerido con los mismos enzimas, obteniéndose de esta forma el plásmido pSFV-S2-9-pac2A. La PCR cruzada se hizo con el doble objetivo de introducir la secuencia 2A-XmaI en el extremo 3' del gen pac y simultáneamente eliminar un sitio XmaI presente en el interior de ese gen.

Finalmente para generar pSFV-S2-9-pac2A-CTr se sintetizó un fragmento de PCR de 645 pb que contenía el gen de la cardiotrofina de rata a partir del plásmido pRSET-CTr (36), utilizando los oligonucleótidos: SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, que hibridan con el comienzo y el final del gen de CTr respectivamente y contienen sitios XmaI en los extremos para facilitar el clonaje. El fragmento de PCR se digirió con XmaI y se clonó en el sitio XmaI de pSFV-S2-9-pac2A, obteniéndose el plásmido pSFV-S2-9-pac2A-CTr.

Ejemplo 18

Obtención de líneas celulares estables productoras de cardiotrofina utilizando el vector SFV-S2-9: obtención de las líneas celulares y análisis de la expresión de cardiotrofina

El ARN de cada plásmido sintetizado *in vitro* (ejemplo 17) se electroporó en células BHK-21. A las 24 horas de la electroporación, se añadió puomicina a 5 µg/ml y, cuando las células seleccionadas alcanzaron confluencia, se analizó la expresión de cardiotrofina en los lisados celulares mediante inmunotransferencia con un anticuerpo específico para cardiotrofina (Figura 15B).

Para los experimentos de análisis por inmunotransferencia, se obtuvieron lisados de las células BHK-21 transfectadas con los vectores de SFV mediante incubación en un tampón que contenía Igepal al 1% (Sigma, EE. UU.), Tris HC1 a 50 mM, pH 7,6, NaCl a 150 mM, EDTA a 2 mM y PMSF a 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, EE. UU.), se clarificaron por centrifugación durante 6 minutos a 6000 rpm en una microcentrifuga refrigerada y se cuantificaron mediante un análisis de Bradford. Los lisados se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con un antisuero policlonal específico contra cardiotrofina CT-1 murina (R&D Systems) o actina (Sigma, St. Louis, EE. UU.) como anticuerpos primarios, respectivamente. Se utilizó un antisuero de cabra u oveja específico para inmunoglobulinas de rata o conejo, respectivamente, conjugado con HRP como anticuerpo secundario. Las proteínas se visualizaron utilizando Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para cuantificar los niveles de CTr se analizaron por inmunotransferencia diferentes cantidades de lisados de las células que expresaban CTr y se compararon con cantidades conocidas de cardiotrofina recombinante, utilizando para ello el programa Imagequant TL (Amersham).

Los niveles de expresión de cardiotrofina en las líneas generadas con cada uno de los vectores eran similares a los obtenidos en células electroporadas con ARN del vector con la replicasa silvestre SFV-CTr (figura 15B). La expresión de CTr en las líneas seleccionadas era aproximadamente de 4,3 pg/célula. En las líneas generadas con el vector SFV-S2-9-pac2A-CTr se observó que la mayor parte de la CTr se había liberado de la proteína de fusión, aunque había una fracción no digerida que también se detectaba por inmunotransferencia.

Para valorar la estabilidad del vector en las células transfectadas se realizaron diez pases sucesivos de las células que lo contenían, en presencia de puomicina durante un periodo de unos 20 días. Se determinó la expresión de CTr en cada pase en lisados celulares mediante inmunotransferencia, y se observó que la expresión de la CTr se mantenía estable en todos los pases (Figura 16).

Referencias

1. **Agapov, E. V., I. Frolov, B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, S. Schlesinger y C. M. Rice.** 1998 Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12989-94.
2. **Berglund, P., M. Sjöberg, H. Garoff, G. J. Atkins, B. J. Sheahan y P. Liljeström.** 1993. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (NY)* 11: 916-20.
3. **Berglund, P., C. Smerdou, M. N. Fleeton, I. Tubulekas y P. Liljeström.** 1998. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16: 562-5.
4. **Bredenbeek, P. J., I. Frolov, C. M. Rice y S. Schlesinger.** 1993. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67: 6439-46.
5. **de la Luna, S. I. Soria, D. Pulido, J. Ortin y A. Jimenez.** 1998. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene* 62: 121-6.
6. **Fazakerley, J. K., A. Boyd, M. L., Mikkola y L. Kaariainen.** 2002. A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsp2 protein affects the neurovirulence of Semliki forest virus. *J. Virol.* 76: 392-6.
7. **Frolov, I., E. Agapov, T. A. Hoffman, Jr., B. M. Pragai, M. Lippa, S. Schlesinger y C. M. Rice.** 1999. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J. Virol.* 73: 3854-65.
8. **Frolov, I., E. Frolova y S. Schlesinger.** 1997. Sindbis virus replicons and Sindbis virus: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA. *J. Virol.* 71: 2819-29.
9. **Frolov, I., y S. Schlesinger.** 1994. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J. Virol.* 68: 1721-7.
10. **Frolov, I., y S. Schlesinger.** 1994. Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* 68: 8111-7.
11. **Frolova, E. I., R. Z. Fayzulin, S. H. Cook, D. E. Griffin, C. M. Rice y I. Frolov.** 2002. Roles of nonstructural protein nsp2 and alfa/beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J. Virol.* 76: 11254-64.
12. **Garmashova, N., R. Gorchakov, E. Frolova y I. Frolov.** 2006. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J. Virol.* 80: 5686-96.
13. **Glasgow, G. M., M. M. McGee, B. J. Sheahan y G. J. Atkins.** 1997. Death mechanisms in cultured cells infected by Semliki Forest virus. *J. Gen. Virol.* 78: (Pt: 7): 1559-63.
14. **Glasgow, G. M., M. M. McGee, C. J. Tarbatt, D. A. Mooney, B. J. Sheahan y G. J. Atkins.** 1998. The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 10): 2405-10.
15. **McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson y P. Liljeström.** 2005. Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell.* 16:3753-63.
16. **Kujala, P. M. Rikonen, T. Ahola, M. Kelve, M. Saarma y L. Kaariainen.** 1997. Monoclonal antibodies specific for Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt: 2): 343-51.
17. **Liljeström, P., y H. Garoff.** 1994. Expresion of proteins using Semliki Forest virus vectors, pág. 16.20.11–16.20.16. En: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman y K. Struhl (ed.), “Current protocols in molecular biology”, vol. 2. Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, Nueva York, N. Y.
18. **Liljeström, P., y H. Garoff.** 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (NY)* 9: 1356-61.
19. **Lundström, K.** 2003. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev. Vaccines* 2: 447-59.
20. **Lundström, K., A. Abenavoli, A. Malgaroli y M. U. Ehrenguber.** 2003. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol. Ther.* 7: 202-9.

ES 2 304 880 B1

21. **Lundström, K., D. Rotmann, D. Hermann, E. M. Schneider y M. U. Ehrenguber.** 2001. Novel mutant Semliki Forest virus vectors: gene expression and localization studies in neuronal cells. *Histochem. Cell. Biol.* 115: 83-91.
- 5 22. **Perri, S., D. A. Driver, J. P. Gardner, S. Scherrill, B. A. Belli, T. W. Dubensky, Jr. y J. M. Polo.** 2000. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki Forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* 74: 9802-7.
- 10 23. **Petrakova, O., E. Volkova, R. Gorchakov, S. Paessler, R. M. Kinney y I. Frolov.** 2005. Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in mammalian cells. *J. Virol.* 79: 7597-608.
- 15 24. **Polo, J. M., B. A. Belli, D. A. Driver, I. Frolov, S. Sherrill, M. J. Hariharan, K. Townsend, S. Perry, S. J. Mento, D. J. Jolly, S. M. Chang, S. Schlesinger y T. W. Dubensky, Jr.** 1999. Stable alphavirus packaging cells lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 4598-603.
- 20 25. **Pushko, P., M. Parker, G. V. Ludwig, N. L. Davis, R. E. Johnston y J. F. Smith.** 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes *in vitro* an immunization against heterologous pathogens *in vivo*. *Virology* 239: 398-401.
- 25 26. **Rayner, J. O., S. A. Dryga y K. I. Kamrud.** 2002. Apphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 12: 279-96.
27. **Rikkonen, M.** 1996. Functional significance of the nuclear-targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* 218: 352-61.
28. **Sjoberg, E. M., M. Suomalainen y H. Garoff.** 1994. A significantly improved Semliki Forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. *Biotechnology* (NY) 12: 1127-31.
- 30 29. **Smerdou, C., y P. Liljeström.** 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. *J. Virol.* 73: 1092-8.
- 35 30. **Strauss, J. H y E. G. Strauss.** 1994. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491-562.
31. **Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco y M. Esteban.** 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* 20: 87-100.
- 40 32. **White, C. L., M. Thomson y N. J. Dimmock.** 1998. Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J. Virol.* 72: 4320-6.
- 45 33. **Wurm, F., y A. Bernard.** 1999. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 156-9.
34. **Xiong, C., R. Levis, P. Shen, S. Schlesinger, C. M. Rice y H. V. Huang.** 1989. Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 243: 1188-91.
- 50 35. **Ryan MD y J Drew.** Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 1994. 13: 928-33.
- 55 36. **Iñiguez M, C Berasain, E Martinez-Anso, M Bustos, P Fortes, D Pennica, MA Avila, y J Prieto.** 2006. Cardioprophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *J Exp Med.* 203: 2809-15.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de vectores virales para la generación *in vitro* de líneas celulares estables con capacidad de expresar constitutivamente proteínas heterólogas donde dichos vectores contienen un replicón del virus del Bosque de Semliki (SFV) que codifica la enzima replicasa viral la cual comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2.
- 10 2. Uso de vectores virales, según las reivindicación 1, donde la proteína heteróloga expresada de forma constitutiva es la cardiotrofina 1.
- 15 3. Uso de vectores virales, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el replicón de SFV comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, entre las cuales se intercalan genes de selección y genes heterólogos.
- 20 4. Uso de vectores virales, según la reivindicación 3, donde el gen heterólogo intercalado entre las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 es el gen que codifica la proteína cardiotrofina 1.
- 25 5. Líneas celulares estables con capacidad de expresar constitutivamente proteínas heterólogas, **caracterizadas** porque son líneas celulares transfectadas con vectores virales que contienen un replicón de SFV que codifica la enzima replicasa viral la cual comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2.
- 30 6. Líneas celulares estables con capacidad de expresar constitutivamente proteínas heterólogas, según la reivindicación 5, donde la proteína heteróloga expresada de forma constitutiva es la cardiotrofina 1.
- 35 7. Líneas celulares estables, según las reivindicaciones 5 ó 6, donde las líneas celulares han sido transfectadas con vectores virales que contienen un replicón de SFV que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, entre las cuales se intercalan genes de selección y genes heterólogos.
- 40 8. Líneas celulares estables, según las reivindicación 7, donde el gen heterólogo intercalado entre las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 es el gen que codifica la proteína cardiotrofina 1.
- 45 9. Método para la generación *in vitro* de líneas celulares estables con capacidad de sintetizar proteínas heterólogas de forma constitutiva que comprende:
- 50 I. transfectar células con vectores virales que contienen un replicón de SFV que codifica la enzima replicasa viral la cual comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2;
- 55 II. seleccionar las células estables generadas en el paso I; y
- 60 III. crecer y mantener las células estables.
- 65 10. Método, según la reivindicación 9, donde la proteína heteróloga sintetizada de forma constitutiva es la cardiotrofina 1.
11. Método para la generación *in vitro* de líneas celulares estables, según las reivindicaciones 9 ó 10, donde las células son transfectadas con vectores virales que contienen un replicón de SFV que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, entre las cuales se intercalan genes de selección y genes heterólogos.
12. Método, según la reivindicación 11, donde el gen heterólogo intercalado entre las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 es el gen que codifica para la proteína cardiotrofina 1.
13. Uso de líneas celulares estables, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para la producción *in vitro* de proteínas recombinantes.
14. Uso de líneas celulares estables, según las reivindicación 13, donde la proteína recombinante producida de forma constitutiva es la cardiotrofina 1.
15. Método para la producción *in vitro* de proteínas recombinantes que comprende:
- I. transfectar células con vectores virales que contienen un replicón de SFV que codifica la enzima replicasa viral la cual comprende las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2;
- II. seleccionar las células estables, generadas en el paso I;
- III. crecer y mantener las células estables; y
- IV. extraer la proteína.

