

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.11.08	(73) Titular(es): PROBIOGEN AG GOETHESTRASSE 54 13086 BERLIN DE
(30) Prioridade(s): 2005.11.08 EP 05110453 2005.12.14 US 750156 P	(72) Inventor(es): VOLKER SANDIG DE INGO JORDAN DE ELISABETH BRUNDKE DE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.07.23	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, N° 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.01.25 062/2012	

(54) Epígrafe: **FACTOR DE PROTEÍNA AUMENTADOR DE PRODUTIVIDADE, NOVAS LINHAS CELULARES E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA UM MÉTODO PARA PREPARAR VÍRUS ALVO NÃO ADENOVÍRUS OU PROTEÍNAS ALVO UTILIZANDO UMA LINHA CELULAR DE EXPRESSÃO POTENTE COM INTEGRAÇÃO ESTÁVEL NO SEU GENOMA DE UM GENE QUE CODIFICA UMA PROTEÍNA REGULADORA HETERÓLOGA ESPECÍFICA.

RESUMO

"Factor de proteína aumentador de produtividade, novas linhas celulares e suas utilizações"

O presente invento proporciona um método para preparar vírus alvo não adenovírus ou proteínas alvo utilizando uma linha celular de expressão potente com integração estável no seu genoma de um gene que codifica uma proteína reguladora heteróloga específica.

DESCRIÇÃO

“Factor de proteína aumentador de produtividade, novas linhas celulares e suas utilizações”

O presente invento proporciona um método para preparar um vírus alvo não adenovírus ou proteínas alvo utilizando uma linha celular de expressão potente com integração estável no seu genoma de um gene que codifica uma proteína PIX.

Antecedentes do invento

Os produtos biofarmacêuticos de células eucarióticas são uma parte integrante da medicina moderna. Contudo, a produtividade aumentada e a segurança aumentada são parâmetros importantes que ainda necessitam de otimização substancial. O constrangimento mais crítico aos esforços de otimização é o próprio substrato celular. É extremamente útil um transgene seguro que possa ser introduzido em linhas celulares já disponibilizadas para utilização em processos biofarmacêuticos para aumentar os rendimentos de produto obtido de tais células manipuladas.

Os adenovírus são vírus de ADN em cadeia dupla, sem invólucro (nus) e que infectam uma vasta gama de animais. De entre os membros mais bem caracterizados encontra-se o adenovírus humano serotipo 5 (Ad5). Este vírus é uma causa frequente dos sintomas da gripe comum e a infecção ocorre muitas vezes na infância.

Os adenovírus podem ser submetidos a manipulação genética e utilizam-se adenovírus com replicação incompetente, incluindo Ad5 (número de acesso GenBank para a sequência: AC_000008) como vectores em terapia génica e para vacinação terapêutica. Para obter vírus com replicação incompetente substituem-se regiões grandes do ADN genómico com sequências não víricas. As funções víricas em falta são proporcionadas in trans por linhas celulares hospedeiras que foram transfectadas de forma estável com genes que estão deletados no vector. Um

dos primeiros sistemas que foi desenvolvido consistiu de vectores adenovíricos deletados na região reguladora E1, produzidos em linhas celulares que proporcionam as proteínas E1 correspondentes.

A linha celular mais comum para este objectivo é a linha celular 293. Esta linha foi gerada em 1977 por transfecção de ADN genómico adenovírico fragmentado em células humanas primárias (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36, 59-74 (1977)), muito antes de se reconhecer que os adenovírus podem servir como vectores de terapia génica. Provou-se subsequentemente que a linha celular resultante continha os nucleótidos 1 a 4344 do ADN genómico (Louis et al., *Virology* 233, 423-429 (1997)) que inclui a região E1; esta caracterização demonstrou que a região E1 pode ser utilizada para imortalizar e transformar células primárias.

Em posição adjacente à região E1 segue-se o gene para pIX ("proteína 9"; nucleótidos 3609 a 4031 no ADN genómico). O promotor para pIX está embebido no interior da componente E1B da região E1. Um mecanismo denominado oclusão do promotor permite expressão de pIX a um ponto temporal precoce mais tarde no ciclo de infecção vírico no arranque da replicação do ADN vírico com aumento do número de cópias do ADN vírico (Fessler e Young, *J. Virol.* 72, 4049-4056 (1998)). Apesar do gene estar presente no interior dos 4344 nucleótidos integrados em células 293, a expressão de pIX não pode ser detectada mesmo com métodos sensíveis de marcação radioactiva (Spector et al., *J. Virol.* 36, 860-871 (1980)).

Tal como anteriormente descrito, gerou-se a replicação de vectores adenovíricos deficientes por deleção da região E1 do genoma vírico. Os produtos E1 são essenciais para replicação vírica e a função da região E1 teve então que ser proporcionada em trans através de transgenes E1 estáveis na célula de empacotamento do adenovírus (tal como a linha celular 293). Devido à proximidade da região E1 com o gene pIX, ocorre recombinação frequente entre vectores adenovíricos deletados e E1 no genoma hospedeiro. Este evento de

recombinação gerou adenovírus com replicação competente (RCA), uma contaminação importante em preparações de vector. Para suprimir este evento de recombinação deletou-se pIX do genoma do adenovírus. No decurso destas experiências reconheceu-se que pIX estabiliza a cápside adenovírica contra stress térmico e estérico por aumento da interacção dos principais blocos de construção, os exões (Colby e Shenk, *J. Virol.* 39, 977-980 (1981); Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.* 6, 1733-1739 (1987)). A morfogénese na ausência de pIX dá origem a vírus sensíveis à temperatura que não podem entregar moléculas de ADN genómico maiores do que 105% dos 35938 pares de bases do tipo selvagem. Para mesmo assim permitir uma capacidade de empacotamento normal e estabilidade térmica, introduziu-se de forma estável ou epissómica a proteína pIX em linhas celulares que se pretende sejam células de empacotamento de vectores adenovíricos (Krougllak e Graham, *Hum. Gene Ther.* 6, 1575-1586 (1995); Carovokryri, C. e Leppard, K.N., *J. Virol.* 69, 6627-6633 (1995) WO 99/57296 e Imler et al., *Gene Therapy* 3, 75-84 (1996)).

Reconhecendo igualmente que pIX decora a superfície dos viriões, geraram-se proteínas de fusão pIX com o objectivo de expandir a gama de hospedeiros dos vectores adenovíricos ou para monitorizar a morfogénese e a migração intracelular de partículas víricas (revisto por Parks, *Mol. Ther.* 11, 19-25 (2005)).

Apesar de ser claramente uma proteína estrutural, pIX também está implicada como proteína reguladora para replicação de adenovírus. Assume-se que PIX funciona como transactivadora de transcrição para aumentar expressão de E1A, uma função que é possivelmente exercida como uma viroquina por proteína PIX proveniente da cápside na etapa de infecção (revisto por Parks, *Mol. Ther.* 11, 19-25 (2005)). Descreveu-se que PIX, conjuntamente com a proteína precoce E4 Orf3, também interage com inclusões sub-nucleares denominadas corpos PML (Puvion-Dutilleul et al., *Exp. Cell. Res.* 218, 9-16 (1995); Leppard e Everett, *J. Gen. Virol.* 80, 997-1008 (1999)). Estes são agregados dinâmicos de 250 nm a 500 nm de tamanho e propõe-se

que estejam envolvidos na regulação de diferenciação celular (Wang et al., Science 279, 1547-1551 (1998)), controlo de apoptose (Quignon et al., Nature Gen. 20, 259-265 (1998)) e resposta a infecção vírica (Möller e Schmitz, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 51, 295-300 (2003)).

Devido aos seus efeitos pleotrópicos, introduzimos a proteína PIX em linhas celulares para analisar se PIX aumenta a proliferação celular ou as propriedades de produção de produtos biofarmacêuticos que não estão relacionados com adenovírus ou vectores adenovíricos. Há uma necessidade genérica de factores que modulem estas propriedades em linhas celulares estabelecidas.

Por exemplo, os vírus atenuados (enfraquecidos) são candidatos de vacina promissores: por inoculação mimetizam uma infecção natural mas permitem mais tempo para o estabelecimento da resposta imunitária protectora pretendida pelo vacinado. Devido aos números crescentes de doentes imunocomprometidos (por exemplo, devido a infecção com VIH) pretendem-se estirpes altamente atenuadas. Enquanto as estirpes atenuadas ainda evoluem no sentido (habitualmente benigno) da infecção, as estirpes altamente atenuadas são bloqueadas ao nível celular mesmo na ausência de um sistema imunitário funcional. Um método frequentemente utilizado para estabelecer e manter atenuação é a passagem do vírus para um tecido hospedeiro diferente. Por exemplo, os vírus do sarampo e da papeira com objectivos de vacinação humana são passados em células primárias em ovos de galinha embrionários ou em culturas destes derivados. Uma nova geração de vacinas baseia-se no vírus pox altamente atenuado que também depende das células primárias de galinha para produção. As células primárias de galinha que podem substituir uma linha celular e que ao mesmo tempo se protegem a si próprias contra infecção vírica, embora de forma menos eficaz, devido a manipulações secundárias tal como introdução do transgene PIX, proporcionam assim um substrato altamente desejável.

Para outros objectivos pode preferir-se uma linha celular mamífera (em vez de aviária). Tais linhas celulares preferidas já existem e passaram o exame por autoridades de saúde relativamente a segurança e riscos apresentados por produtos biofarmacêuticos derivados. Também aqui, é altamente desejável uma manipulação secundária (tal como introdução do transgene PIX) para aumentar o espectro de aplicações disponíveis ou de eficácias de produção sem comprometer as características de segurança.

Resumo do invento

Quando se preparam linhas celulares que foram transfectadas de forma estável com gene PIX adenovírico (ou um seu análogo de fusão quimérica), observámos inesperadamente que PIX exerce um efeito fenotípico em células aviárias e humanas. Para células aviárias isto é especialmente surpreendente porque as células aviárias não podem ser infectadas por adenovírus humanos e os adenovírus aviários (tais como CELO ou adenovírus aviário do tipo 8) não codificam um homólogo de PIX (Ojkic e Nagy, J. Gen. Virol. 81, 1833-1837 (2000)). Além disso, observámos que a presença estável de PIX aumenta a susceptibilidade da célula a indução por um análogo de ARN em cadeia dupla, provavelmente a partir de um receptor do tipo toll 3. Provavelmente neste contexto, também observámos inesperadamente que a presença de proteína PIX aumenta os rendimentos de vírus pox altamente atenuado em células hospedeiras aviárias. Dado que as células infectadas com vírus pox sofreram menor indução pelo análogo de ARN em cadeia dupla, podemos ter encontrado uma interacção entre proteína PIX e genes anti-interferão do vírus pox que não foi anteriormente descrita. Também observámos um aumento surpreendente do rendimento de produto proteáceo (não apenas vírico) libertado por uma linha celular transfectada de forma estável.

Assim, o presente invento proporciona

(1) um método para preparar um vírus alvo não adenovírus ou uma ou mais proteínas alvo, em que o método compreende

(a) cultivar uma célula de expressão obtível por infecção ou transfecção de uma célula hospedeira, apresentando integrada de forma estável no seu genoma, um gene que codifica para um PIX de adenovírus e expressa de forma estável a referida proteína PIX com o referido vírus alvo ou com um vector que contém sequências de ácido nucleico que codificam o referido vírus alvo ou com o vector que contém sequências de ácido nucleico que codificam as referidas uma ou mais proteínas alvo (em que o vírus alvo não adenovírus não contém a referida proteína PIX e a(s) proteína(s) alvo diferem da referida proteína PIX) e

(b) isolar o vírus alvo ou a(s) proteína(s) alvo;

(2) uma concretização preferida de (1) anteriormente, em que a referida proteína PIX aumenta a produtividade da célula na produção de um vírus que não contém a referida proteína PIX e na produção de uma proteína diferente da referida proteína reguladora;

(3) uma concretização preferida de (1) e (2) anteriormente, em que a PIX de adenovírus se proporciona como uma proteína de fusão com receptor de ácido retinóico alfa, é de preferência uma proteína de fusão com a sequência apresentada em SEQ ID NO:4 ou está fundida a uma GFP e contém uma NLS, preferentemente é uma proteína de fusão com a sequência apresentada em SEQ ID NO:23;

(4) uma concretização preferida de (1) a (3) anteriormente, em que a célula hospedeira e de expressão é uma célula de vertebrado incluindo células mamíferas e células aviárias, preferentemente a célula mamífera é uma célula derivada de cérebro humano e a célula aviária é uma célula derivada de retina de pato ou uma célula derivada de somitos de pato;

(5) uma concretização preferida de (1) a (4) anteriormente, em que a célula hospedeira e de expressão é uma célula derivada de cérebro humano, preferentemente de cérebro fetal humano e com a maior preferência é uma célula NC5T11 e a referida célula contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica PIX de adenovírus, preferentemente a referida proteína PIX é codificada por um ácido nucleico apresentado em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO: 22;

(6) uma concretização preferida de (5) anteriormente, em que a célula hospedeira é uma célula NC5T11#34 e a célula de expressão é derivada da célula NC5T11#34, tendo sido a respectiva célula NC5T11#34 depositada em DSMZ com o número de acesso DSM ACC2744;

(7) uma concretização preferida de (1) a (4) anteriormente em que a célula hospedeira e de expressão é uma célula aviária, preferentemente derivada de retina de pato ou de somitos de pato e a referida célula contém a sequência de ácidos nucleicos que codifica PIX de adenovírus, preferentemente a referida proteína PIX é codificada por um ácido nucleico apresentado em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO: 22;

(8) uma concretização preferida de (7) anteriormente, em que a célula hospedeira é uma célula CR.PIX (17a11b) e a célula de expressão é derivada da célula CR.PIX (17a11b), tendo sido a referida célula CR.PIX (17a11b) depositada em DSMZ com o número de acesso DSM ACC2749;

(9) uma célula de expressão de vertebrado imortalizada para produzir um vírus alvo tal como definido em (1) a (8) anteriormente, sendo preferentemente a expressão tal como definida em (5) a (8) anteriormente; em que a célula de expressão tem estavelmente integrado no seu genoma um gene que codifica PIX de adenovírus e que expressa o referido PIX de forma estável e está infectada ou transfectada com um vírus alvo não adenovírus ou com um vector contendo sequências de ácidos nucleicos que codificam o referido vírus;

(10) a utilização da célula de expressão tal como definida em (7) anteriormente para preparar um vírus alvo.