ES 2 304 880 B1

16. Método, según la reivindicación 15, donde la proteína recombinante sintetizada de forma constitutiva es la cardiotrofina 1.

5 17. Método para la producción *in vitro* de proteínas recombinantes, según la reivindicaciones 15 ó 16, donde las células son transfectadas con vectores virales que contienen un replicón de SFV que comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, entre las cuales se intercalan genes de selección y genes heterólogos.

10 18. Método según la reivindicación 17 donde el gen heterólogo intercalado entre las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 es el gen de la cardiotrofina 1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

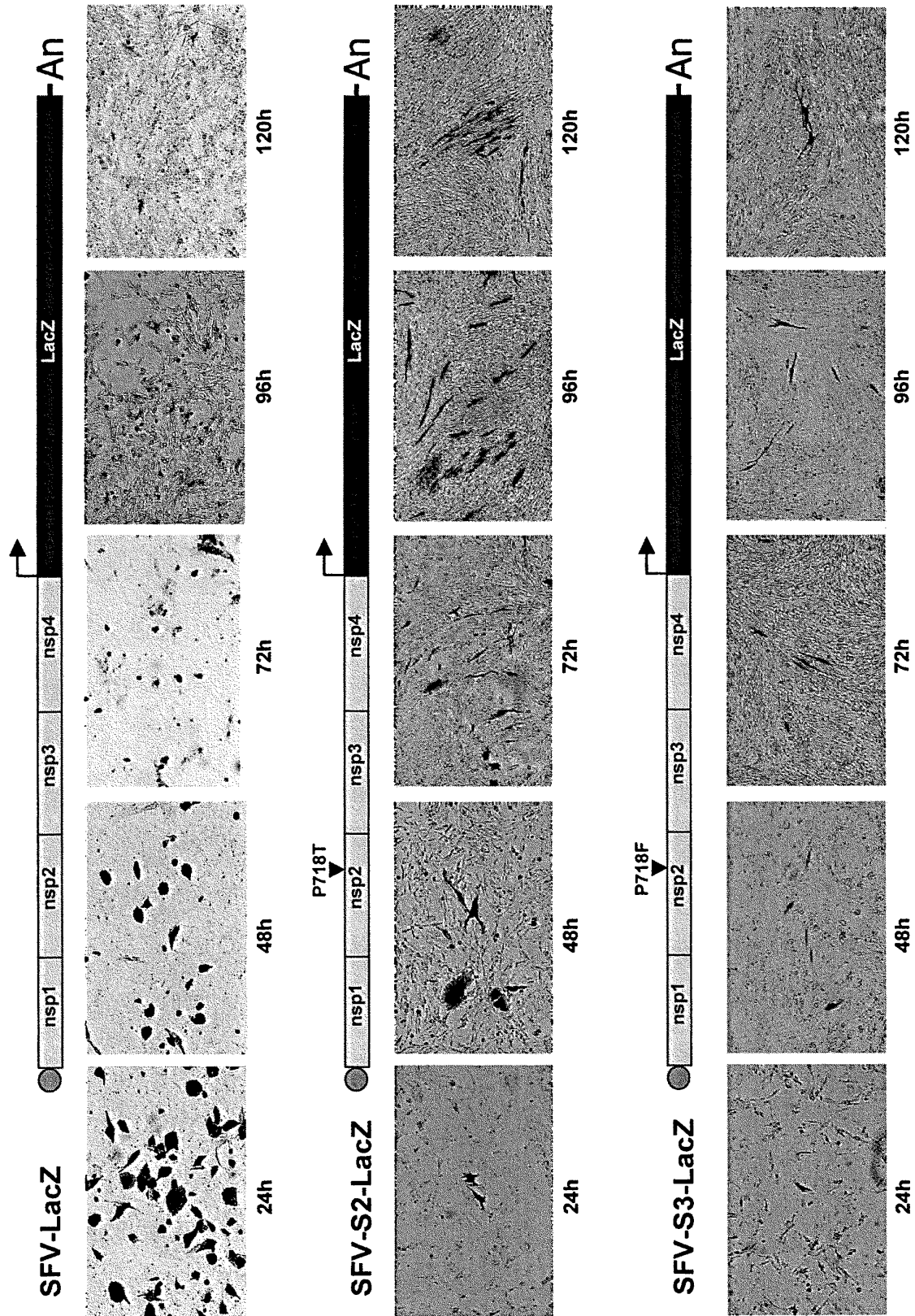


FIG. 1

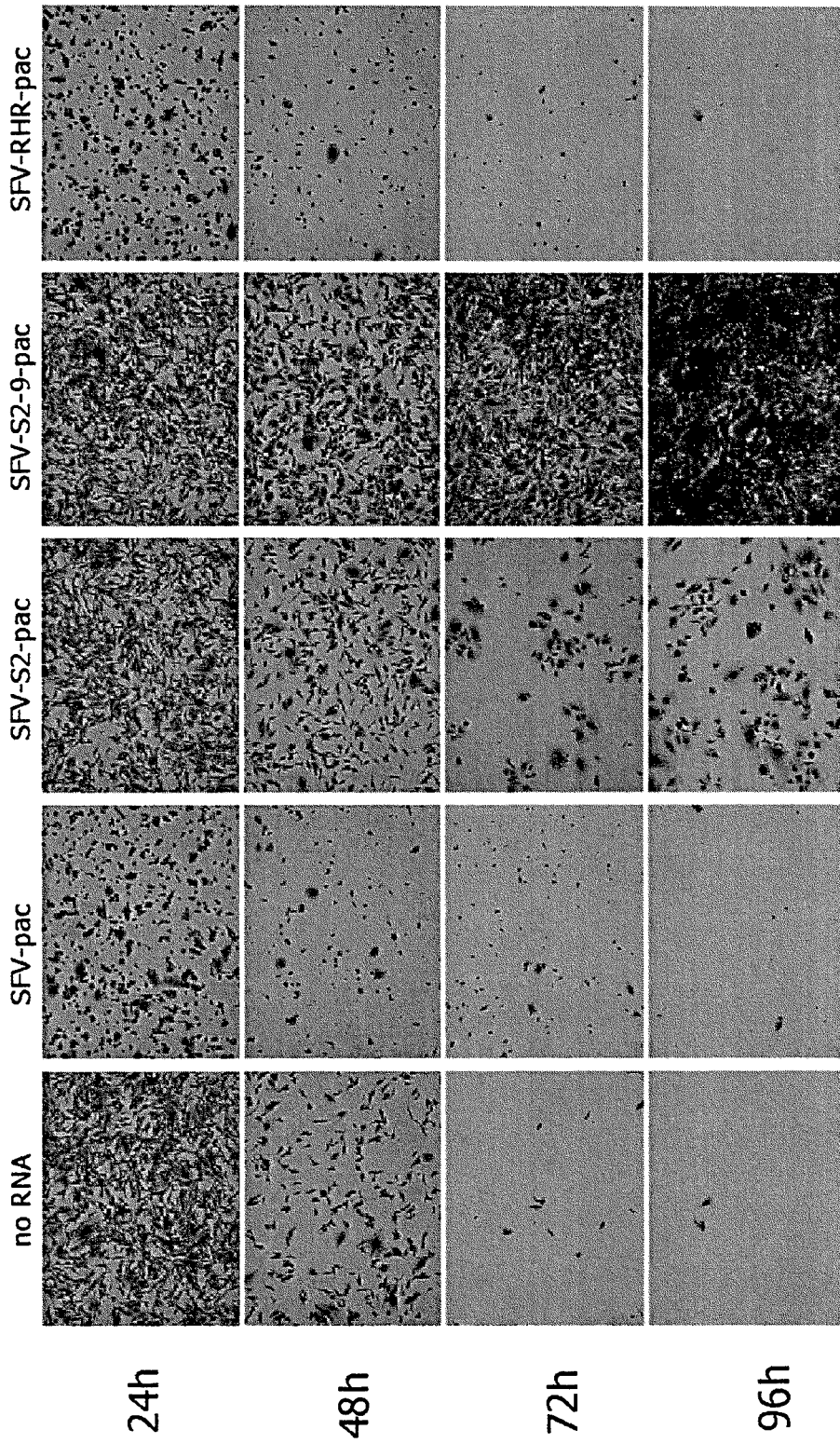


FIG. 2

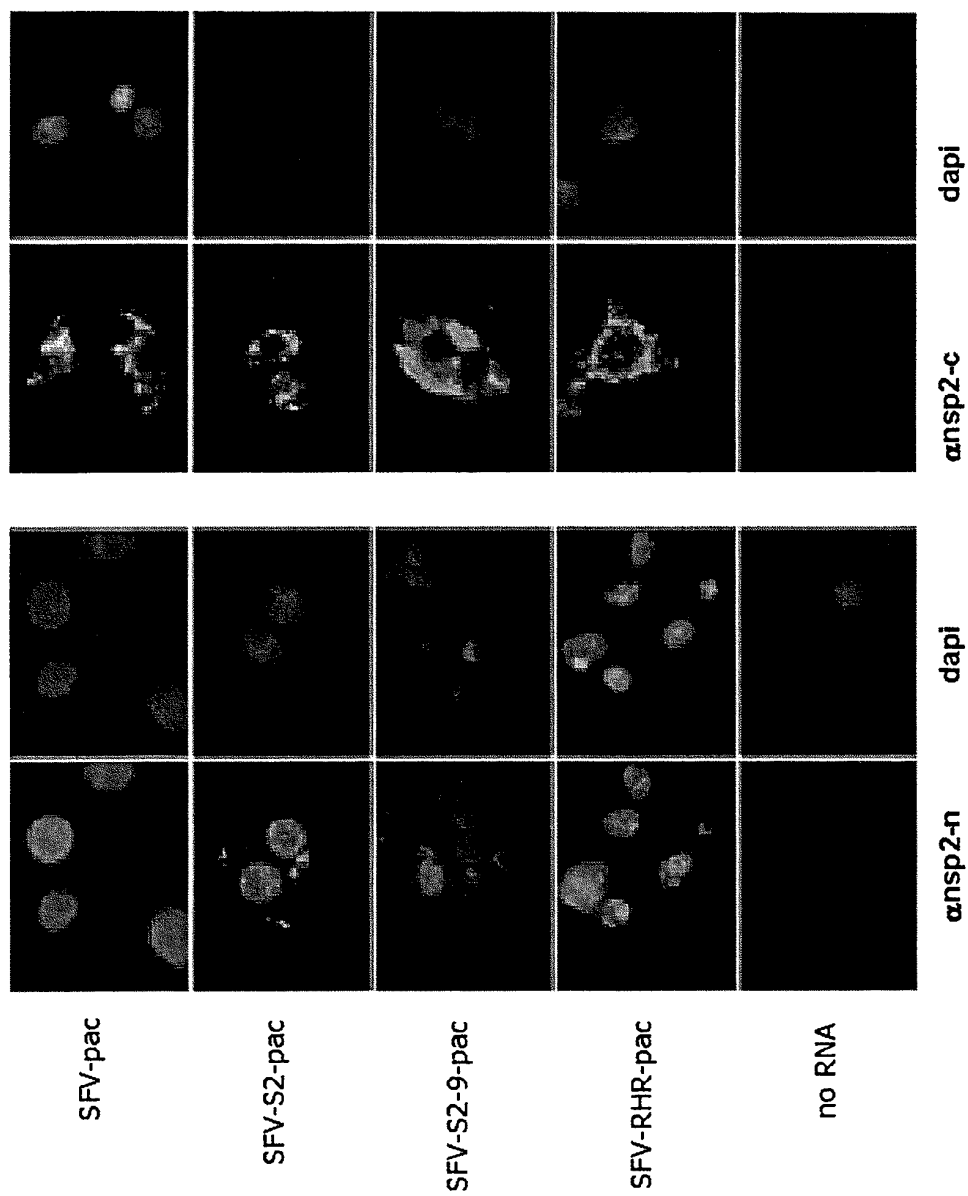


FIG. 3

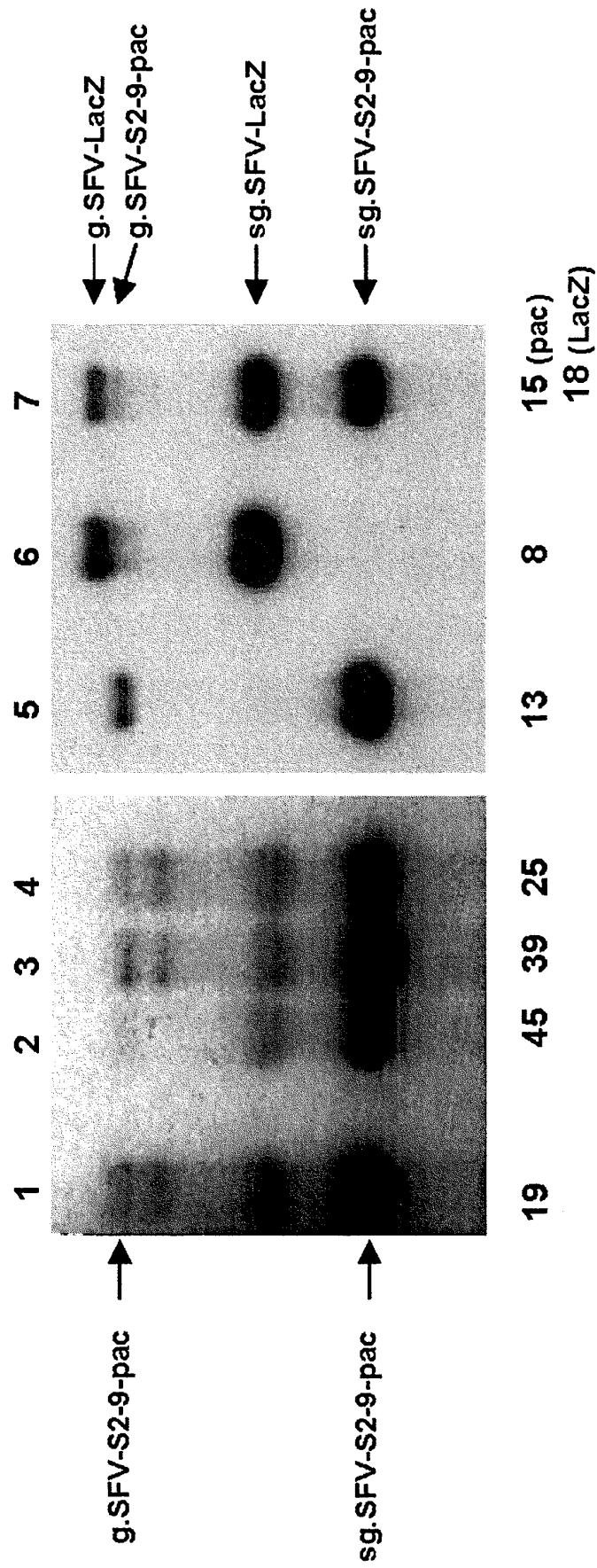


FIG. 4

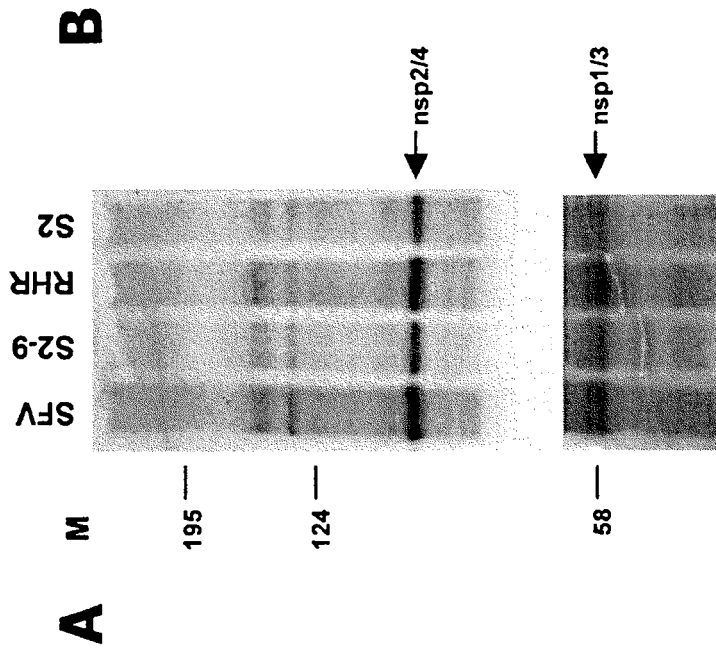
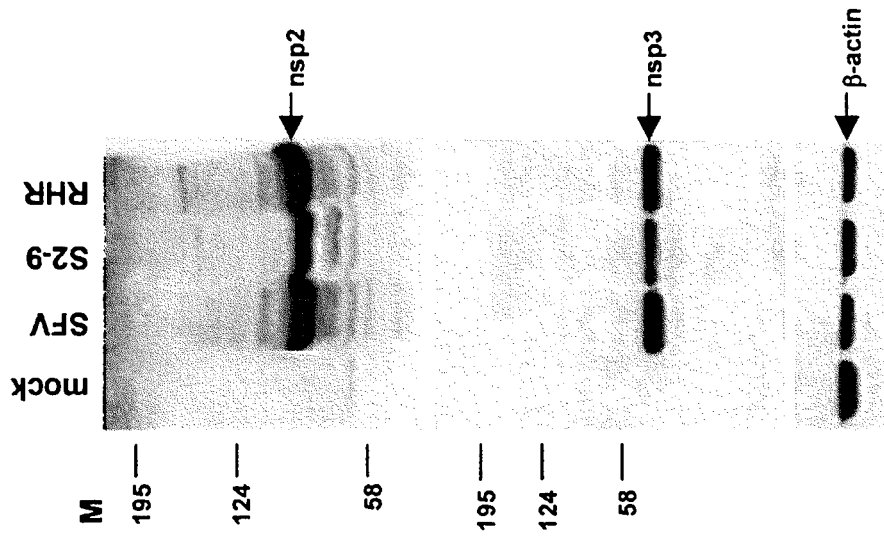