Descrição sucinta das figuras

Figura 1: História da linha celular NC5T11. A neuro-esferas de células primárias cultivadas em condições isentas de soro. B monocamada de células primárias cultivadas em DMEM/F12 com FCS a 5%. C foco primário duas semanas após transfecção com p79. As setas indicam a fronteira entre células primárias e células imortais. D cultura homogénea aderente de células imortalizadas em DMEM/F12 com FCS a 5%. E cultura em suspensão de NC5T11 em tubos de agitação em EXcell VPRO.

Figura 2: Detecção por imunofluorescência de E1A e E1B em NC5T11. Após fixação com metanol, trataram-se células com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k respectivamente, seguido por anticorpos anti-rato conjugados com vermelho do texas. Tal como apresentado na figura 2 todas as células da amostra apresentam coloração nuclear típica de E1A e coloração citoplasmática para E1B. Após fixação com metanol, trataram-se as células com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k respectivamente, seguido por anticorpos anti-rato conjugados com vermelho do texas. Tal como aqui apresentado, todas as células da amostra apresentam coloração nuclear típica de E1A e coloração citoplasmática para E1B.

Figura 3: Produtividade específica de clones aat seleccionados. Inocularam-se clones celulares de NC5T11 transfectados com C55 e seleccionados com puromicina a 7×10^4 células em placas de 12 poços, determinando-se o número de células e o título aat aos dias 1, 2 e 3 após inoculação e calculou-se a produtividade específica da célula máxima diária.

Figura 4: Análise de expressão de NC5T11puro#8 em cultura descontínua em agitador. Inocularam-se as células em 12 ml de EXCELL VPRO a 6×10^4 células/ml em tubos de agitação de polipropileno de 50 ml (TPP, Suíça) e submeteu-se a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Retiraram-se amostras de 200 μ l aos dias 4, 7, 9, 11, 15, 18 e 21. Determinou-se densidade e viabilidade celular após coloração com azul de tripano utilizando um hemacitómetro.

Figura 5: Detecção do ADNc de pIX-RARA por PCR num conjunto de clones. Gerou-se um conjunto de clones apresentando o gene pIXRARA a partir de NC5T11puro#8 por transfecção com F67 e selecção com higromicina. Extraiu-se ARN utilizando um kit de extracção de ARN (Machery Nagel, Alemanha) e sintetizou-se ADNc utilizando transcriptase reversa AMV (Invitrogen). Amplificaram-se ADNc do fragmento pIX sozinho ou do gene pIXRARA completo com o iniciador 1 e 1 e 164, respectivamente.

Figura 6: Detecção das sequências pIX como parte da proteína de fusão em subclones de NC5T11puro#8 e NC5T11(#34, 35, 36, 37, 38) resistentes a higromicina por PCR. Isolou-se ADN de clones de células cultivados em 6 poços por lise em SDS seguida de extracção fenólica e precipitação. Amplificou-se ADN com os iniciadores 1 e 2 durante 28 ciclos.

Figura 7: Determinou-se a estabilidade dos genes pIXRARA e pIX em NC5T11 com transfecção estável relativamente a E1B: introduziram-se E1A+E1B e pIXRARA em transfecções independentes e os genes E1 e têm sido mantidos na ausência de selecção durante mais de 2 anos e consideram-se portanto estavelmente integrados. Isolou-se ADN genómico de clones celulares seleccionados a 2 pontos temporais: imediatamente após paragem de selecção com hyg (precoce); após 2 meses na ausência de pressão selectiva (tardio). Determinaram-se os níveis de ADN PIX e E1B por PCR em tempo real.

Figura 8: Atraso de crescimento induzido por tratamento com RA em clones recombinantes pIXRARA de NC5T11 e

NC5T11puro#8. Inocularam-se as células a 2×10^5 em placas de 6 poços na presença ou ausência de ácido retinóico a 6 $\mu\text{g/ml}$. Tiraram-se fotografias apresentando atraso de crescimento aos clones tratados com RA #12 e #34 mas não NC5T11 4 dias após inoculação utilizando imagem de contraste de fase a uma ampliação de 4x.

Figura 9: PIXRARA evita inibição de replicação de vírus por interferão. Infectaram-se células NC5T11 e NC5T11#34 com EMCV um vírus sensível a interferão a uma MOI de 0,004 em células tratadas com interferão beta. Submeteram-se lisados celulares a titulação por formação de placas em células A549.

Figura 10: Análise de expressão da linha celular NC5T11puro#8 que expressa alfa-1-antitripsina a partir do vector C55 e dos seus subclones #10, #12, #14, apresentando o vector F67 (pEFpIX-RARA) além de C55. Inocularam-se as células em EXCELL VPRO (JRH Biosciences) a 6×10^4 células/ml em tubos de agitação de polipropileno de 50 ml (TPP, Suíça) com um volume total de 12 ml e submeteu-se a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm.

Figura 11: Expressão de PIX em células CR de retina de pato. Painel da esquerda: reacção de PCR contra gene PIX em ADN genómico de células pIX. Carga do gel da esquerda para a direita: marcador de 1 kb (Invitrogen); PCR em ADN genómico de CRpIX; controlo diferente de molde; controlo positivo com plasmídeo utilizado em transfecção de CRpIX. Painel da direita: transferência "Western" para detecção de proteína pIX em células CRpIX. Pista 1: células 293; pista 2: proteína pIX em células CRpIX.

Figura 12: Manutenção estável do transgene PIX em células de retina de pato. Painel superior esquerdo: MCX e DXS são alíquotas independentes de um clone CRpIX cultivado durante mais de 3 meses em paralelo e sem selecção. Após três meses, utilizou-se PCR TaqMan para contar os números de cópias de transgene E1B e PIX em MCX e DXS. Como o transgene E1B é mantido independentemente de PIX a razão dos dois genes é uma

indicação da manutenção do transgene PIX. A razão não alterou entre MCX e DXS. Além disso, a razão entre ARNm de PIX e ARNm de E1B também não alterou e o ARNm de PIX estava em excesso relativamente a ARNm de E1B indicando expressão de PIX. Painel da direita: cultivaram-se células CR.HS MCX e parentais (negativas para PIX) com ou sem pressão selectiva com higromicina durante 2 semanas (indicado por barras negras no eixo dos XX). Isolou-se ADN genómico a diferentes pontos temporais (indicados por "A", "B" e "C") e sujeitou-se a quantificação com TaqMan (esquerda em baixo). Quando as células parentais foram mortas por higromicina, as células MCX sobreviveram. A razão de transgenes permaneceu constante, indicando mais uma vez a manutenção estável do transgene PIX também na presença de pressão selectiva. O tempo de duplicação para células parentais é de aproximadamente 32 h mas é apenas de 41 horas para células MCX.

Figura 13: Efeito de PIX na replicação de MVA em células CS. Infectaram-se células CS e CSpIX com MVA e ensaiaram-se para replicação de MVA 48 h e 72 h após a infecção. O rendimento de MVA foi significativamente superior em células CS positivas para PIX. Iguamente, tal como evidenciado na microimagem de contraste de fase, o efeito citopático pareceu atrasado para células CSpIX às 48 h. Contudo, ambas as culturas são susceptíveis ao vírus em graus semelhantes dado ser evidente a lise completa às 72 h após infecção.

Figura 14: Efeito de PIX na replicação de MVA em células CR. Infectaram-se células CR e CRpIX em suspensão com diferentes multiplicidades e a várias densidades celulares de inóculo. Ensaiou-se o rendimento de MVA 48 h após a infecção e apresenta-se no eixo dos YY. O tamanho dos círculos representa as densidades celulares de inóculo. Os círculos a cheio apresentam valores para células CRpIX, os círculos a branco representam valores para células parentais. Em todas as configurações PIX confere um aumento nítido das taxas de amplificação de MVA.

Figura 15: Distribuição subcelular de PIX-GFP em células de pato. Aparece PIX marcado com GFP em alguns pontos brilhantes citoplasmáticos e coloração citoplasmática difusa que exclui vastamente o núcleo. Outros clones apresentam coloração mais forte e citoplasmática difusa e acumulação mais intensa mesmo à margem do núcleo.

Figura 16: Distribuição subcelular de variantes de PIX-GFP em células CHO. Para investigar alterações induzidas na distribuição de PIX no interior das células, geraram-se variantes de fusão incluindo a inserção de um local de localização nuclear (NLS) e fusão ao receptor retinóico alfa, uma proteína celular que já contém um NLS. Apresentam-se células CHO com transfecção transitória com plasmídeos de expressão para variantes PIX-GFP.

Figura 17: Efeito da indução de interferão na presença de PIX. Trataram-se células CSpIX e CRpIX com poly I: poly C, um indutor conhecido de resposta de interferão de tipo I e compararam-se com células parentais. Fizeram-se reagir células CSpIX com maior sensibilidade para poly I:poly C relativamente a células CS. As células CRpIX e CR reagiram de forma comparável e em menor extensão do que células CS.

Figura 18: Efeito de infecção por MVA e indução de interferão na presença de PIX-GFP. Trataram-se células CSp9GFP e CRp9GFP com poly I:poly C e infectaram-se com MVA a uma M.O.I. de 0,1 tal como indicado. Mais uma vez, as células derivadas de CS reagiram de forma mais forte a indução por interferão. Surpreendentemente, o número de corpos PIX brilhantes parece diminuir por indução ou infecção em ambas as linhas celulares enquanto a intensidade global do sinal de PIX-GFP aumenta. Além disso, o efeito de indução poly I:poly C melhora por infecção paralela com MVA tal como indicado por um maior número de células CS que ficam aderentes 22 h após o tratamento.

Descrição detalhada do invento

O método da concretização (1) do invento utiliza uma célula de expressão tendo integrado no seu genoma um gene que codifica para pIX, apresentando as seguintes propriedades:

1. Modula a transcrição e especialmente se estiver ligada aos moduladores ou reguladores adequados, também influencia o crescimento celular.

2. Aumenta a produtividade da linha celular relativamente à produção de um vírus não contendo a referida proteína PIX (i.e. a proteína PIX não é um substituto de uma proteína deletada do vírus) e/ou relativamente à produção de uma proteína diferente da referida proteína regulatória.

De acordo com uma concretização do invento a proteína regulatória heteróloga é a proteína pIX do serotipo 5 de adenovírus e noutras concretizações obtém-se a proteína de um adenovírus de um serotipo diferente.

São especialmente preferidas proteínas de fusão, nomeadamente proteínas de fusão compreendendo pelo menos um primeiro domínio compreendendo uma proteína PIX tal como anteriormente aqui definida e pelo menos um segundo domínio compreendendo uma proteína ou péptido que actua como um modulador de transcrição. Numa concretização preferida do invento o referido modulador de transcrição é um factor de transcrição incluindo o receptor alfa de ácido retinóico, que pode estar presente em forma completa ou incompleta (i.e. truncada). O modulador pode também ser um péptido de trânsito que inclui sequências NLF, e.g. as apresentadas em SEQ ID NO:21. De acordo com o invento o primeiro e segundo domínio(s) estão ligados covalentemente entre si directamente ou através de um ligante peptídico. Os ligantes peptídicos adequados incluem estruturas flexíveis e hidrofílicas tal como poli gly-ser.

As expressões "célula" e "linha celular" tal como utilizadas na descrição detalhada seguinte referem-se a

células de expressão/linhas celulares de expressão e células hospedeiras/linhas celulares hospedeiras.

De acordo com o invento prefere-se que a proteína PIX seja expressa na célula numa quantidade de pelo menos 1 pg/ μ g de proteína celular, preferentemente a uma quantidade de pelo menos 10 pg/ μ g de proteína celular de modo que a expressão possa ser determinada por transferência "Western".