FIG. 5

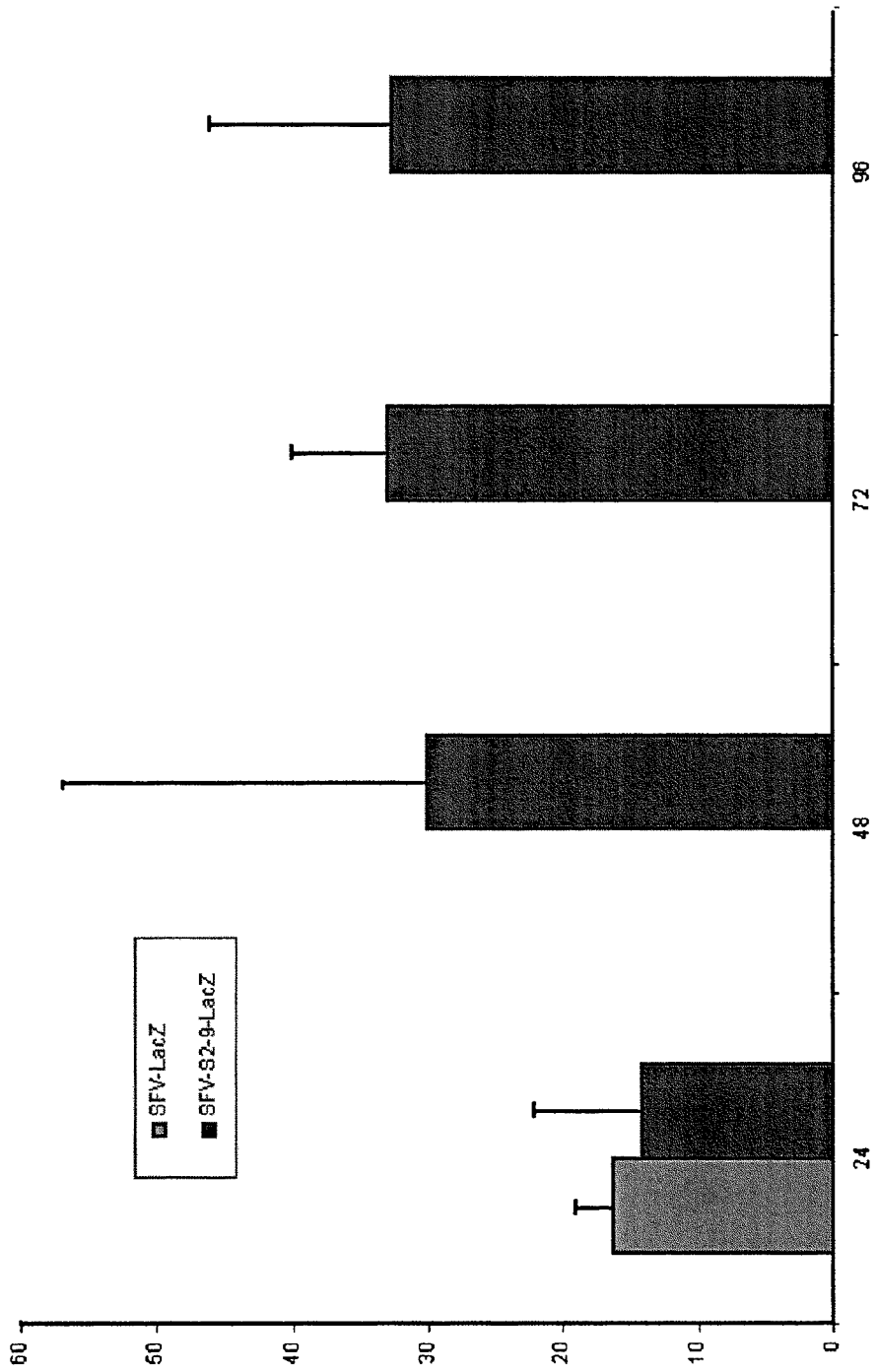


FIG. 6

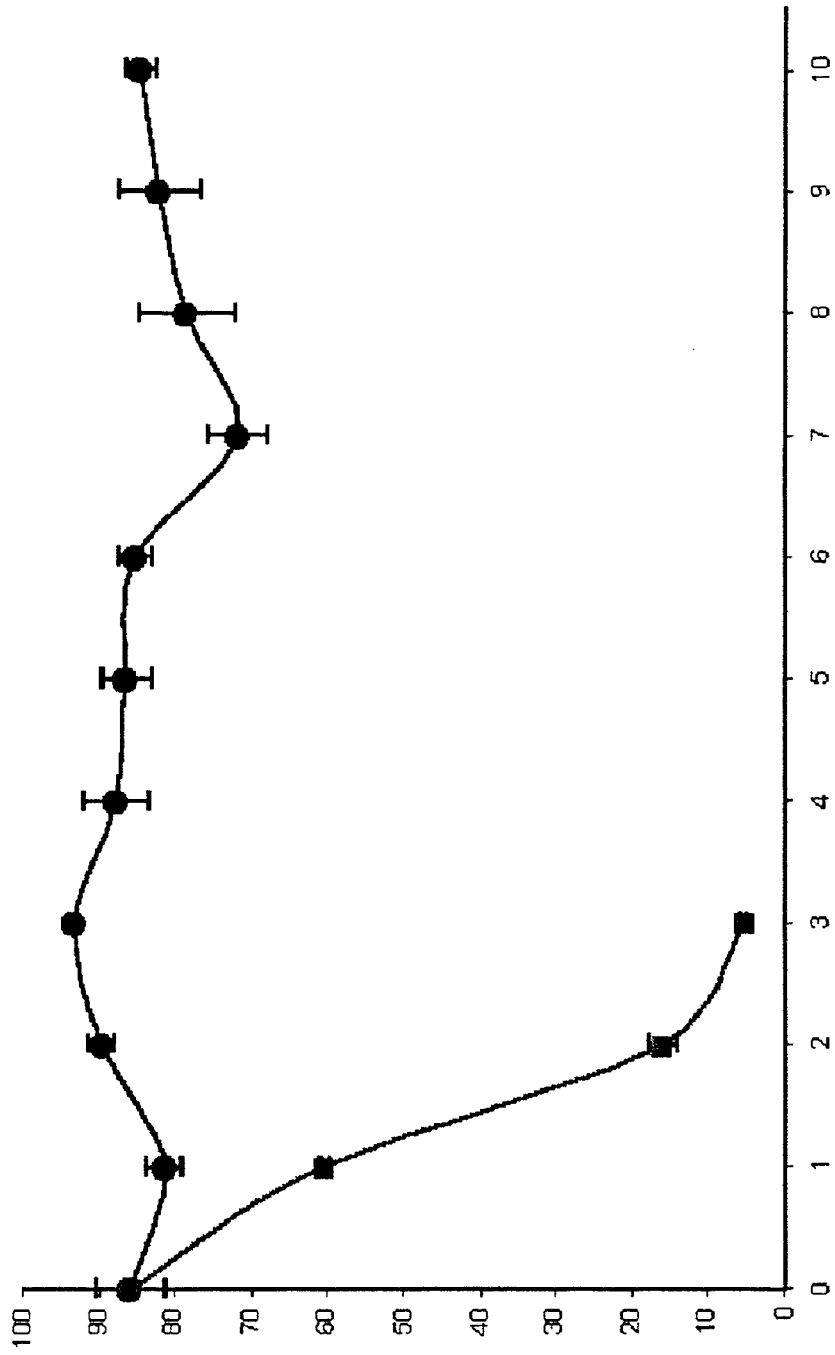


FIG. 7

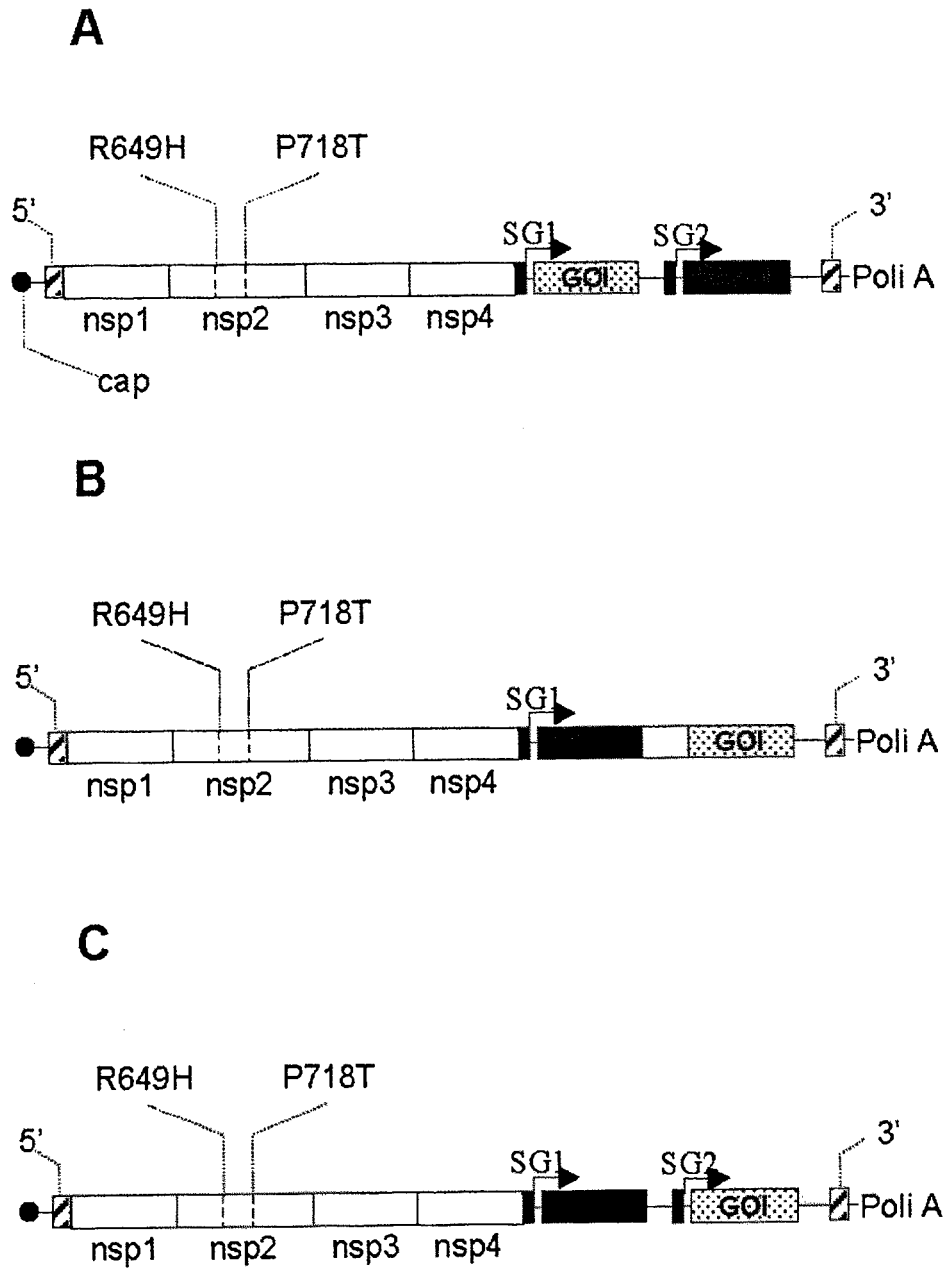


FIG. 8

SFV-LacZ (wt)