Na célula do invento a proteína PIX está preferentemente sob controlo de um promotor estável homólogo ou heterólogo. Os promotores adequados são promotores celulares constitutivos ou suas variantes tais como o promotor de factor 2 de alongamento por translocação humano. Uma variante específica do promotor de factor 2 de alongamento por translocação humano utilizado no invento tem a sequência apresentada em SEQ ID NO:12. A sequência apresentada representa uma versão "curta" do promotor que se localiza no cromossoma humano 19:3,935,325-3,936,638 (conjunto de genoma humano Maio de 2004) e proporciona uma expressão estável de nível médio. Para uma expressão mais forte pode utilizar-se uma versão "mais longa" do promotor localizado no chr19:3,935,349-3,938,957 (conjunto de genoma humano Maio de 2004).

De acordo com o invento, a célula é uma célula de vertebrado incluindo células de mamífero e células aviárias. As células de mamífero adequadas são células humanas e células de roedor incluindo ratinho, rato, *hamster*, etc. As células de mamífero especialmente preferidas de acordo com o invento são células derivadas de cérebro humano, especialmente de cérebro fetal humano, uma célula de ratinho NSO ou Sp2/0, uma célula BHK ou CHO. As células aviárias adequadas são células de pato, galinha, codorniz e ganso. As células aviárias especialmente preferidas de acordo com o invento são células derivadas de uma célula derivada de retina de pato ou derivada de um somito.

Por outro lado, a célula do invento pode ser derivada de uma célula primária ou de uma célula anteriormente

imortalizada. Além disso, a célula pode transportar adicionalmente genes imortalizados (víricos) incluindo uma proteína E1 de um adenovírus, tal como a proteína E1 de mastadenovírus grupo C tipo 5 e semelhantes. É especialmente preferido de acordo com o presente invento que a célula contenha adicionalmente o gene de adenovírus E1A e/ou E1B apresentado na SEQ ID NO:5.

A célula utilizada no método da concretização (1) do invento pode conter adicionalmente sequências funcionais, e.g. sequências necessárias para a sua aplicação como célula de expressão tal como sequências de marcador de selecção, locais de dador/aceitador de *splicing* e/ou sequências de reconhecimento de recombinase permitindo integração de uma sequência de ácido nucleico alvo a ser expressa na célula, etc.

A "infecção", "transfecção" e "transformação" efectuada no contexto do método das concretizações (1), (10) e (12) do invento pode ser efectuada de acordo com procedimentos padrão conhecidos do perito na especialidade. Os referidos métodos podem abranger adicionalmente etapas adequadas de selecção, isolamento e expansão, caso necessário.

No método da concretização (1) o vírus alvo inclui vírus de tipo selvagem, mutado ou deletado, vírus adaptado ao frio ou atenuado, estirpes de vacina, vectores víricos contendo gene(s) heterólogos, vectores víricos tal como lentivírus, vírus pox, vírus adenoassociados (aav), vírus herpes e flavivírus.

Adicionalmente, no método as concretização (1) a(s) proteína(s) alvo incluem anticorpos, proteínas recombinantes tal como eritropoietina, alfa-1-antitripsina, factores de coagulação sanguínea VIII e IX e interferões, antigénios víricos tais como influenza HA e NA e M, HBV-S, proteína G de herpes e proteína G de raiva, hormonas peptídicas e semelhantes. Apesar do método permitir a produção de células capazes de expressão simultânea de mais de uma proteína alvo,

é especialmente preferível que codifique apenas uma proteína alvo.

A cultura e isolamento do método da concretização (1) do invento podem efectuar-se de acordo com procedimentos padrão facilmente disponíveis ao perito na especialidade. O referido método pode incluir adicionalmente etapas de purificação padrão assim como etapas de modificação subsequentes do vírus alvo ou de proteína(s) alvo.

Relativamente às concretizações preferidas das linhas celulares de expressão e hospedeiras da concretização (9) refere-se a discussão detalhada aqui anteriormente proporcionada em relação à concretização (1).

Depositou-se a linha celular NCST11#34 em DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha a 4 de Novembro de 2005 sob o número de acesso DSM ACC2744. A linha celular CR.PIX (17a11b) foi depositada em DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha a 24 de Novembro de 2005 sob o número de acesso DSM ACC2749.

O invento será explicado mais detalhadamente através dos exemplos que se seguem, que são contudo apresentados como não limitativos do invento.

Exemplos

Exemplo 1: Desenvolvimento da linha celular NC5T11

A linha celular foi desenvolvida a partir de uma mistura de células de cérebro fetal por imortalização com genes E1A e B de adenovírus 5 por transfecção não vírica.

Retirou-se uma amostra de tecido da zona periventricular do cérebro de um feto após aborto induzido. Dissectou-se com tesouras e homogeneizou-se por aspiração com um pipeta de

cultura de tecidos em meio de cultura neuronal baseado em DEMEM/F12 contendo hFGF a 20 ng/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA), hEGF a 20 ng/ml (Invitrogen), 1x suplemento N2 (Invitrogen) e heparina a 8 µg/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Sedimentaram-se as células a 200 g durante 3 min. Avaliou-se a viabilidade das células utilizando azul de tripano e iodeto de propídio utilizando citometria de fluxo (BD Biosciences, Jose, CA 95131, USA). A viabilidade foi de 75%. Inocularam-se $0,5 \times 10^6$ células em frascos T25. Incubaram-se as células a 37 °C e CO₂ a 5%. As células formaram neuroesferas no dia 5 da cultura. Apresentam-se neuroesferas na figura 1A. No dia 8 transferiram-se as células para DMEM/F12 suplementado com FCS a 5% para permitir ligação e estimular a proliferação. As células formaram uma monocamada homogênea tal como apresentado na figura 1B e foram passadas 1:5 uma vez por semana. Esta cultura primária de células neurais foi denominada NC5.

Após 2 semanas em meio contendo soro, tranfectaram-se as células com vector p79 em placas de 6 poços subconfluentes utilizando Effectene (Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha) como um agente transfecção, seguindo as instruções dos fabricantes. O plasmídeo p79 contém os seguintes elementos: O pBluescript (Stratagene, USA) serve como esqueleto do plasmídeo, no qual o marcador de resistência a ampicilina foi substituído pelo gene de resistência a canamicina dirigido por um promotor bacteriano que permite crescimento e selecção em *E. coli*. O vector contém um fragmento de adenovírus de tipo 5 de tipo selvagem (SEQ ID NO: 5) contendo os quadros de leitura abertos de E1A (variantes de *splicing* 13S e 12S com ou sem o domínio CR3, respectivamente) e E1B 55k e 19k, bem como as sequências a montante de E1A. O gene E1A é antecedido pelo promotor de fosfoglicerato quinase (ratinho). As sequências de adenovírus são seguidas pelo sinal de poliadenilação do gene de timidina quinase de Herpes simplex, que serve como um substituinte para o sinal de poliadenilação E1B. Os elementos foram obtidos a partir dos respectivos organismos ou de plasmídeos dadores por PCR e clonados utilizando técnicas convencionais de ADN recombinante e verificados por sequenciação. Dois dias após

transfecção, as células foram tripsinizadas e transferidas para uma placa de 10 cm. Duas semanas mais tarde, formaram-se focos de pequenas células com uma elevada razão núcleo/citoplasma e bordos nitidamente distinguíveis (figura 1C) em células transfectadas, mas não em células com transfecção simulada. Isolaram-se oito focos independentes da 11^a transfecção com tripsina utilizando cilindros de clonagem (Corning, USA), inocularam-se em poços de uma placa de 24 poços e expandiram-se através de placas de 12 poços e placas de 6 poços para frascos T25. Todos os focos isolados continham dois tipos de células: células pequenas com bordos nítidos e células estendidas do tipo fibroblasto.

Três semanas após transfecção tornaram-se visíveis 15 clones adicionais na transfecção T11, alguns dos quais podem ser originários das restantes células de clones primários já isoladas.

Os clones T11a.1 e T11a.6 apresentaram o crescimento mais rápido e foram crio-conservados em DMEM/F12, DMSO a 10%, soro a 25%, 8 semanas após transfecção. Nesta altura todos os clones ainda continham uma fracção de células com citoplasma aumentado com semelhanças ao fenótipo primário. No entanto, com uma razão de divisão de 1:5 para T11a.1 e T11a.6 foram extintos e eliminados aproximadamente 3 meses após transfecção. Efectuaram-se experiências de imunofluorescência para associar a morfologia modificada com a expressão de E1 A e E1B. Após fixação com metanol, trataram-se as células com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k, respectivamente, seguido por anticorpos anti-rato conjugados com vermelho de texas. Tal como apresentado na figura 2 todas as células na amostra apresentam coloração nuclear típica para E1A e coloração citoplasmática para E1B.

Três meses após transfecção transferiram-se os clones T11a.1 e T11a.6 para meio ProPER isento de soro (Cambrex, Bélgica) por inoculação de $1,6 \times 10^6$ células após tratamento com tripsina. Recolheram-se as células por centrifugação e trocou-se o meio por centrifugação uma vez por semana. A população

celular sobreviveu, mas mesmo seis meses após transfecção as células ainda apresentavam baixa viabilidade e cresciam com um tempo de duplicação elevado de 60-80 h.

Quando as células foram de novo transferidas para DMEM/F12 com FCS a 5% após 3 meses em meio ProPER, formou-se uma cultura homogénea e altamente viável com um tempo de duplicação de 40 h para ambos os clones. Selecionou-se T11a.1 como o clone celular mais robusto para experiências adicionais e denominou-se NC5T11 (figura 1D).

Exemplo 2: Estabelecimento de NCST11puro clone#8

A produção de proteína numa linha celular depende de métodos de transfecção e selecção eficazes. Não se conhece a adequabilidade dos marcadores de selecção usualmente utilizados G418, puromicina, higromicina, blasticidina, MTX, histidinol para NC5T11. Numa primeira etapa de avaliação ensaiaram-se diferentes reagentes de transfecção disponíveis comercialmente Lipofectamine (Invitrogene), Fugene (Roche, Alemanha), Polyfect (Qiagen) e Effectene seguindo os protocolos dos fabricantes. Utilizou-se o plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, USA) que expressa gfp do promotor CMV humano para determinar a eficácia de transfecção transitória. Obteve-se a maior eficácia com Effectene (Qiagen) atingindo 20-50% dependendo da densidade celular quando aplicado a células aderentes em cultura em DMEM/F12, FCS a 10%.

Para ensaiar os genes marcadores de selecção, construíram-se vectores de expressão contendo o gene alfa-1-anti-tripsina (aat) humano sob o controlo do promotor CMV humano seguido pelo sinal PolyA de hormona de crescimento bovina e do respectivo marcador de selecção controlado por um promotor fraco. Mais especificamente, para ensaiar a selecção com puromicina, utilizou-se o vector C55 que contém o gene de resistência a puromicina, dirigido pelo promotor PGK humano seguido pelo sinal de poliadenilação precoce SV40.

Após transfecção, inocularam-se células em DMEM/F12 FCS a 5% contendo puomicina a 0,75 µg/ml e seleccionaram-se durante 3 semanas com permuta de meio semanal. Gerou-se um conjunto de clones e verificou-se a expressão por imunofluorescência utilizando um anticorpo policlonal de cabra anti-alfa-1-anti-tripsina (Innogenetics, USA) seguido por um anticorpo secundário de coelho anti-cabra marcado com biotina e um conjugado estreptavidina-vermelho do Texas.

Para isolar clones celulares individuais, inocularam-se 10000 células do conjunto de clones numa placa de 15 cm. Após 4 semanas, isolaram-se clones utilizando cilindros de clones (Corning) e analisaram-se os clones nº 1, 2, 7, 8, 9, 10 para expressão de aat. Mais especificamente, inocularam-se células a 7×10^4 células em placas de 12 poços e determinou-se o número de células e a expressão de aat. As taxas calculadas de produtividade específica das células apresentam-se na figura 3. O clone NC5T11puro#8 apresenta uma produtividade específica superior a 100 pg/célula·dia e seleccionou-se para desenvolvimento adicional.

Exemplo 3: Mudança de NC5T11 e NC5T11puro#8 para meio de produção e análise de expressão em cultura descontínua com agitação

A taxa de crescimento de NC5T11 e NC5T11puro#8 em meio ProPER (Cambrex) foi reduzida aproximadamente duas vezes comparativamente a meio contendo soro. Assim, ensaiou-se Xcell VPRO (JRH Biosciences) como alternativa. A adaptação foi efectuada por inoculação directa de $4,5 \times 10^6$ células em 5 ml de EXCELL VPRO num frasco T25. Após 2 semanas reiniciou-se o crescimento celular e estabeleceu-se uma taxa de divisão semanal de 1:3. Como o passo seguinte, ambos os clones foram adaptados a crescimento na presença de tensão de corte. Cultivaram-se as células em 12 ml de EXCELL VPRO a 6×10^4 células/ml em tubos de agitação de polipropileno de 50 ml (TPP, Suíça) e sujeitaram-se a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Após passagens repetidas, efectuaram-se ensaios em descontínuo para determinar as

densidades celulares máximas e a acumulação de produto durante as fases de crescimento exponencial e estacionária. Efectuaram-se as seguintes observações: O clone NC511puro apresentou uma viabilidade elevada que se manteve superior a 70% até ao dia 18. A densidade celular máxima não foi superior a 1×10^6 . A acumulação de produto continuou durante a fase estacionária (figura 5). Concluiu-se que será necessário desenvolvimento de meio específico ou melhoramento celular adicional para conseguir uma elevada densidade celular, comparável à obtida com células CHO. Tal resultará provavelmente num aumento substancial dos títulos de produto.