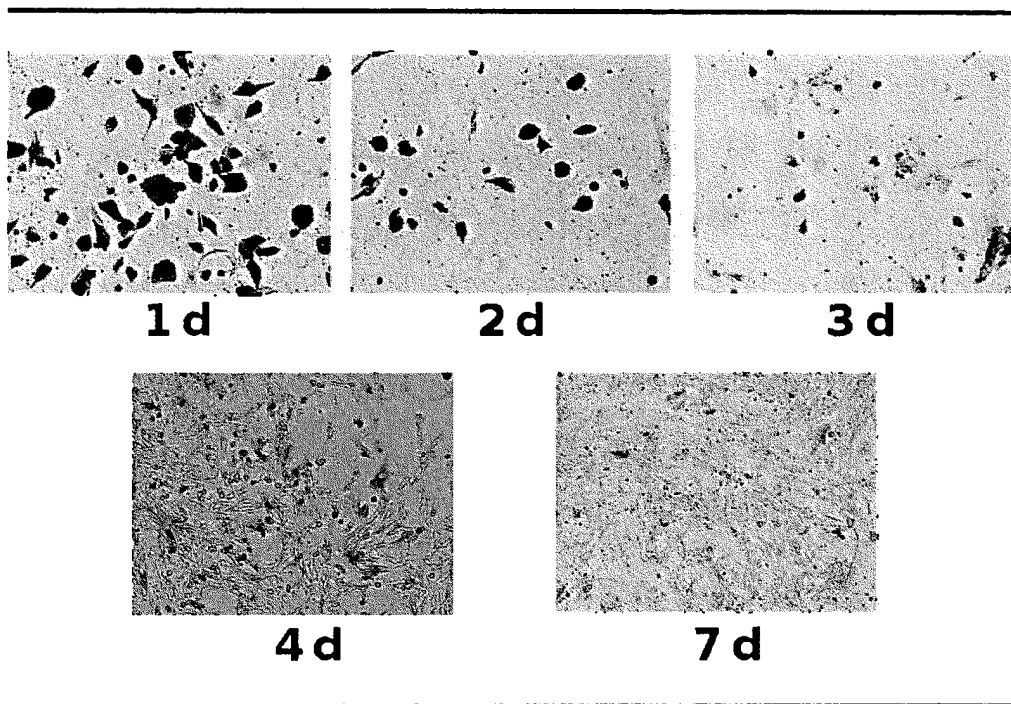


FIG. 9

SFV-SF2A-LacZ

L-10-T

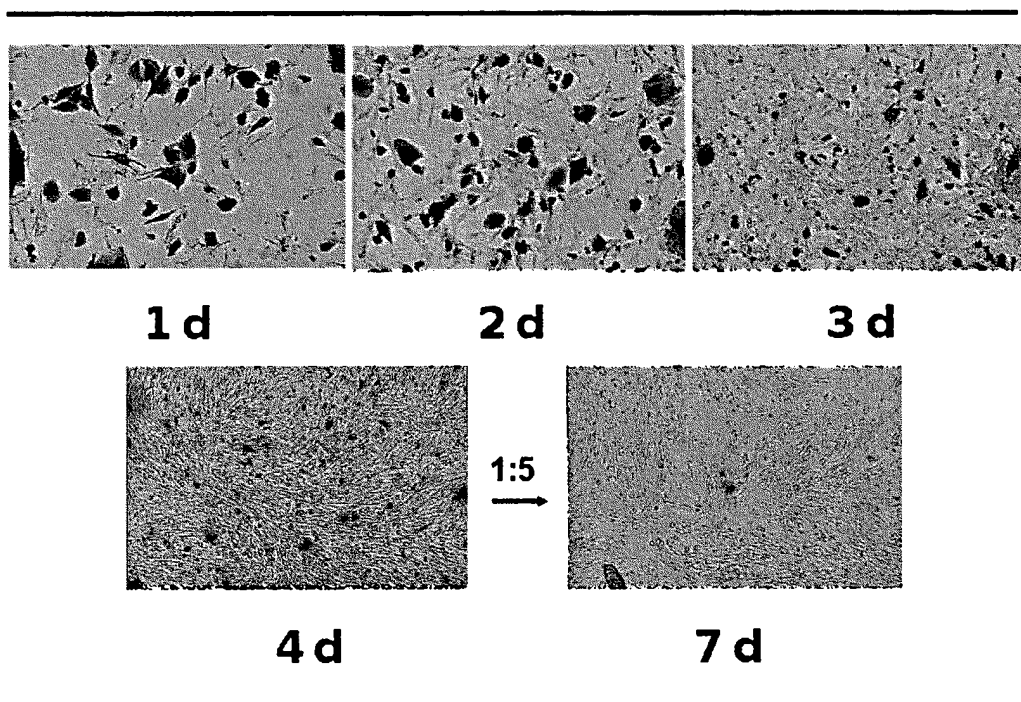


FIG. 10

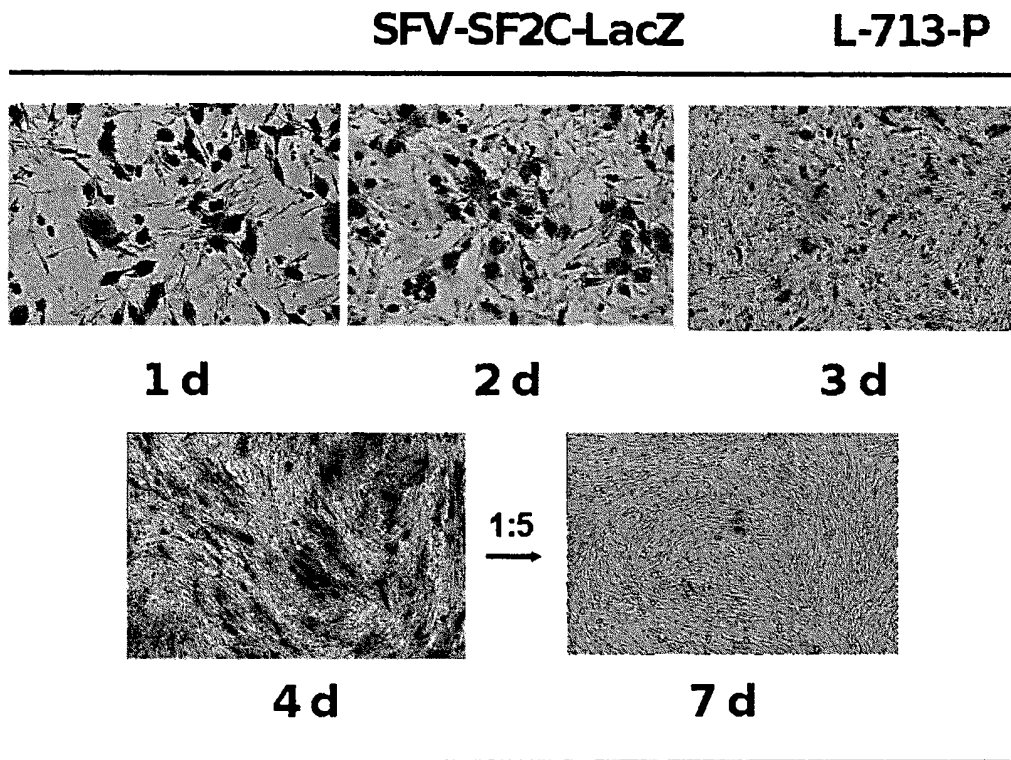


FIG. 11

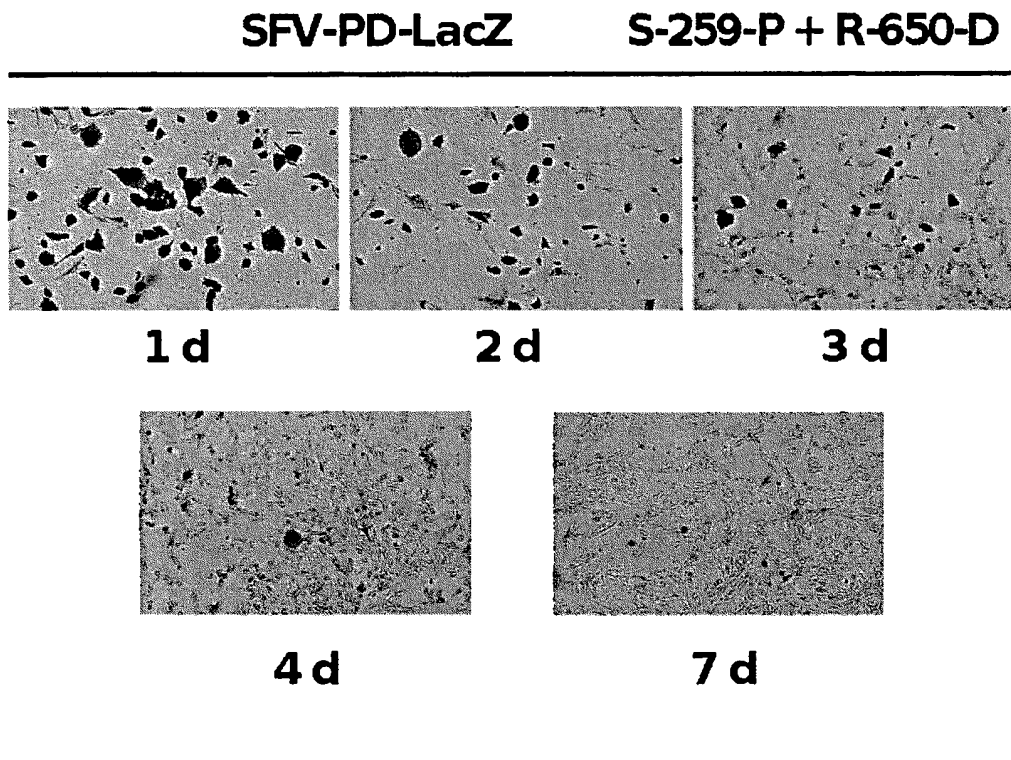
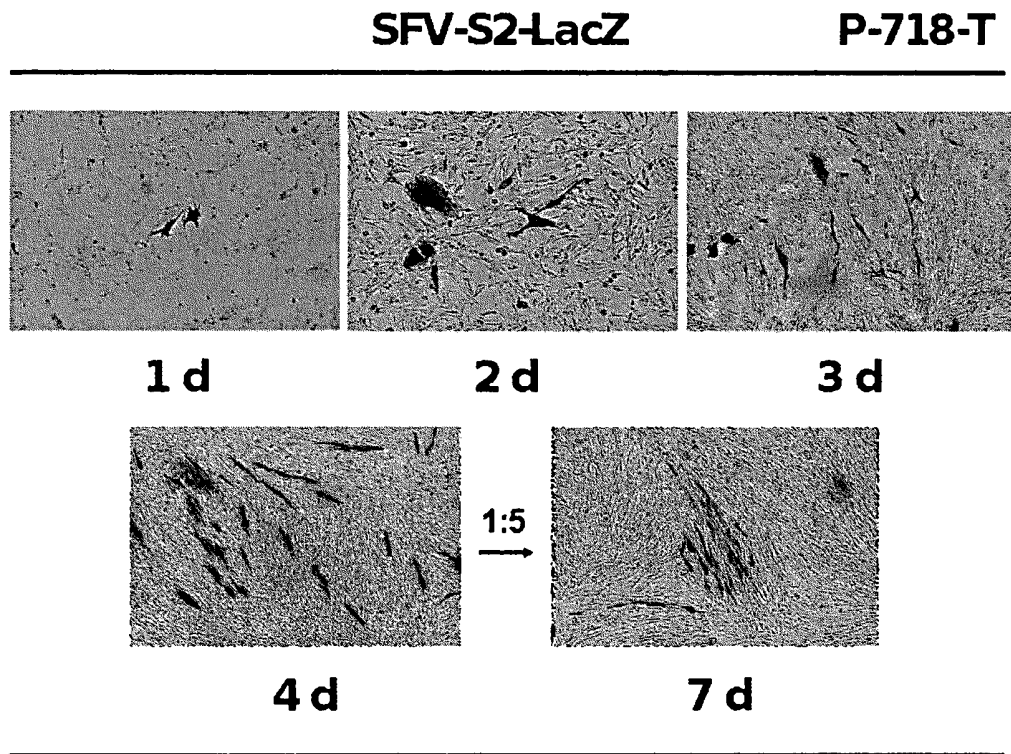


FIG. 12



SFV-S2-LAC-Z.(1:5)

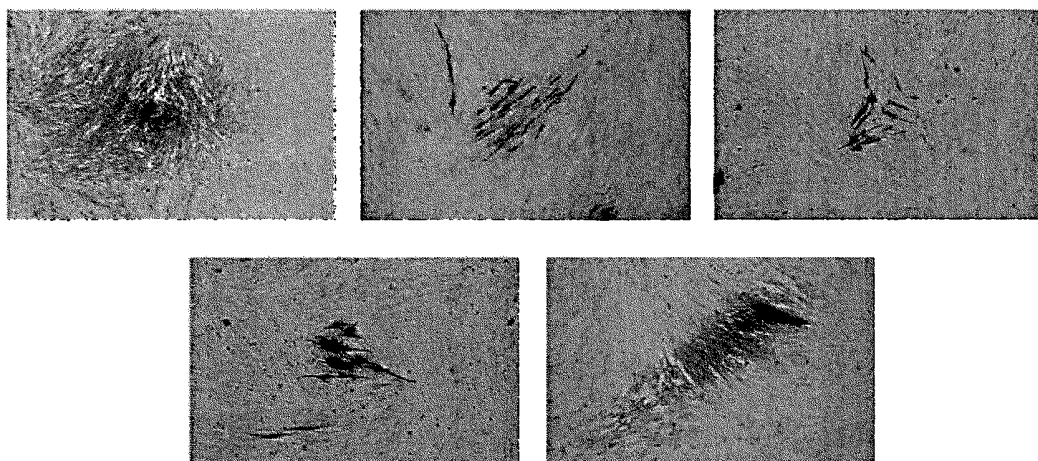


FIG. 13

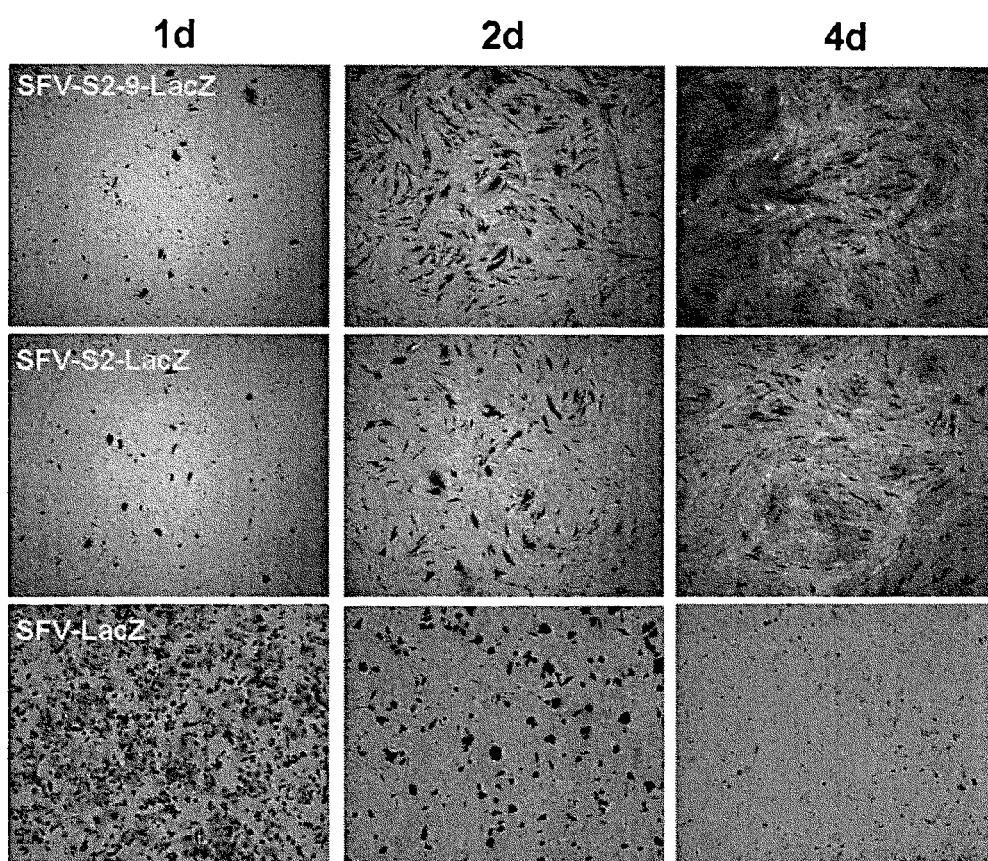
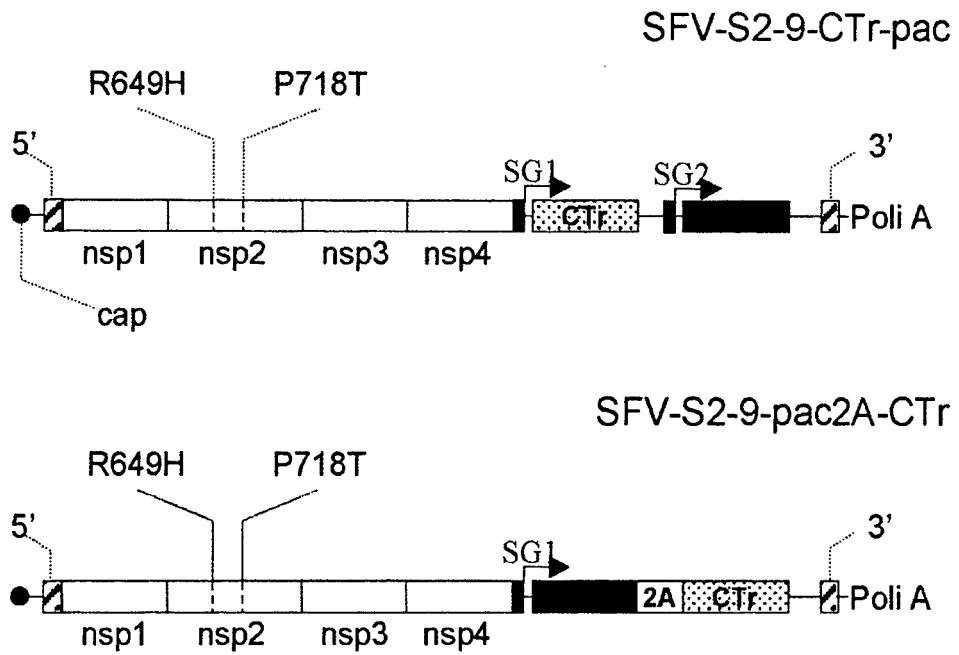


FIG. 14

A



B

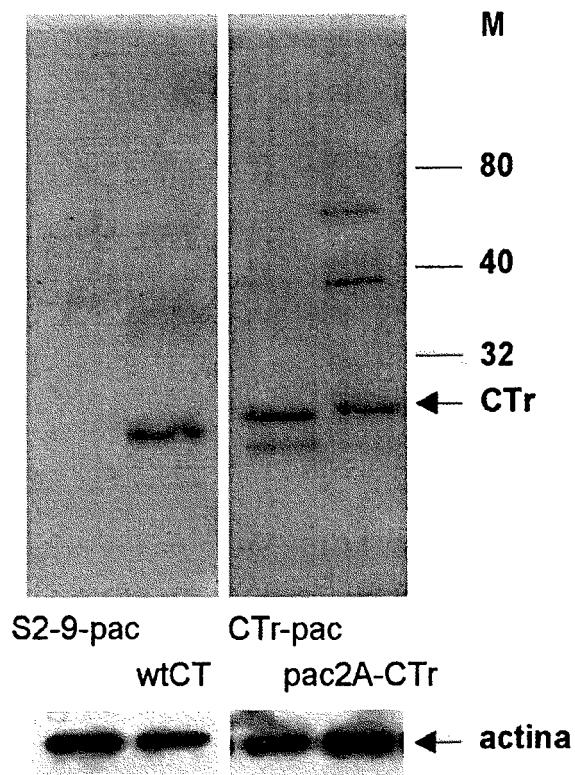


FIG 15

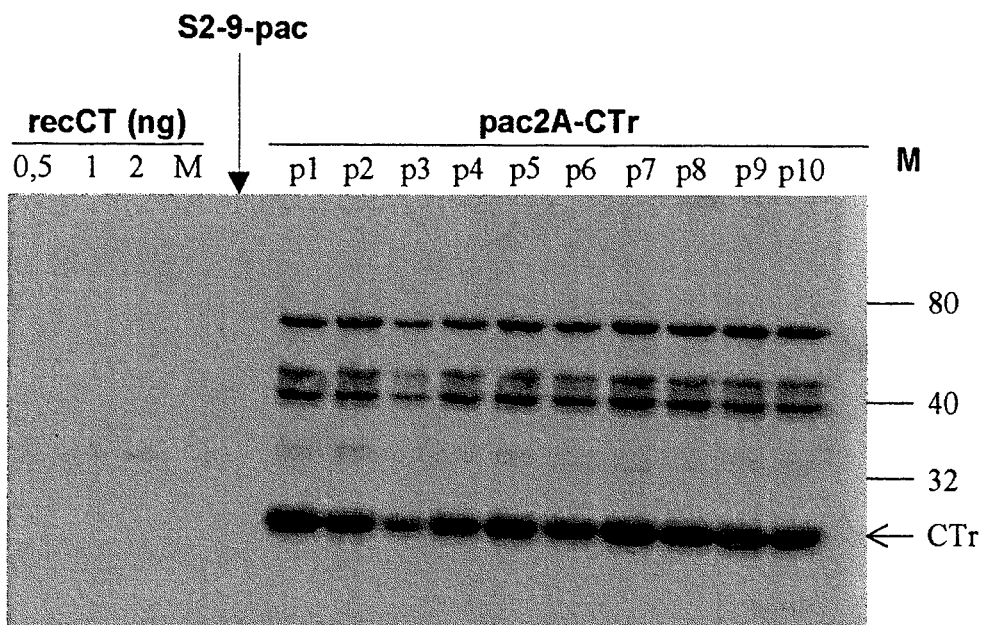


FIG. 16

ES 2 304 880 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

- 5 <120> USO DE UN VECTOR VIRAL MUTADO PARA LA GENERACIÓN *IN VITRO* DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES
- 10 <130> FIMA06022
- <160> 24
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 7382
- <212> DNA
- 20 <213> Semliki Forest virus
- <220>
- 25 <221> 5'UTR
- <222> (1)..(86)
- <223> Extremo 5' UTR no traducido que incluye las secuencias necesarias para la replicación
- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (87)-(89)
- <223> Triplete de inicio de la traducción de la replicasa
- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3642)..(3644)
- 40 <223> Triplete correspondiente a la mutación R649H
- <220>
- <221> misc_feature
- 45 <222> (3849)..(3851)
- <223> Triplete correspondiente a la mutación P718T
- <220>
- 50 <221> misc_feature
- <222> (7351)..(7374)
- <223> Promotor subgenómico viral solapado
- 55 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (7380)..(7382)
- 60 <223> Triplete de terminación de la traducción de la replicasa