Exemplo 4: Construção da proteína de fusão pIX-RARA e vectores de integração para pIX-RARA e pIX

Obtiveram-se as sequências para PIX de adenovírus e receptor alfa de ácido retinóico (RARA) por PCR a partir de adenovírus tipo 5 e ADN genómico humano, respectivamente utilizando os iniciadores

1. AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT (SEQ ID NO:6)
2. AATGGTGGCAACCGCATTGGGAGGGGAGG (SEQ ID NO:7) para PIX e
3. CCAATGCGGTTGCCACCATTGAGACCCAGA (SEQ ID NO:8)
4. AAGGAGCGCTGGCGAGGGCTGTGTCCAT (SEQ ID NO:9) para RARA.

Ambos os fragmentos foram amplificados separadamente. Uma sobreposição entre os iniciadores 2 e 3 permitiu ligar ambos os fragmentos por PCR utilizando os iniciadores 3 e 4. Clonou-se o gene de fusão para o vector pEFpromhyg resultando em pEFpIXRARA. Este vector contém promotor de factor 2 de alongamento humano localizado em chr19:3,935,325-3,936,638 (conjunto de genoma humano Maio de 2004; SEQ ID NO:12). Contém elementos a montante e o primeiro intrão do gene EF2. O codão de iniciação natural de EF2, localizado a 5' do primeiro intrão, foi removido por mutagénesse. No vector, pEFpromhyg, a sequência EF2 é seguida pelo local de restrição único (AfeI)

utilizado para inserção de pIX-RARA. Um local interno de ligação a ribossoma após o local AF1 permite a expressão do gene de resistência a higromicina como um segundo quadro de leitura aberta num ARN ligado a pIX-RARA. Esta configuração suporta a expressão de pIX-RARA em todas as células resistentes a higromicina.

O gene para pIX de tipo selvagem foi amplificado utilizando os iniciadores AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT (SEQ ID NO:10) e ACCGAGCGCTTGTTTTAAACCGCATTGG (SEQ ID NO:11) e integrado no local Afe de pEFpromhyg em vez de pIX-RARA para obter pEFpIX.

Exemplo 5: Modificação das linhas celulares NC5T11 e NC5T11puro#8 com o gene PIX e a proteína de fusão PIX-receptor de ácido retinóico

Preparam-se os clones celulares NC5T11 e NC5T11puro#8 para transfecção em placas de 6 poços por inoculação de $1,3 \times 10^6$ células/poço em DMEM/F12, FCS a 5%. Linearizou-se o plasmídeo F67 (pEFpIXRARA) e o plasmídeo F76 (pEFpIX) com enzima de restrição Asp700 (Roche) e transfectaram-se após precipitação com etanol utilizando Effectene (Qiagen): misturou-se o ADN com 16 μ l de facilitador e 200 μ l de tampão EC. Após 2 min à temperatura ambiente, adicionou-se 18 μ l de Effectene e permitiu-se a formação de lipossomas durante 10 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a mistura de transfecção a 1 ml de volume de cultura em células inoculadas a 80% de confluência em placas de 6 poços no dia anterior. Confirmou-se a elevada eficácia de transfecção com uma transfecção paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, USA). Um dia após a transfecção, trocou-se o meio por DMEM/F12 com FCS a 10% e adicionou-se higromicina a 75 ou 100 μ g/ml (NC5T11) e 50 μ g/ml (NC5T11puro#8). Substituiu-se o meio de selecção duas vezes por semana. Após 18 dias, apareceram 15-20 clones nítidos em cada um dos poços. Trataram-se os conjuntos de clones com tripsina e continuou-se a selecção durante mais duas semanas. Os conjuntos de clones foram ensaiados para expressão de PIXRARA por RTPCR. Detectou-se um sinal forte com

iniciadores 1 e 2, um sinal mais fraco com os iniciadores 1 e 4 na maioria dos conjuntos de clones. Para isolar clones de células individuais, inocularam-se 10000 e 1000 células do conjunto de clones para placas de 15 cm. Após 4 semanas, isolaram-se os clones utilizando cilindros de clones (Corning). Para os clones resultantes da transfecção de F76 aplicou-se uma estratégia diferente. Trataram-se os conjuntos de clones com tripsina, transferiram-se para um tubo de agitação de 50 ml em EXCELL VPRO contendo higromicina a 75 µg/ml e após 2 semanas de cultura em suspensão, misturaram-se 2000 células viáveis com 12 ml de matriz de clone (Genetix, UK), inocularam-se numa placa de seis poços (Greiner) (2 ml/poço) e sujeitaram-se a recolha automática de colónias (clonepixFL, Genetics, UK). Aos clones originários de NC5T11puro#8 foram atribuídos os números #10-21. Aos clones originários de NC5T11 foram atribuídos os números # 34-45. Os clones transfectados com pEF2PIX foram denominados NC5T11PIXA-NC5T11PIXE. Os clones foram ensaiados para a presença do respectivo vector por PCR. Apresenta-se na figura 6 um ensaio inicial utilizando os iniciadores 1 e 2. Todos os clones que apresentam um sinal positivo foram mudados para cultura em ExCell VPRO. A readaptação foi efectuada por inoculação directa de $4,5 \times 10^6$ células em 5 ml de EXCELL VPRO num frasco T25. Após 6 semanas em cultura estacionária, transferiram-se as células em cultura para tubos de agitação de polipropileno de 50 ml (TPP, Suíça) a uma densidade de inoculação de 6×10^4 células/ml em EXCELL VPRO com um volume total de 12 ml e sujeitaram-se a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Seleccionaram-se os clones #10, #12, #14 (NC5T11puro#8pIXRARA) e #34, #43 (NC5T11pIXRARA) e NC5T11PIXB, NC5T11PIXC pela sua maior viabilidade sob tensão de corte. Os clones #34, 43 e NC5T11PIXC foram reclonados e analisados para a estabilidade do ADN integrado. A estabilidade foi avaliada determinando a razão génica entre PIX e E1B dado que E1A+E1B e pIXRARA foram introduzidos em transfecções independentes e os genes E1 foram introduzidos e foram mantidos na ausência de selecção durante > 2 anos e são portanto considerados estavelmente integrados. Isolou-se ADN genómico a partir de clones celulares seleccionados em 2 pontos temporais:

imediatamente após paragem da selecção hyg (precoce); após 2 meses na ausência de pressão de selecção (tardio). Determinaram-se os níveis de ADN de PIX e E1B por PCR em tempo real (ABI 7000, CYBR Green) a 2 concentrações de ADN. Apresentam-se na figura 7 exemplos desta avaliação. O vector pEF2PIXRARA mantém-se estavelmente nos subclones de #34 e #43 com aproximadamente 0,4-0,6 cópias de PIXRARA por E1B. O clone NC5T11PIXC originalmente contém 4 cópias de pIX por E1B. Este número é diminuído duas vezes durante o curso da experiência.

Exemplo 6: Crescimento de NC5T11pX-RARA dependente de ácido retinóico

O ácido retinóico (RA) é um indutor de diferenciação celular. A diferenciação está tipicamente associada a crescimento celular reduzido. A resposta a RA depende da expressão de receptor alfa de ácido retinóico, um factor de transcrição activado por RA. RA tem um efeito profundo em PML (leucemia promielocítica) revertendo o fenótipo transformado por paragem de crescimento.

Tal como apresentado na figura 8, o tratamento com RA a uma concentração de 6 µg/ml não teve qualquer efeito no crescimento quer de NC5T11, quer do clone NC5T11puro#8 que expressa alfa-1-antitripsina. No entanto, o crescimento dos clones #14 (NC5T11puro#8pIXRARA) e #34 (NC5T11pIXRARA) parou com tratamento com 6 µg/ml durante 5 dias em cultura aderente em DMEM/F12 com FCS a 5%.

Exemplo 7: PIXRARA evita a inibição de replicação de vírus por interferão

Inocularam-se células NC5 T11 e NC5T11#34 em placas de 6 poços a $8,0 \times 10^5$ células/poço em DMEM/F12 FCS a 5%. Após 12 h, adicionou-se interferão beta (rebif 44 de Serono) aos poços a uma de 1 e 8 IU/ml. Após 30 min, infectaram-se células tratadas com interferão e células de controlo de NC5 T11 e NC5T11#34 com vírus de encefalomiocardite (EMCV) a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,004. Após 24 h,

recolheram-se as culturas e congelaram-se a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para romper as células. Descongelou-se esta suspensão e clarificou-se por centrifugação a $800 \times g$ durante 10 min. Sujeitaram-se os lisados a titulação de vírus por ensaio de placa em células A549: Sucintamente, inocularam-se células A549 em placas de 24 poços e cultivaram-se até atingir confluência, incubaram-se durante 30 minutos com lisados clarificados diluídos 10 a 2×10^8 vezes, cobriram-se com agarose de tipo VII de gelificação baixa a 0,2% em RPMI FCS a 10% e incubaram-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Aspirou-se a camada de agarose, fixaram-se as células com glutaraldeído a 2% em PBS durante 20 min a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lavaram-se com água e incubaram-se durante 30 min à temperatura ambiente com solução de violeta de cristal a 1% em etanol a 50% para contar as placas de vírus. Os resultados apresentados na figura 9 demonstram que a replicação de EMCV é bastante ineficaz em células NC5T11 e que é altamente sensível a tratamento com interferão antes de infecção. A 8 IU/ml não se recuperou qualquer vírus viável da cultura. Contrariamente, a replicação de vírus em NC5T11#34 só é ligeiramente afectada pelo tratamento com interferão. Além disso, mesmo na ausência de IFN exógeno, verificaram-se títulos elevados para NC5T11#34. Os fenómenos mostraram processos de vacina modelo típicos, dado que várias estirpes de vacina induzem uma resposta IFN em células produtoras com uma via IFN intacta, a infecção a baixa multiplicidade de infecção (MOI) preferida em processos de produção pode causar excreção de IFN resultando num bloco de replicação de vírus de células que não tinham sido inicialmente infectadas. Assim, a expressão de PIX pode permitir a produção de elevados títulos de vírus iniciando com MOI baixa.

Exemplo 8: Estimulação de produção de proteína por pIX-RARA

NC5T11puro#8pIXRARA contendo vector F67 bem como alfa-1-antitripsina foram comparadas com o clone de partida NC5T11puro#8 na sua capacidade de produzir alfa-1 antitripsina num ensaio em descontinuo com agitação. As células foram inoculadas em EXCELL VPRO (JRH Biosciences) a 6×10^4 células/ml

em tubos de agitação de polipropileno de 50 ml (TPP, Suíça) com um volume total de 12 ml e sujeitaram-se a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Continuou-se a cultura até ao dia 22. Além das células em suspensão, formou-se um anel de agregados de células aderentes à parede do tubo. As células nestes agregados conservaram uma viabilidade superior a 70% ao longo do processo. Dado que a dissociação destes agregados por tripsina ou acutase (PAA) não foi bem-sucedida, não se determinou a cinética de crescimento nem as densidades celulares máximas. Retiraram-se amostras nos dias 9, 13 e 22 e determinaram-se os títulos utilizando ELISA de alfa-1-antitripsina. Os resultados apresentam-se na figura 10.

Exemplo 9: Geração de células de retina de pato que expressam pIX

A linha celular CR, derivada de células primárias de retina de pato e imortalizada de acordo com as orientações definidas de risco, encontra-se descrita (pedido de patente WO05042728, células de retina transfectadas com plasmídeo 60E). Cultivaram-se as células em meio DMEM:F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA) suplementado com soro de vitelo fetal a 5% (Biochrom AG, 12213 Berlim, Alemanha) a 39 °C e CO₂ a 7,5%. Para passagem, as células foram tratadas brevemente com TrypLE Express (Invitrogen). Linearizou-se o plasmídeo 76F pEFPIX1 com enzimas de restrição Ssp I e Xmn I (ambas de New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, USA) e purificaram-se a 400 ng/μl por cromatografia de afinidade (kit de extracção em gel de Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha). Transfectou-se 5 μl (2 μg) do ADN purificado em células CR com os reagentes Effectene (Qiagen): misturou-se ADN com 16 μl de facilitador e 200 μl de tampão EC. Após 2 min à temperatura ambiente, adicionou-se 18 μl de Effectene e deixou-se formar lipossomas durante 10 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a mistura de transfecção a 1 ml de volume de cultura de células inoculadas a 80% de confluência em placas de 6 poços no dia anterior. Confirmou-se a elevada eficácia de transfecção com uma transfecção paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, USA).

Expandiram-se as culturas transfectadas com pIX em frascos T75 três dias após transfecção e iniciou-se a selecção com higromicina B a 25 µg/ml (Invitrogen). Substituiu-se o meio uma vez por semana com higromicina B aumentada para 50 µg/ml. Após três semanas, sobreviveu um total de quatro grandes focos e foram reinoculados num frasco T25: descolaram-se as células com TrypLE e recolheram-se com 100 x g durante 10 min, ressuspenderam-se em meio fresco e plaquearam-se num frasco T25.

Quatro semanas após transfecção, destacaram-se as células de uma cultura saudável, subconflente num frasco T25 com TrypLE em 5 ml de DMEM:F12, FCS a 5%. Misturaram-se 2 ml desta solução com meio #63032-1000M (JRH Biosciences, KS 66215, USA) com um meio isento de componentes derivados de animais destinado a manutenção das culturas em suspensão. Adicionou-se higromicina B a 50 µg/ml. Isolou-se ADN genómico de 2 ml da cultura e sujeitou-se a PCR contra o transgene pIX com os iniciadores V293 e V294. O controlo negativo foi proporcionado por uma reacção paralela sem ADN e o controlo positivo por uma reacção paralela com plasmídeo 76F. O produto de PCR esperado na figura 11 (painel esquerdo) demonstra inserção estável do transgene pIX nas células CR, agora denominadas "CRpIX".

Confirmou-se a expressão da proteína PIX por transferência "Western": partiram-se 6×10^5 células por ebulição em (Tris pH 7,4 20 mM, NaCl 300 mM, Na-desoxicolato a 1%, Triton[®] X-100 a 1%, SDS a 0,1%) e separou-se a proteína por electroforese em gel, seguidamente transferiu-se para uma membrana de nylon. Detectou-se PIX com um anticorpo primário para pIX (gentilmente cedido por Dr. W. Seidel, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Alemanha), seguidamente fez-se reagir com anticorpo secundário dirigido contra o anticorpo anterior e marcado com fosfatase alcalina.

O sinal do tamanho esperado na figura 11 (painel direito) confirma a expressão de pIX em células CRpIX. Não se

encontrava presente qualquer sinal no controlo negativo de células 293 preparadas numa reacção paralela.

As células foram cultivadas em meio #63032-1000M em duas passagens adicionais, seguidamente transferiram-se para meio #14561-1000M (também de JRH Biosciences) em duas passagens adicionais. Todos os meios JRH foram suplementados com 1 x Glutamax I (Invitrogen) e higromicina B a 100 µg/ml.

Com a segunda passagem em meio #14561-1000M, ressuspendeu-se completamente uma pequena fracção (aproximadamente 2% de uma cultura em suspensão de 5 ml) em meio DMEM:F12, FCS e plaqueou-se numa placa de petri de 15 cm. Após 6 dias, removeram-se onze focos para cavidades individuais de uma placa de 12 poços e mantiveram-se em meio DMEM:F12, FCS. Para transferência de clones, aspirou-se o meio, aplicaram-se brevemente aos clones discos de clonagem (Sigma, MO, USA) embebidos em TrypLE e seguidamente transferiram-se para as cavidades cheias com meio. Expandiram-se os clones individuais para experiências adicionais e determinação das propriedades de crescimento.

Para analisar a manutenção de PIX em células transfectadas estavelmente, isolou-se ADN genómico de 1×10^6 células com o kit de ADN de sangue QIAamp (Qiagen) e determinou-se o número de moléculas de E1B e PIX em 25 ng e 50 ng de ADN genómico numa reacção ABI 7000 TaqMan com química de detecção com verde SYBR (ABI). Os iniciadores utilizados para quantificação foram gTggTTgCTTCATgCTAgTg ((SEQ ID NO:13) e TCTTCAGCAggTgACAgTTg (SEQ ID NO:14) para E1B, ACCTACgAgACCgTgTCTg (SEQ ID NO:15) e gAgCCgTCAACTTgTCATC (SEQ ID NO:16) para PIX. Dado que E1B foi introduzido independentemente e tem de ser mantido para as células sobreviverem, este gene serve como um marcador interno para padronizar o número de cópias de PIX e a força de expressão génica.

A figura 12 demonstra manutenção estável do transgene PIX em células em suspensão CR, mesmo na ausência de pressão de selecção. Também demonstra que as células positivas para PIX

sofrem de uma diminuição da taxa de crescimento. Verificámos consistentemente uma proliferação diminuída para todas as nossas células (células aviárias e humanas) após transfecção estável com um plasmídeo de expressão de PIX, demonstrando um impacto de PIX na bioquímica da célula hospedeira. Além disso, observámos uma tendência em células CR aderentes, positivas para PIX, para evitar o crescimento em camadas confluentes (inibição de contacto aumentada).

Exemplo 10: Geração de células de somito de pato que expressam PIX

A linha celular CS é derivada de somitos embrionários, também descrita em pedido de patente W005042728. A geração de células CS positivas para PIX foi efectuada paralelamente ao procedimento descrito anteriormente para a linha CR. Contrariamente a CRpIX, não se estabeleceram quaisquer culturas em suspensão para CSpIX. A dependência estrita de ancoragem é uma característica das células CS. Pode considerar-se que a célula que não prolifera em suspensão é menos tumorigénica, dado que o potencial para metastizar é gravemente prejudicado. A proteína PIX não altera esta propriedade nas células CS. Embora seja pleotrópica, esta proteína parece então não ter impacto no fenótipo de transformação. Esta observação corrobora a nossa hipótese de ser possível aplicar seguramente PIX em processos biofarmacêuticos.

Exemplo 11: Efeito de PIX na replicação de MVA em células CS

Inocularam-se células CS transfectadas estavelmente para expressão de PIX e células CS parentais como referência numa placa de 6 poços a 2×10^6 células/cavidade e infectaram-se com MVA a uma m.o.i. de 0,1 no dia seguinte. Obtiveram-se fotografias para documentar as diferenças no avanço de CPE 48 h e 72 h após infecção. Determinou-se o rendimento de vírus no sobrenadante 48 h após infecção e o rendimento completo (sobrenadante conjuntamente com o sedimento celular lisado) 72

h após infecção num ensaio de microfoco. Os resultados apresentam-se na figura 13: a presença de PIX nas células CS parece atrasar o início de CPE às 48 h após infecção comparativamente à referência parental. Ambas as culturas sofrem lise completa 72 h após infecção o que sugere que as diferenças na extensão de CPE não são devidas a uma mistura de células refractárias a MVA e sensíveis a MVA na população CS.PIX.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, nenhuma célula positiva para PIX foi ensaiada para vírus, a não ser adenovírus equivalente.

Exemplo 12: Efeito de PIX na replicação de MVA em células CR

Também se quantificou o efeito positivo da proteína PIX em células CR. Contrariamente às células CS, as células CR estão adaptadas a suspensão. São preferidas as culturas em suspensão para muitas aplicações industriais. Assim, determinámos o efeito de PIX em tal sistema, em contraste com cultura aderente.

Para células CR, o efeito de apoio de PIX não é tão acentuado como em células CS, mas verificámos consistentemente títulos mais elevados para MVA. Os rendimentos para MVA foram otimizados numa série de experiências e verificou-se que eram os maiores 48 h após infecção a densidades celulares médias. A figura 14 apresenta uma comparação de clone em suspensão CR.HS (seleccionado entre vários clones como a linha celular com o maior rendimento em MVA) e linha celular CR.MCX PIX(+). A abcissa indica m.o.i. (0,01, 0,05 ou 0,1, respectivamente), a ordenada indica rebentamento e o tamanho dos círculos indica densidades celulares (8, 2 ou $0,8 \times 10^6$ células/ml, respectivamente). O rebentamento é a razão entre o vírus obtido (ou rendimento) e o vírus proporcionado (o inóculo dependente d número de células e m.o.i.) e é assim uma medida da eficácia de amplificação. Em todas as configurações, o

desempenho das linhas celulares PIX(+) é melhor do que o da linha PIX(-).

Exemplo 13: Exclusão nuclear de PIX

Gerou-se um gene de fusão PIX-GFP para visualizar a distribuição da proteína PIX em células vivas e para ultrapassar a fraca actividade de ligação do anticorpo disponível: Tratou-se o plasmídeo 76F pEFPIX1 com enzimas de restrição Acc I e Dra I e tornaram-se planas as extremidades com polimerase Klenow (todas de New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, USA). A partir do padrão de bandas complexo, isolou-se o fragmento pretendido de 447 pb contendo a sequência de codificação de PIX por extracção em gel de agarose (kit de extracção em gel de Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha). A enzima de restrição Dra I reconhece a sequência "ttTAAa" para cortar após o último resíduo de timidina, em que o tripleto "TAA" central é o codão de paragem do quadro de leitura aberta de PIX. Assim, o fragmento de 447 pb não contém um codão de paragem. A fusão deste fragmento com o gene para EGFP no plasmídeo pEGFP-N1 aberto com Sma I (também de New England Biolabs) gera um gene de fusão contínuo de PIX seguido por EGFP. O plasmídeo resultante foi denominado p9GFP; a proteína de fusão expressa será denominada PIX-GFP neste texto.

Transfectaram-se células CS e CR com p9GFP e seleccionaram-se com geneticina (Invitrogen) a 300 µg/mL para expressão de PIX-GFP estável. Detectaram-se duas populações de expressão de PIX-GFP diferentes no intervalo de 2 semanas: uma população tinha usualmente 2 a 5 pontos brilhantes de PIX-GFP no citoplasma, a outra população tinha uma expressão mais uniforme de PIX-GFP no citoplasma e acumulação mais difusa do sinal GFP numa região próxima do núcleo. Em ambos os casos, os núcleos celulares apareceram como uma região escura, sugerindo que nenhuma ou pouca proteína quimérica entra no núcleo. Apresentam-se na figura 15, exemplos representativos de ambos os tipos de clones de CRpIXGFP.

Consistentemente com este resultado, encontramos uma sequência de exportação nuclear no quadro de leitura aberta de PIX por aplicação do algoritmo de busca NetNES (Cour et al., Protein Eng. Des. Sel. 17, 527-536 (2004)) para a sequência primária de PIX. A NES identificada por este programa é 313-GCACAATTGGATTCTTTGACCCGGGAACCTT-342 (SEQ ID NO:17) (traduzida: AQLDSLREL; SEQ ID NO:18). Tanto quanto é do nosso conhecimento, é a primeira vez que tal sinal foi descrito na proteína PIX. Igualmente, não foi descrita na literatura uma sequência de localização nuclear (NLS) para PIX e não conseguimos detectar tal sinal (por exemplo, utilizando o algoritmo proporcionado por Columbia University em <http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>).

A localização citoplasmática de PIX-GFP nas nossas células de pato é assim consistente com a sequência primária de PIX.

Exemplo 14: Variantes de fusão PIX GFP

Investigou-se a surpreendente exclusão nuclear de PIX GFP com construções de fusão PIX adicionais. Derivou-se um plasmídeo de expressão PIX-GFP-NLS da construção p9GFP descrita anteriormente por inserção de oligonucleótidos sintéticos i185 e i186. Estes oligos foram desnaturados a 80 °C durante 5 min e deixou-se hibridar em MgCl₂ 10 mM por arrefecimento gradual até à temperatura ambiente para obter:

5'-GATGTACAAAGATCCGAAGAAGAACCGCAAAGGTTAACGCGGCCGCAC-3'
(SEQ ID NO:19)

3'-CTACATGTTTCTAGGCTTCTTCTTGCGTTTCCAATTGCGCCGGCGTG-5'
(SEQ ID NO:20)

Digeriu-se este oligonucleótido em cadeia dupla com BsrG I e Not I e inseriu-se nos mesmos locais de p9GFP. Por tradução, a inserção adiciona uma sequência NLS (PKKNRK; SEQ ID NO:21) na proteína de fusão PIX-GFP que se parece com a NLS de vírus 40 símio. Um novo local Hpa I introduzido com esta inserção serve como um marcador de diagnóstico para confirmar clonagem

bem-sucedida. O plasmídeo resultante denomina-se p9 GFP NLS, a proteína expressa PIX-GFP-NLS e o quadro de leitura aberta que codifica a proteína PIX-GFP-NLS apresentam-se em SEQ ID NO: 23 e 22, respectivamente.

Gerou-se uma proteína de fusão PIX-RARA marcada com GFP através de amplificação por PCR de um fragmento contendo PIX-RARA com iniciadores EBR 44A (5'-GGATCCTTCCTCCTCGGGCGGGTGT-3'; (SEQ ID NO:24), V293 (5'-AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT 3'; SEQ ID NO:25) e plasmídeo #67F pEF PIX RARA NEO como molde. Tratou-se o amplicão de 1926 pb com polinucleótido quinase e inseriu-se em pEGFP-C2 (Clontech) linearizado com EcoR I e tornado plano com enzima Klenow (todas as enzimas de New England Biolabs). O plasmídeo resultante denomina-se p9 GFP RARA, a proteína expressa PIX GFP RARA.