65

ES 2 304 880 B1

<400> 1

	gatggcggat	gtgtgacata	cacgacgcca	aaagatthttg	tccagctcc	tgccacctcc	60
5	gctacgcgag	agattaacca	cccacgatgg	cgcgcaaagt	gcatggtgat	attgaggctg	120
	acagcccatt	catcaagtct	ttgcagaagg	catttccgtc	gttcgagggtg	gagtcattgc	180
	aggtcacacc	aaatgaccat	gcaaatgcca	gagcattttc	gcacctggct	accaaattga	240
10	tcgagcagga	gactgacaaa	gacacactca	tottggatat	cggcagtgcg	ccttccagga	300
	gaatgatgtc	tacgcacaaa	taccactgcy	tatgccctat	gcgcagcgca	gaagaccccg	360
	aaaggctcga	tagctacgca	aagaaactgg	cagcggcctc	cgggaagggtg	ctggatagag	420
15	agatcgcagg	aaaaatcacc	gacctgcaga	ccgtcatggc	tacgccagac	gctgaatctc	480
	ctaccttttg	cctgcataca	gacgtcacgt	gtcgtacggc	agccgaagtg	gccgtatacc	540
	aggacgtgta	tgctgtacat	gcaccaacat	cgctgtacca	tcaggcgatg	aaagggtgca	600
20	gaacggcgta	ttggattggg	tttgacacca	ccccgtttat	gtttgacgcy	ctagcagggc	660
	cgtatccaac	ctacgccaca	aactgggccc	acgagcaggt	gttacaggcc	aggaacatag	720
	gactgtgtgc	agcatccttg	actgagggaa	gactcggcaa	actgtccatt	ctccgcaaga	780
25	agcaattgaa	accttgcgac	acagtcattg	tctcggtagg	atctacattg	tacactgaga	840
	gcagaaagct	actgaggagc	tggcacttac	cctccgtatt	ccacctgaaa	ggtaaacaa	900
	cctttacctg	taggtgcat	accatcgtat	catgtgaagg	gtacgtagtt	aagaaaatca	960
30	ctatgtgccc	cggcctgtac	ggtaaaacgg	tagggtagc	cgtgacgtat	cacgcggagg	1020
	gattcctagt	gtgcaagacc	acagacactg	tcaaaggaga	aagagtctca	ttccctgtat	1080
35	gcacctacgt	cccctcaacc	atctgtgatc	aatgactgg	catactagcg	accgacgtca	1140
	caccggagga	cgacacagaag	ttgttagtgg	gattgaatca	gaggatagtt	gtgaacggaa	1200
	gaacacagcg	aaacactaac	acgatgaaga	actatctgct	tccgattgtg	gccgtcgcat	1260
40	ttagcaagtg	ggcaggggaa	tacaaggcag	accttgatga	tgaaaaacct	ctgggtgtcc	1320
	gagagaggtc	acttacttgc	tgctgcttgt	gggcatttaa	aacgaggaag	atgcacacca	1380
	tgtacaagaa	accagacacc	cagacaatag	tgaagggtgc	ttcagagttt	aactcgttcg	1440
45	tcatcccgag	cctatggctc	acaggcctcg	caatcccagt	cagatcacgc	attaagatgc	1500
	ttttggccaa	gaagaccaag	cgagagttaa	tacctgttct	cgacgcgtcg	tcagccaggg	1560
50	atgctgaaca	agaggagaag	gagaggttgg	aggccgagct	gactagagaa	gccttaccac	1620
	ccctcgtccc	catcgcgccg	gcggagacgg	gagtcgtcga	cgtcgacgtt	gaagaactag	1680
	agtatcacgc	agggtcaggg	gtcgtggaaa	cacctcgcag	cgcgttgaaa	gtcaccgcac	1740
55	agccgaacga	cgtactacta	ggaaattacg	tagttctgtc	cccgcagacc	gtgctcaaga	1800
	gctccaagtt	ggccccctg	caccctctag	cagagcaggt	gaaaataata	acacataacg	1860
60	ggagggccgg	cggttaccag	gtcgcaggat	atgacggcag	ggtcctacta	ccatgtggat	1920
	cggccattcc	ggtccctgag	tttcaagctt	tgagcgagag	cgccactatg	gtgtacaacg	1980
	aaagggagtt	cgtcaacag	aaactatacc	atattgccgt	tcacggaccg	tcgctgaaca	2040
65	ccgacgagga	gaactacgag	aaagtcagag	ctgaaagaac	tgacgccgag	tacgtgttcg	2100
	acgtagataa	aaaatgctgc	gtcaagagag	aggaagcgtc	gggtttggtg	ttggtgggag	2160

ES 2 304 880 B1

	agctaaccaa	ccccccggtc	catgaattcg	cctacgaagg	gctgaagatc	aggccgctcg	2220
	cacatataa	gactacagta	gtaggagtct	ttggggttcc	gggatcaggc	aagtctgcta	2280
5	ttattaagag	cctcgtgacc	aaacacgatc	tggtcaccag	cggcaagaag	gagaactgcc	2340
	aggaaatagt	taacgacgtg	aagaagcacc	gcgggaaggg	gacaagtagg	gaaaacagtg	2400
10	actccatcct	gctaaacggg	tgctcgtcgtg	ccgtggacat	cctatatgtg	gacgaggctt	2460
	tcgcttgcca	ttccggtact	ctgctggccc	taattgctct	tgtaaacct	cggagcaaag	2520
15	tggtgttatg	cggagacccc	aagcaatgcg	gattcttcaa	tatgatgcag	cttaaggtga	2580
	acttcaacca	caacatctgc	actgaagtat	gtcataaaag	tatatccaga	cgttgcacgc	2640
20	gtccagtcac	ggccatcgtg	tctacgttgc	actacggagg	caagatgcgc	acgaccaacc	2700
	cgtgcaacaa	accataatc	atagacacca	caggacagac	caagcccaag	ccaggagaca	2760
25	tcgtgttaac	atgcttccga	ggctgggcaa	agcagctgca	gttggactac	cgtggacacg	2820
	aagtcatgac	agcagcagca	tctcagggcc	tcaccgcgaa	aggggtatac	gccgtaaggc	2880
30	agaaggtgaa	tgaaaatccc	ttgtatgccc	ctgcgctcga	gcacgtgaat	gtactgctga	2940
	cgcgcactga	ggataggctg	gtgtggaaaa	cgctggccgg	cgatccctgg	attaaggtcc	3000
35	tatcaaacat	tocacagggc	aactttacgg	ccacattgga	agaatggcaa	gaagaacacg	3060
	acaaaataat	gaaggtgatt	gaaggaccgg	ctgcgcctgt	ggacgcggtc	cagaacaaag	3120
40	cgaacgtgtg	ttgggcgaaa	agcctggtgc	ctgtcctgga	cactgccgga	atcagattga	3180
	cagcagagga	gtggagcacc	ataattacag	catttaagga	ggacagagct	tactctccag	3240
45	tggtggcctt	gaatgaaatt	tgcaccaagt	actatggagt	tgacctggac	agtggcctgt	3300
	tttctgcccc	gaaggtgtcc	ctgtattacg	agaacaacca	ctgggataac	agacctggtg	3360
50	gaaggatgta	tggattcaat	gccgcaacag	ctgccaggct	ggaagctaga	cataccttcc	3420
	tgaaggggca	gtggcatacg	ggcaagcagg	cagttatcgc	agaaagaaaa	atccaaccgc	3480
55	tttctgtgct	ggacaatgta	attcctatca	accgcaggct	gccgcacgcc	ctggtggctg	3540
	agtacaagac	ggttaaaggc	agtagggttg	agtggctggt	caataaagta	agaggtacc	3600
60	acgtcctgct	ggtgagtgag	tacaacctgg	ctttgcctcg	acaagagggtc	acttggttgt	3660
	caccgctgaa	tgtcacaggc	gccgataggc	gctacgacct	aagtttagga	ctgccggctg	3720
65	acgccggcag	gttcgacttg	gtctttgtga	acattcacac	ggaattcaga	atccaccact	3780
	accagcagtg	tgtcgaccac	gccatgaagc	tgcagatgct	tgggggagat	gcgctacgac	3840
70	tgctaaaaac	ggggcgcctc	ttgatgagag	cttacggata	cgccgataaa	atcagcgaag	3900
75	ccgttgtttc	ctccttaagc	agaaagttct	cgtctgcaag	agtgttgccg	ccgattgtg	3960

ES 2 304 880 B1

	tcaccagcaa tacagaagtg ttcttgctgt tctccaactt tgacaacgga aagagaccct	4020
5	ctacgctaca ccagatgaat accaagctga gtgccgtgta tgccggagaa gccatgcaca	4080
	cggccgggtg tgcaccatcc tacagagtta agagagcaga catagccacg tgcacagaag	4140
	cggtctgggt taacgcagct aacgcccgtg gaactgtagg ggatggcgta tgcagggccg	4200
10	tggcgaagaa atggccgtca gcctttaagg gagcagcaac accagtgggc acaattaa	4260
	cagtcatgtg cggctcgtac cccgtcatcc acgctgtagc gcctaatttc tctgccacga	4320
15	ctgaagcggga aggggaccgc gaattggccg ctgtctaccg ggcagtggcc gccgaagtaa	4380
	acagactgtc actgagcagc gtagccatcc cgctgctgtc cacaggagtg ttcagcggcg	4440
20	gaagagatag gctgcagcaa tccctcaacc atctattcac agcaatggac gccacggacg	4500
	ctgacgtgac catctactgc agagacaaaa gttgggagaa gaaaatccag gaagccattg	4560
	acatgaggac ggctgtggag ttgctcaatg atgacgtgga gctgaccaca gacttgggtga	4620
25	gagtgcaccc ggacagcagc ctggtgggtc gtaagggcta cagtaccact gacgggtcgc	4680
	tgtactcgtg ctttgaaggt acgaaattca accaggctgc tattgatatg gcagagatac	4740
30	tgacgttggt gcccagactg caagaggcaa acgaacagat atgcctatac gcgctgggcg	4800
	aaacaatgga caacatcaga tccaaatgtc cgggtgaacga ttccgattca tcaacacctc	4860
35	ccaggacagt gccctgcctg tgccgctacg caatgacagc agaacggatc gcccgcccta	4920
	ggtcacacca agttaaagc atggtggttt gctcatcttt tcccctcccg aaataccatg	4980
40	tagatggggt gcagaaggta aagtgcgaga aggttctcct gttcgacccg acggtacctt	5040
	cagtggttag tccgcggaag tatgccgat ctacgacgga ccactcagat cggtcgttac	5100
	gagggtttga cttggactgg accaccgact cgtcttcac tgccagcgat accatgtcgc	5160
45	taccagttt gcagtcgtgt gacatcgact cgatctacga gccaatggct cccatagtag	5220
	tgacggctga cgtacaccct gaaccgcag gcatcgcgga cctggcgga gatgtgcacc	5280
50	ctgaaccgc agaccatgtg gacctcgaga acccgattcc tccaccgcgc ccgaagagag	5340
	ctgcatacct tgctccgc gcggcggagc gaccggtgcc ggcgccgaga aagccgacgc	5400
55	ctgccccaaag gactgcgttt aggaacaagc tgcccttgac gttcgcgac tttgacgagc	5460
	acgaggtcga tgcgttgcc tccgggatta ctttcggaga cttcgacgac gtctgcgac	5520
	taggccgcgc ggggtcatat attttctcct cggacactgg cagcggacat ttacaacaaa	5580
60	aatccgttag gcagcacaat ctccagtgcg cacaactgga tgcggtccag gaggagaaaa	5640
	tgtaccgcgc aaaattggat actgagaggg agaagctggt gctgctgaaa atgcagatgc	5700
65	acccatcgga ggctaataag agtcgatacc agtctcgcaa agtggagaac atgaaagcca	5760
	cgggtgtgga caggctcaca tcgggggcca gattgtacac gggagcggac gtaggccgca	5820