A figura 16 apresenta a distribuição intracelular das várias proteínas marcadas com GFP em células CHO transfectadas transitoriamente.

Exemplo 15: PIX e interferão

Muitos vírus induzem a resposta imunitária celular inata através de TLR-3 (receptor 3 do tipo toll). TLR-3 reconhece ARN em cadeia dupla, um padrão característico de replicação vírica. Uma das funções de TLR-3 é a activação de NFkB e interferão do tipo I (Alexopoulou et al., Nature 413, 732-738 (2001)). O interferão medeia um estado antivírico na célula hospedeira. Analisou-se o efeito de indução de interferão através de um ARN em cadeia dupla artificial, poly I:poly C (ácido poli-inosínico-policitidílico, Sigma). Surpreendentemente, as células CR e CRpIX apresentaram muito baixa sensibilidade a poly I:poly C, enquanto as células CS responderam claramente ao indutor. Inesperadamente, as células CS positivas para PIX responderam mais depressa e a concentrações mais baixas do que as células CS parentais (figura 17). Tanto quanto é do nosso conhecimento, não tinha sido descrito na literatura actual uma relação entre PIX e interferão.

O efeito de apoio de PIX para MVA foi mais forte em células CS do que em células CR e as células CS responderam ao substituto de ARN em cadeia dupla melhor do que as células CR. Sabe-se que MVA induz interferão e que este vírus também está equipado com proteínas que diminuem a resposta de interferão. Determinou-se assim o efeito de indutor poly I:poly C em MVA em células CRp9GFP e CSp9GFP. A figura 18 sugere que as células infectadas com MVA sofrem menos de poly I:poly C do que o controlo não infectado. Esta observação é consistente com o facto de MVA induzir e interferir com a resposta imunitária inata celular e relaciona-se com a nossa observação inesperada de que PIX de um adenovírus humano em células aviárias coopera com proteínas antivíricas de um vírus pox altamente atenuado para aumentar o rendimento deste último vírus.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Probiogen

<120> Factores de proteína aumentadores de produtividade, novas linhas celulares e suas utilizações

<130> 062069wo

<150> EP05110453.7

<151> 2005-11-08

<160> 25

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 423

<212> ADN

<213> Adenovírus tipo 37

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(423)

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Adenovirus tipo 37

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 3

<211> 1635

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusão pIX-RARA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1635)

<400> 3

```

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

acg cgc atg ccc cca tgg gcc ggg gtg cgt cag aat gtg atg ggc tcc      96

```

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

gtg cgc aaa gcg cac cag gaa acc ttc cct gcc ctc tgc cag ctg ggc Val Arg Lys Ala His Gln Glu Thr Phe Pro Ala Leu Cys Gln Leu Gly 275 280 285	864
aaa tac act acg aac aac agc tca gaa caa cgt gtc tct ctg gac att Lys Tyr Thr Thr Asn Asn Ser Ser Glu Gln Arg Val Ser Leu Asp Ile 290 295 300	912
gac ctc tgg gac aag ttc agt gaa ctc tcc acc aag tgc atc att aag Asp Leu Trp Asp Lys Phe Ser Glu Leu Ser Thr Lys Cys Ile Ile Lys 305 310 315 320	960
act gtg gag ttc gcc aag cag ctg ccc gcc ttc acc acc ctc acc atc Thr Val Glu Phe Ala Lys Gln Leu Pro Gly Phe Thr Thr Leu Thr Ile 325 330 335	1008
gcc gac cag atc acc ctc ctc aag gct gcc tgc ctg gac atc ctg atc Ala Asp Gln Ile Thr Leu Leu Lys Ala Ala Cys Leu Asp Ile Leu Ile 340 345 350	1056
ctg cgg atc tgc acg cgg tac acg ccc gag cag gac acc atg acc ttc Leu Arg Ile Cys Thr Arg Tyr Thr Pro Glu Gln Asp Thr Met Thr Phe 355 360 365	1104
tcg gac ggg ctg acc ctg aac cgg acc cag atg cac aac gct ggc ttc Ser Asp Gly Leu Thr Leu Asn Arg Thr Gln Met His Asn Ala Gly Phe 370 375 380	1152
ggc ccc ctc acc gac ctg gtc ttt gcc ttc gcc aac cag ctg ctg ccc Gly Pro Leu Thr Asp Leu Val Phe Ala Phe Ala Asn Gln Leu Leu Pro 385 390 395 400	1200
ctg gag atg gat gat gcg gag acg ggg ctg ctc agc gcc atc tgc ctc Leu Glu Met Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Ile Cys Leu 405 410 415	1248
atc tgc gga gac cgc cag gac ctg gag cag ccg gac cgg gtg gac atg Ile Cys Gly Asp Arg Gln Asp Leu Glu Gln Pro Asp Arg Val Asp Met 420 425 430	1296
ctg cag gag ccg ctg ctg gag gcg cta aag gtc tac gtg cgg aag cgg Leu Gln Glu Pro Leu Leu Glu Ala Leu Lys Val Tyr Val Arg Lys Arg 435 440 445	1344
agg ccc agc cgc ccc cac atg ttc ccc aag atg cta atg aag att act Arg Pro Ser Arg Pro His Met Phe Pro Lys Met Leu Met Lys Ile Thr 450 455 460	1392
gac ctg cga agc atc agc gcc aag ggg gct gag cgg gtg atc acg ctg Asp Leu Arg Ser Ile Ser Ala Lys Gly Ala Glu Arg Val Ile Thr Leu 465 470 475 480	1440
aag atg gag atc ccg ggc tcc atg ccg cct ctc atc cag gaa atg ttg Lys Met Glu Ile Pro Gly Ser Met Pro Pro Leu Ile Gln Glu Met Leu 485 490 495	1488
gag gac tca gag ggc ctg gac act ctg agc gga cag ccg ggg ggt ggg Glu Asp Ser Glu Gly Leu Asp Thr Leu Ser Gly Gln Pro Gly Gly Gly 500 505 510	1536
ggg cgg gac ggg ggt ggc ctg gcc ccc ccg cca ggc agc tgt agc ccc Gly Arg Asp Gly Gly Gly Leu Ala Pro Pro Pro Gly Ser Cys Ser Pro 515 520 525	1584
agc ctc agc ccc agc tcc aac aga agc agc ccg gcc acc cac tcc ccg Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn Arg Ser Ser Pro Ala Thr His Ser Pro 530 535 540	1632
tga	1635

<210> 4

<211> 544

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val Ala Thr Ile Glu
 130 135 140

Thr Gln Ser Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Ser Pro Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Pro Leu Pro Arg Ile Tyr Lys Pro Cys Phe Val Cys Gln Asp Lys
 165 170 175

Ser Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Ser Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 3069

<212> ADN

<213> Adenovirus tipo 37

<400> 5

```

ttatagtcag ctgacgtgta gtgtatttat acccggtgag ttcctcaaga ggcactctt      60
gagtgccagc gagtagagtt ttctcctccg agccgctccg acaccgggac tgaaaatgag      120
acatattatc tgccacggag gtgttattac cgaagaaatg gccgccagtc ttttgaccca      180
gctgatcgaa gaggtactgg ctgataatct tccacctcct agccattttg aaccacctac      240
ccttcacgaa ctgtatgatt tagacgtgac ggccccgaa gatcccaacg aggaggcggt      300
ttcgcagatt tttcccact ctgtaatggt ggcggtgcag gaagggattg acttactcac      360
ttttccgccc gcgcccgtt ctccggagcc gcctcacctt tcccggcagc ccgagcagcc      420
ggagcagaga gccttgggtc cggtttctat gccaaacctt gtaccggagg tgatcgatct      480
tacctgccac gaggtgggtt ttccaccagc tgacgacgag gatgaagagg gtgaggagtt      540
tgtgttagat tatgtggagc accccgggca cggttgcagg tcttgtcatt atcaccggag      600
gaatacgggg gaccagata ttatgtgttc gctttgctat atgaggacct gtggcatggt      660
tgtctacagt aagtgaaaat tatgggcagt gggatgata gtgggtgggt tggtgtggta      720
atTTTTTTTT taTTTTTtac agTTTTgtgg tTaaagaat tTgtattgt gattTTTTta      780
aaaggtcctg tgtctgaacc tgagcctgag cccgagccag aaccggagcc tgcaagacct      840
accgcccgtc cTaaaatggc gcctgctatc ctgagacgcc cgacatcacc tgtgtctaga      900

```

gaatgcaata gtagtacgga tagctgtgac tccggtcctt ctaacacacc tcctgagata 960
caccogggtgg tcccgtgtg cccattaaa ccagttgccg tgagagttgg tgggcgtcgc 1020
caggctgtgg aatgtatcga ggacttgctt aacgagcctg ggcaaccttt ggacttgagc 1080
tgtaaacgcc ccaggccata aggtgtaaac ctgtgattgc gtgtgtgggt aacgcctttg 1140
tttgcetgaat gagttgatgt aagtttaata aagggtgaga taatgtttaa cttgcatggc 1200
gtgttaaata gggcggggct taaaggtat ataatgcgcc gtgggctaata cttggttaca 1260
tctgacctca tggagccttg ggagtgtttg gaagattttt ctgctgtgcg taacttgctg 1320
gaacagagct ctaacagtac ctcttggttt tggaggtttc tgtggggctc atcccaggca 1380
aagttagtct gcagaattaa ggaggattac aagtgggaat ttgaagagct tttgaaatcc 1440
tgtgtgtgagc tgtttgatcc tttgaatctg ggtcaccagg cgcttttcca agagaaggctc 1500
atcaagactt tggatttttc cacaccgggg cgcgctgctg ctgctgttgc ttttttgagt 1560
tttataaagg ataaatggag cgaagaaacc catctgagcg ggggtacct gctggatttt 1620
ctggccatgc atctgtggag agcgtttgtg agacacaaga atcgcctgct actgttctct 1680
tccgtccgcc cggcgataat accgacggag gagcagcagc agcagcagga ggaagccagg 1740
cggcgccggc aggagcagag cccatggaac ccgagagccg gcctggacct tggggaatga 1800
atgttgatca ggtgctgaa ctgtatccag aactgagacg cattttgaca attacagagg 1860
atgggcaggg gctaaagggg gtaaagaggg agcggggggc ttgtgaggct acagaggagg 1920
ctaggaatct agcttttagc ttaatgacca gacaccgtcc tgagtgtatt acttttcaac 1980
agatcaagga taattgcgct aatgagcttg atctgctggc gcagaagtat tccatagagc 2040
agctgaccac ttactggctg cagccagggg atgattttga ggaggctatt agggatatatg 2100
caaaggtggc acttaggcca gattgcaagt acaagatcag caaacttgta aatatcagga 2160
attgttgcta catttctggg aacggggccg aggtggagat agatacggag gataggggtg 2220
cctttagatg tagcatgata aatatgtggc cgggggtgct tggcatggac ggggtggtta 2280
ttatgaatgt aaggtttact ggcccccaatt ttagcggtag ggttttctct gccaatacca 2340
accttacct acacgggtga agcttctatg ggtttaacaa tacctgtgtg gaagcctgga 2400
ccgatgtaag ggttcggggc tgtgcctttt actgctgctg gaaggggggt gtgtgtcgcc 2460
ccaaaagcag ggcttcaatt aagaaatgcc tctttgaaag gtgtaccttg ggtatcctgt 2520
ctgagggtaa ctccagggg cgccacaatg tggcctcoga ctgtggttgc ttcattgctag 2580
tgaaaagcgt ggctgtgatt aagcataaca tggatgtgg caactgcgag gacagggcct 2640
ctcagatgct gacctgctg gacggcaact gtcacctgct gaagaccatt cacgtagcca 2700
gccactctcg caaggcctgg ccagtgtttg agcataacat actgacccgc tgttccttgc 2760

atttgggtaa caggagggg gtgttcctac cttaccaatg caatttgagt cacactaaga	2820
tattgcttga gcccagagac atgtccaagg tgaacctgaa cggggtgtt gacatgacca	2880
tgaagatctg gaaggtgctg aggtacgatg agaccgcac caggtgcaga ccctgcgagt	2940
gtggcggtaa acatattagg aaccagcctg tgatgctgga tgtgaccgag gagctgaggc	3000
ccgatcactt ggtgctggcc tgcaccgcg ctgagtttg ctctagcgat gaagatacag	3060
attgaggat	3069

<210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 6
 aaccagcgct accatgagca ccaactcgt 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 7
 aatggtggca accgcattgg gaggggagg 29

<210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 8
 ccaatgcggt tgccaccatt gagaccaga 30

<210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 9
aaggagcgcct ggcgagggct gtgtccat 28

<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 10
aaccagcgcct accatgagca ccaactcgt 29

<210> 11
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 11
accgagcgcct tgttttaaac cgcattgg 28

<210> 12
<211> 1313
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12

```

cccgagatgc ccagcttcta ttctagagcg ccgcgccggc gccgaatggg ttaacgggcg      60
gggggacacg cctccgtgcg cttgcgcggc gtcccttcgc cccgccttcg cagcgcagtc    120
acatgaccgg cccaaccggc gtcgcgctat aaaaagctga gtgttgacgt cagcgttctc    180
ttccgccgtc gtcgccgcca tcctcggcgc gactcgtctc tttcggttct acctgggaga    240
atccaccggc atccgccaac gcgacagata tcaggtgagt aaccctgcct cgctgggtgcc    300
ccggagcggc ggcggggcct ccgcgggggc tacgctgcct agcctgggac gctggggccc    360
cccgtgccag gaggagacgt agcggcgcgg gggccggagg acccggggct ggggaagcgg    420
ccgcccgcct gtctgtgccc atgtctgtgc gccgcgctgt tcaccgagcc ctttctccgt    480
ttccgagggc gccataacct tgcccagacc tggttggagc tgggttgta gcggggatgg    540
gggtggggaa tgatgatgtg gcagggcgtg taatggcggg caccgcggtg gaagcgggga    600
gacagggagg cgccttatgt aaccgcggg ccgcgagttt gagatcgatt ttctgccggg    660
ggactagggg cggcagggaa tggcagaacg agcaaagcga cacctgaaag gctccccttt    720
tccttccaaa taccttctcc tgatgctgtt aatcgtcgac cttaggcact tgccttctc    780
atgactccca gatgtacaaa gactcttatt gagacacgag gtgtaggctt gtggcagtta    840
gggccggtcc ggctccccgt tatttctcgg ggtgggtggc cttgtctgat cccgtttgcc    900
aagggggtgac cttgcathtt atgatgaagc ttcttgctcg gggaaagttg ggtggcccgg    960
tgacaacgtg gagggggcct taggagagga ttcacccctt acgtgtttgg ccccaaatga   1020
gactttagta tttgtacctg gtatcaagga aatctgttga cactcagttt tattcctgag   1080

cacttttatt tctgggttgt caatcatgaa tgacacctat taacgggtgt tccttggaga   1140
ttgcggggtg gctcttaagg ggtgttaggc tggcaagatt cgggtggcct ggggcacccc   1200
agcaccaacc ccctcctggc cttgggcatg ctggttcgtt tggactgaac gctccgtgcc   1260
atgctgtggt cctggaatc acgagctggt ctgagcctcc ttgtcttgcc cag           1313

```

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 13

gtggttgctt catgctagtg 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 14

tcttcagcag gtgacagttg 20

<210> 15

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 15

acctacgaga ccgtgtctg 19

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 16

gagccgtcaa cttgtcatc 19

<210> 17

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência NES

<400> 17

gcacaattgg attctttgac ccggaactt 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência NES

<400> 18

Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg Glu Leu
1 5 10

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

<220>
<223> Sequência NLS

<400> 19
gatgtacaaa gatccgaaga agaaccgcaa aggttaacgc ggccgcac 48

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

<220>
<223> Sequência NLS

<400> 20
ctacatgttt ctaggcttct tcttggcggt tccaattgcy ccggcgtg 48

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

<220>
<223> Sequência NLS

<400> 21

Pro Lys Lys Asn Arg Lys
1 5

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

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

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

<400> 22

atg agc acc aac tcg ttt gat gga agc att gtg agc tca tat ttg aca	48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
1 5 10 15	
acg cgc atg ccc cca tgg gcc ggg gtg cgt cag aat gtg atg ggc tcc	96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser	
20 25 30	
agc att gat ggt cgc ccc gtc ctg ccc gca aac tct act acc ttg acc	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	
tac gag acc gtg tct gga acg ccg ttg gag act gca gcc tcc gcc gcc	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	
gct tca gcc gct gca gcc acc gcc cgc ggg att gtg act gac ttt gct	240
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	
ttc ctg agc ccg ctt gca agc agt gca gct tcc cgt tca tcc gcc cgc	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	
gat gac aag ttg acg gct ctt ttg gca caa ttg gat tct ttg acc cgg	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	
gaa ctt aat gtc gtt tct cag cag ctg ttg gat ctg cgc cag cag gtt	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	
tct gcc ctg aag gct tcc tcc cct ccc aat gcg gtt tgg gat cca ccg	432
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val Trp Asp Pro Pro	
130 135 140	
gtc gcc acc atg gtg agc aag gcc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg	480
Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val	
145 150 155 160	
ccc atc ctg gtc gag ctg gac gcc gac gta aac gcc cac aag ttc agc	528
Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser	
165 170 175	
gtg tcc gcc gag gcc gag gcc gat gcc acc tac gcc aag ctg acc ctg	576
Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu	
180 185 190	
aag ttc atc tgc acc acc gcc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc	624
Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu	
195 200 205	
gtg acc acc ctg acc tac gcc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac	672

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 24

ggatccttcc tcctcgggcg ggtgt 25

<210> 25

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 25

aaccagcgct accatgagca ccaactcgt 29

Lisboa, 2012-03-15

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um alvo vírico não adenovírus ou uma ou mais proteínas alvo que não estão relacionadas com adenovírus, cujo método compreende
 - (a) cultivar uma célula de expressão de vertebrado imortalizada, que se pode obter por infecção ou transfecção de uma célula de vertebrado imortalizada hospedeira, com o referido vírus alvo, com um vector contendo a sequência de ácidos nucleicos que codificam o referido vírus ou com um vector contendo as sequências de ácidos nucleicos que codificam as referidas uma ou mais proteínas alvo, em que as referidas células de expressão de vertebrado imortalizadas têm estavelmente integrado no seu genoma um gene que codifica PIX de adenovírus e que expressam a referida PIX de adenovírus de forma estável e
 - (b) isolar o referido vírus alvo não adenovírus ou a referida uma ou mais proteínas alvo.
2. Método da reivindicação 1, em que
 - (i) a PIX de adenovírus está modificada por fusão com um factor de transcrição, uma proteína fluorescente marcadora, uma enzima ou um péptido de trânsito; e/ou
 - (ii) a PIX de adenovírus é expressa na célula hospedeira e na célula de expressão numa quantidade de pelo menos 1 pg/ μ g de proteína celular; e/ou

- (iii) o gene que codifica PIX de adenovírus está sob o controlo de um promotor estável homólogo ou heterólogo.

3. Método da reivindicação 2, em que

- (i) o referido factor de transcrição é receptor alfa de ácido retinóico, a referida proteína marcadora fluorescente é GFP ou DsRed, a referida enzima é LacZ ou o referido péptido de trânsito é um NLS, e/ou
- (ii) o referido promotor é um promotor celular constitutivo.

4. Método das reivindicações 1 a 3, em que a PIX de adenovírus

- (i) tem a sequência tal como apresentada em SEQ ID NO: 2;
- (ii) está fundida com receptor alfa de ácido retinóico (RARA);
- (iii) está fundida com GFP e uma sequência NLS;
- (iv) está fundida com GFP; ou
- (v) está fundida com uma sequência NLS isolada.

5. Método da reivindicação 4, em que a PIX de adenovírus fundida com receptor alfa de ácido retinóico tem a sequência tal como apresentada em SEQ ID NO: 4 ou em que a PIX de adenovírus fundida com GFP e uma sequência NLS tem a sequência tal como apresentada em SEQ ID NO: 23.

6. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que

- (i) a célula hospedeira e de expressão contém adicionalmente genes (víricos) imortalizados incluindo uma proteína E1 de um adenovírus; e/ou
- (ii) a célula contém adicionalmente sequências funcionais tal como sequências de marcador de selecção, locais de dador/aceitador de *splicing* e/ou sequências de reconhecimento de recombinase permitindo integração de uma sequência de ácidos nucleicos alvo a ser expressa na célula.

7. Método de qualquer uma reivindicações 1 a 6, em que

- (i) o vírus alvo é seleccionado de um vírus de tipo selvagem, mutado ou deletado, um vírus adaptado ao frio ou atenuado, uma estirpe de vacina e um vector vírico; ou
- (ii) a uma ou mais proteínas alvo são seleccionadas de anticorpos, proteínas recombinantes, antigénios víricos e hormonas peptídicas.

8. Método da reivindicação 7, em que o vector vírico é seleccionado de um lentivírus, um vírus pox, um vírus adenoassociado (aav), um vírus herpes e um flavivírus.

9. Método da reivindicação 8, em que o vírus pox é seleccionado de um vírus de variola bovina, um vírus de variola aviária e um vírus de variola de canário.

10. Método da reivindicação 9, em que o vírus de variola bovina é um vírus de Vaccinia Ankara modificado (MVA).

11. Método da reivindicação 7, em que

- (i) as proteínas recombinantes são seleccionadas de eritropoietina, alfa-1-antitripsina, factores VIII e IX de coagulação sanguínea e interferões, ou
- (ii) os antigénios víricos são seleccionados de influenza HA e NA, HBV-S, proteína G de herpes e proteína G de raiva.

12. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a célula hospedeira e de expressão é derivada de cérebro humano.

13. Método da reivindicação 12, em que a célula hospedeira e de expressão é derivada de cérebro fetal humano.

14. Método da reivindicação 13, em que a célula hospedeira é uma célula NC5T11#34 e a célula de expressão é derivada da célula NC5T11#34, estando a referida célula NC5T11#34 depositada em DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2744.

15. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a célula hospedeira e de expressão é uma célula aviária.

16. Método da reivindicação 15, em que a célula hospedeira e célula de expressão é uma célula aviária derivada de retina de pato ou somito de pato.

17. Método da reivindicação 16, em que a célula hospedeira é uma célula CR.PIX (17a11b) e a célula de expressão é derivada da célula CR.PIX (17a11b), estando a referida célula CR.PIX (17a11b) depositada em DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2749.

18. Célula de expressão de vertebrado imortalizada para produzir um vírus alvo não adenovírus, que

- (i) tem integrado no seu genoma de forma estável um gene que codifica para PIX de adenovírus e expressa de forma estável a referida PIX de adenovírus, e
- (ii) está infectada ou transfectada com um vírus alvo não adenovírus ou com um vector que contém a sequência de ácidos nucleicos que codifica o referido vírus.

19. Célula de expressão de vertebrado imortalizada da reivindicação 18, em que

- (i) a PIX de adenovírus está modificada por fusão com um factor de transcrição, uma proteína marcadora fluorescente, uma enzima ou um péptido de trânsito; e/ou
- (ii) a PIX de adenovírus é expressa na célula hospedeira e na célula de expressão numa quantidade de pelo menos 1 pg/ μ g de proteína celular; e/ou
- (iii) o gene que codifica PIX de adenovírus está sob o controlo de um promotor homólogo ou heterólogo.

20. Célula de expressão de vertebrado imortalizada da reivindicação 19, em que

- (i) o referido factor de transcrição é receptor alfa de ácido retinóico, a referida proteína marcadora fluorescente é GFP ou DsRed, a referida enzima é LacZ ou o referido péptido de trânsito é um NLS, e/ou
- (ii) o referido promotor é um promotor celular constitutivo.

21. Célula de expressão de vertebrado imortalizada das reivindicações 18 a 20, em que o vector vírico é seleccionado

de um lentivírus, um vírus pox, um vírus adenoassociado (aav), um vírus herpes e um flavivírus.

22. Célula de expressão de vertebrado imortalizada da reivindicação 18, em que a célula de expressão é derivada de cérebro humano.

23. Utilização da célula de expressão de vertebrado imortalizada de qualquer das reivindicações 18 a 22 para preparar um vírus alvo não adenovírus.