ES 2 304 880 B1

	taccaacata cgcggttcgg tacccccgcc cegtgtactc ccctaccgtg atcgaaagat	5880
5	tctcaagccc cgatgtagca atcgcagcgt gcaacgaata cctatccaga aattacccaa	5940
	cagtggcgtc gtaccagata acagatgaat acgacgcata cttggacatg gttgacgggt	6000
	cggatagttg cttggacaga ggcacattct gcccgcgaa gctccggtgc taccogaaac	6060
10	atcatgogta ccaccagccg actgtacgca gtgccgtccc gtcacccttt cagaacacac	6120
	tacagaacgt gctagcggcc gccaccaaga gaaactgcaa cgtcacgcaa atgcgagaac	6180
15	taccacccat ggactcggca gtgttcaacg tggagtgctt caagcgtat gcctgctccg	6240
	gagaatattg ggaagaatat gctaaacaac ctatccggat aaccactgag aacatcacta	6300
20	cctatgtgac caaattgaaa ggccccgaaag ctgctgcctt gttcgctaag acccacaact	6360
	tggttccgct gcaggaggtt cccatggaca gattcacggt cgacatgaaa cgagatgtca	6420
25	aagtcaactcc agggacgaaa cacacagagg aaagacccaa agtccaggta attcaagcag	6480
	cggagccatt ggcgaccgct tacctgtgcg gcatccacag ggaattagta aggagactaa	6540
	atgctgtggt acgccctaac gtgcacacat tgtttgatat gtcggccgaa gactttgacg	6600
30	cgatcatcgc ctctcacttc caccagagg agccggttct agagacggac attgcatcat	6660
	tcgacaaaag ccaggacgac tccttggctc ttacaggttt aatgatcctc gaagatctag	6720
35	gggtggatca gtacctgctg gacttgatcg aggcagcctt tggggaaata tccagctgtc	6780
	acctaccaac tggcacgcbc ttcaagttcg gagctatgat gaaatcgggc atgtttctga	6840
40	ctttgtttat taacactggt ttgaacatca ccatagcaag cagggtactg gagcagagac	6900
	tcaactgactc cgctgtgcg gccttcatcg gcgacgacaa catcgttcac ggagtgatct	6960
45	ccgacaagct gatggcggag aggtgcbgct cgtgggtcaa catggaggtg aagatcattg	7020
	acgctgtcat gggcgaaaaa ccccatatt tttgtggggg attcatagtt tttgacagcg	7080
	tcacacagac cgctgccgt gtttcagacc cacttaagcg cctgttcaag ttgggtaagc	7140
50	cgctaacagc tgaagacaag caggacgaag acaggcgacg agcactgagt gacgaggtta	7200
	gcaagtgggt cggacaggc ttgggggccc aactggaggt ggcactaaca tctaggtatg	7260
55	aggtagaggg ctgcaaaagt atcctcatag ccatggccac cttggcgagg gacattaagg	7320
	cgtttaagaa attgagagga cctgttatac acctctacgg cggtcctaga ttgggtgcggt	7380
60	aa	7382

<210> 2

<211> 841

<212> DNA

<213> Semliki Forest virus

ES 2 304 880 B1

```

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1)..(841)
5 <223> Extremo 3' no traducido de SFV que incluye las secuencias necesarias para la replicación

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (772)..(841)
<223> Cola de poli-adeninas (Poli A)

<400> 2
15
      attacatccc tacgcaaacg ttttacggcc gccggtggcg cccgcgcccg gcggcccgtc      60
      cttggccggtt gcaggccact ccggtggctc ccgtcgtccc cgacttccag gcccagcaga      120
20      tgcagcaact catcagcgcc gtaaatgogc tgacaatgag acagaacgca attgctcctg      180
      ctaggcctcc caaaccaaag aagaagaaga caaccaaacc aaagccgaaa acgcagccca      240
25      agaagatcaa cggaaaaacg cagcagcaaa agaagaaaga caagcaagcc gacaagaaga      300
      agaagaaacc cggaaaaaga gaaagaatgt gcatgaagat tgaaaatgac tgtatcttcg      360
30      tatgoggcta gccacagtaa cgtagtgttt ccagacatgt cgggcaccgc actatcatgg      420
      gtgcagaaaa tctcgggtgg tctggggggc ttcgcaatcg gcgctatcct ggtgctggtt      480
35      gtggtcactt gcattgggct ccgcagataa gttagggtag gcaatggcat tgatatagca      540
      agaaaattga aaacagaaaa agttagggtg agcaatggca tataaccata actgtataac      600
40      ttgtaacaaa gcgcaacaag acctgcgcaa ttggccccgt ggtccgcctc acggaaactc      660
      ggggcaactc atattgacac attaattggc aataattgga agcttacata agcttaattc      720
      gacgaataat tggatTTTTA ttttattttg caattggttt ttaatatTTC caaaaaaaaa      780
45      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      840
      a                                                                                   841

50
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
55 <213> Artificial

<220>
60 <223> Cebador SF3669-VS

<400> 3
65      aatgtcacag gcgccgatag g                                                                                   21

```

ES 2 304 880 B1

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador SF4096-RS
10
<400> 4

15 ggtgcacacc cggccgtgtg c 21

<210> 5
<211> 37
20 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
25 <223> Cebador mutS2-VS

<400> 5

30 gactgctaaa aacgggcggc agcctcttga tgagagc 37

<210> 6
35 <211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador mutS2-RS

<400> 6
45

aagaggctgc cgcccgtttt tagcagtcgt agcgcac 38

50 <210> 7
<211> 37
<212> DNA
55 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador mutS3-VS
60
<400> 7

65 gactgctaaa atttggcggc agcctcttga tgagagc 37

ES 2 304 880 B1

<210> 8
<211> 38
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador mutS3-RS
10
<400> 8

15 aagaggctgc cgccaaattt tagcagtcgt agcgcatac 38

<210> 9
20 <211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador SF1947-VS

<400> 9
30 cgtccctga gtttcaag 18

<210> 10
35 <211> 71
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador SF3623-S29-RS

<400> 10
45 agcacctatc ggcgcctgtg acattcagcg gtgacaacca agtgaccctg tgtcgaggca 60
aagccaggtt g 71
50

<210> 11
55 <211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
60 <223> Cebador

<400> 11
65 tctcgactt taccttctgc accccatcta catg 34

ES 2 304 880 B1

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 10
 <400> 12

 cacagacact gtcaaaggag aaagagtctc attcc 35
 15
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 13

 gaattctgtg tattaacgca c 21
 30
 <210> 14
 <211> 51
 <212> DNA
 35 <213> Aphthovirus

 <400> 14
 40
 aattttgacc ttcttaagct tgcgggagac gtcgagtcca acctgggcc c 51

 <210> 15
 45 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 55
 gatcctaggg ccctcgcgat tcgaataatt gattaattat acacctctac ggcggtccta 60

 gattggtgcg ttaatacaca gaattctgat tc 92
 60
 <210> 16
 <211> 92
 <212> DNA
 65 <213> Artificial

ES 2 304 880 B1

	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 16	
	gatcgaatca gaattctgtg tattaacgca ccaatctagg accgccgtag aggtgtataa	60
10	ttaatcaatt attcgaatcg cgagggccct ag	92
	<210> 17	
	<211> 36	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador	
	<400> 17	
25	gggggatcct agcaccatga gccagaggga gggaag	36
	<210> 18	
30	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
40	gggggatcca catatgtcag gcaacgcccc ctgg	34
45	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
55	<400> 19	
	ttggcgaggg acattaaggc	20
60	<210> 20	
	<211> 91	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial	

ES 2 304 880 B1

<220>

<223> Cebador

5 <400> 20

cactggatat ctcacccggg cccagggttg gactcgcgct ctcccgcaag ctaagaagg 60

10 tcaaaattgg caccgggctt gcgggtcatg c 91

<210> 21

<211> 41

15 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 21

25 ggcgaggggtg cgtacggccc gcgggacgtc gtcgcgggtg g 41

<210> 22

30 <211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador

<400> 22

40 gccacccgcg acgacgtccc gcgggccgta cgcaccctcg 40

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

50

<220>

<223> Cebador

55 <400> 23

cgtatacgtg cccgggatga gccagaggga gggaag 36

60

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

65 <213> Artificial

ES 2 304 880 B1

<220>

<223> Cebador

5 <400> 24

cgtatacgta cccgggtcag gcaacgeccc ctgg

34

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 880

② Nº de solicitud: 200700882

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.04.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** **C07K 14/18** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	PERRI, S et al.: "Replicon Vectors Derived from Sindbis Virus and Semliki Forest Virus that Establish Persistent Replication in Host Cells". JOURNAL OF VIROLOGY. Vol 74. Nº 20. Octubre 2000. Páginas 9802-9807.	1-18
Y	CASALES, E. et al.: "Development and Characterization of a New Noncytopathic Vector Derived from Semliki Forest Virus". MOLECULAR THERAPY. Vol.13. S1. Mayo 2006. Resumen Nº 479.	1,3,5,7,9, 11,13,15, 17
Y	WO 03083065 A2 (UNIV. OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 09.10.2003, página 44, líneas 8 en adelante.	2,4,6,8, 10,12,14, 16,18
A	LUNDSTROM, K. et al.: "Improved Semliki Forest Virus Vectors for Receptor Research and Gene Therapy". JOURNAL OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH. Vol. 21. Nº 1. 2001. Páginas 55-70.	1-18
A	LILJESTRÖM, P. et al.: "Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors". En CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Ausubel, et al. (eds.). Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York. Supl. 29. 1994. Páginas 16.20.01-16.20.16.	1-18
A	FROLOV, I. et al.: " Selection of RNA Replicons Capable of Persistent Noncytopathic Replication in Mammalian Cells". JOURNAL OF VIROLOGY. Mayo 1999. Vol. 73. Nº 5. Páginas 3854-3865.	1-18
A	WO 0181553 A1 (CHIRON CORP.) 01.11.2001, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.04.2008

Examinador
A. Martín-Falquina Garre

Página
1/1