Lisboa, 2012-03-15

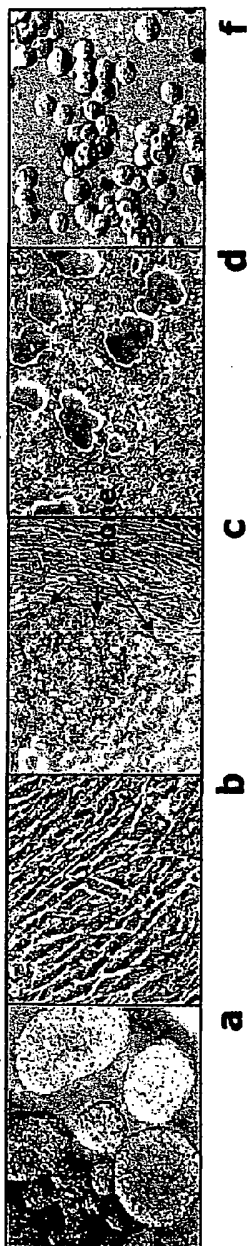


Fig. 1

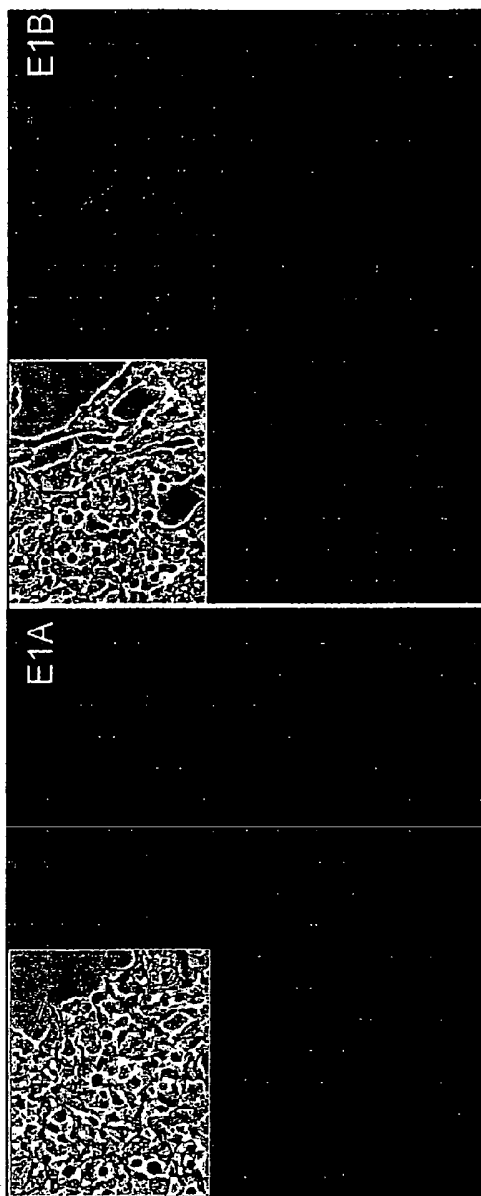


Fig. 2

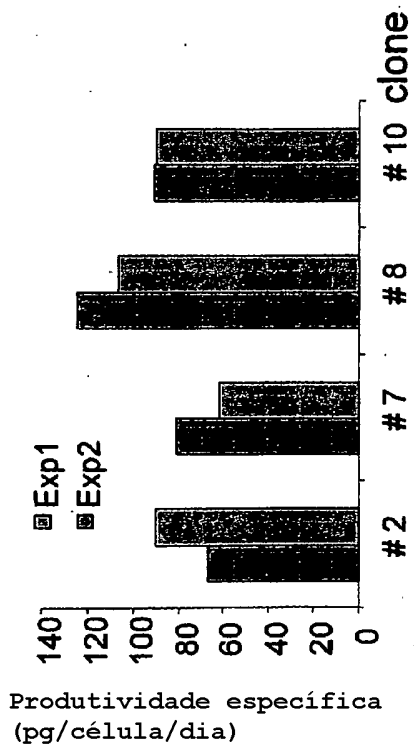


Fig. 3

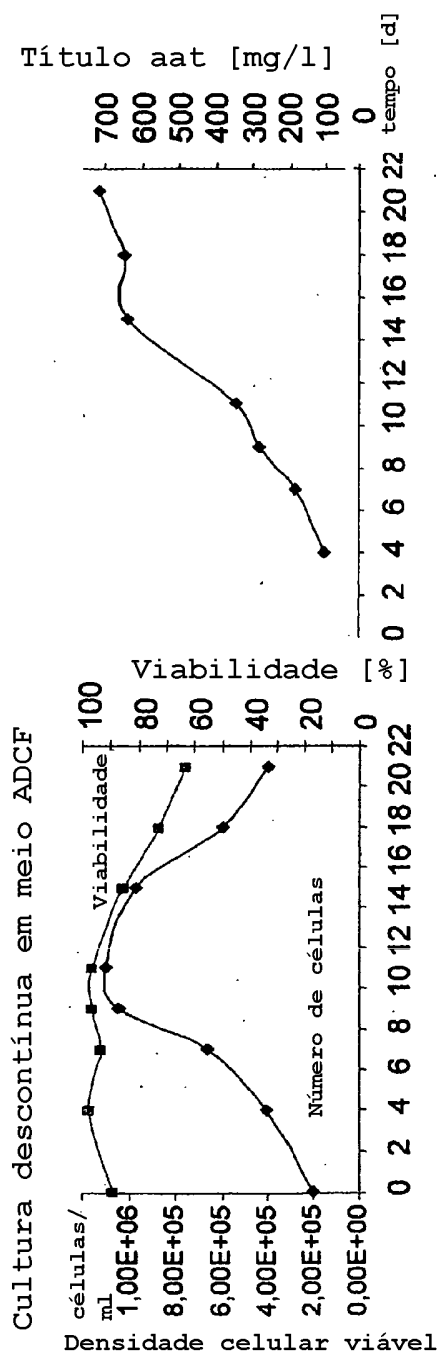


Fig. 4

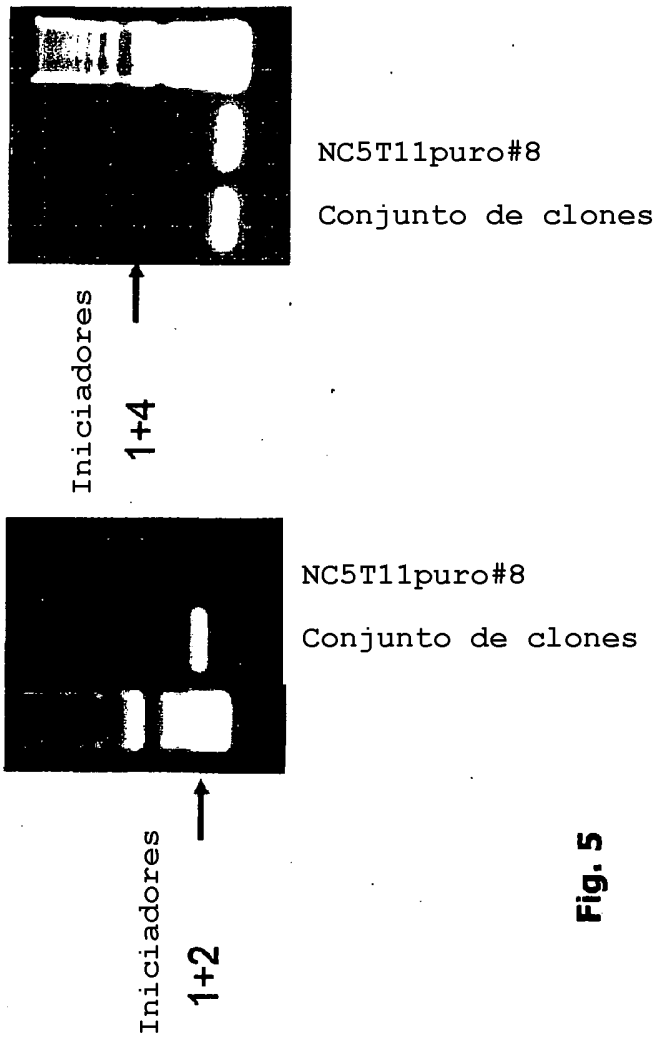


Fig. 5

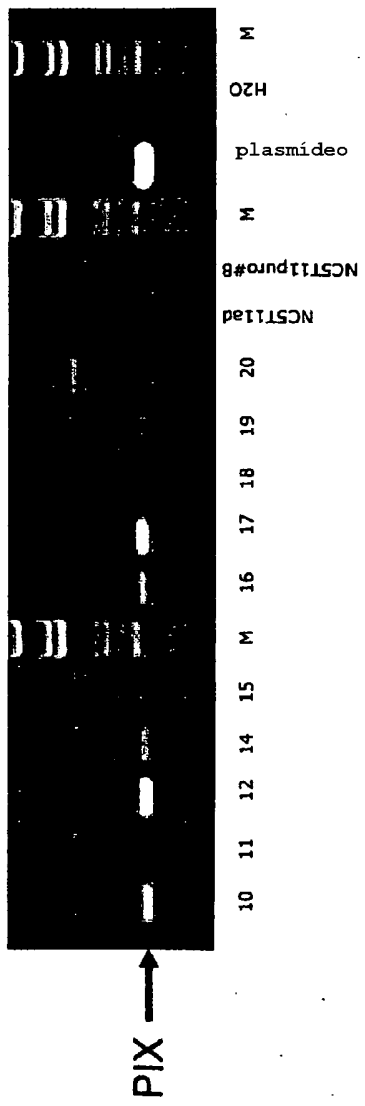


Fig. 6

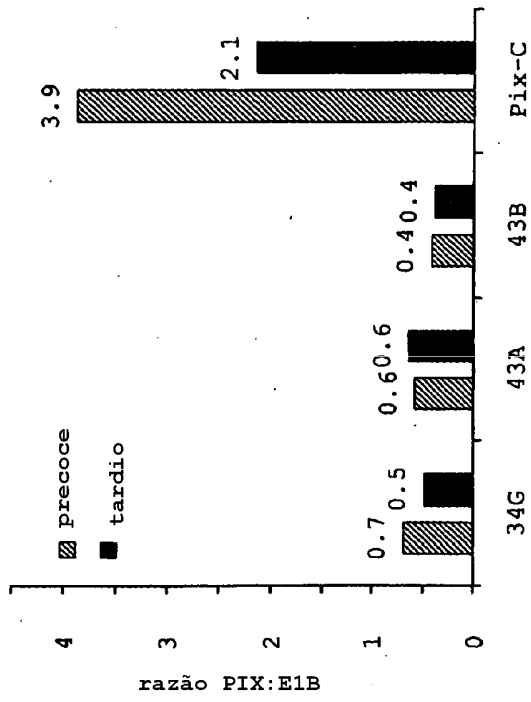


Fig. 7

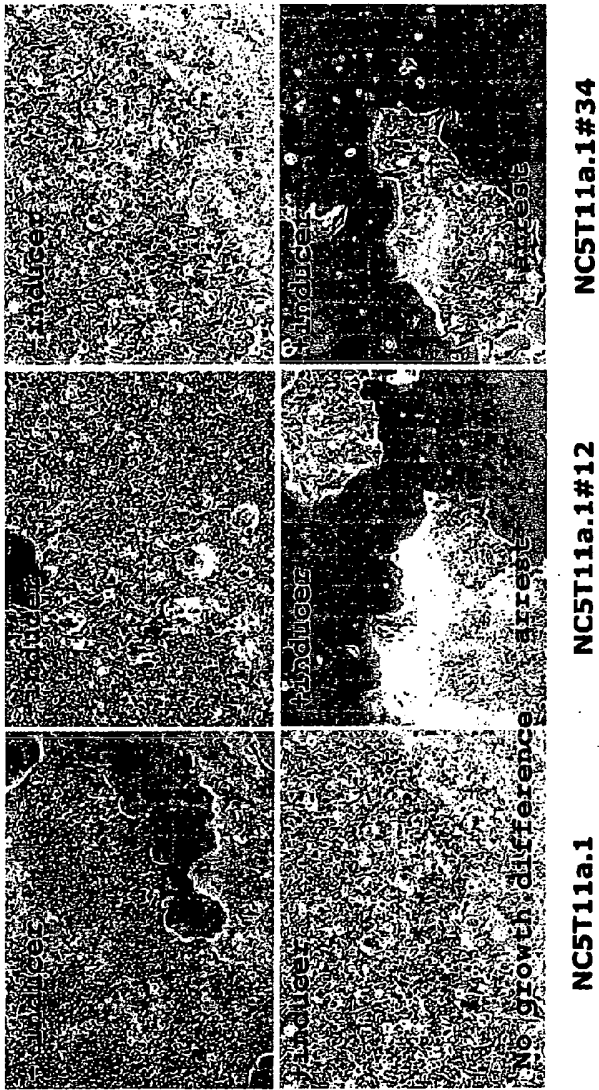


Fig. 8

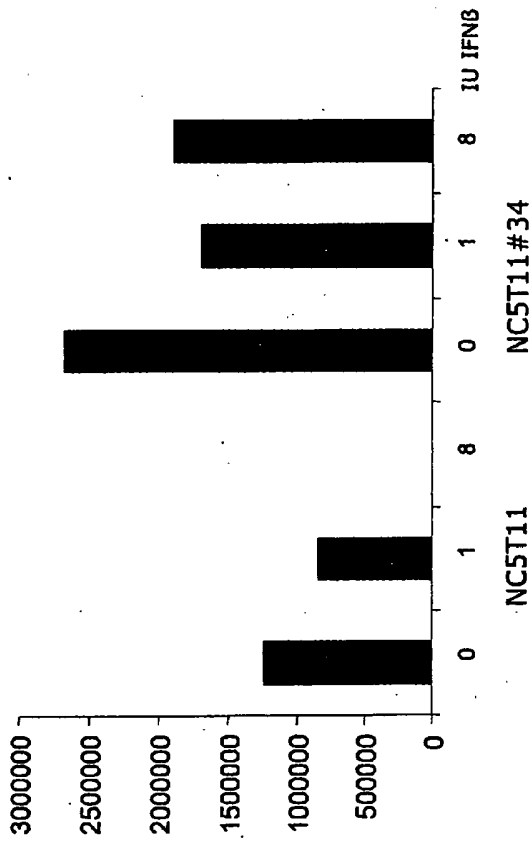


Fig. 9

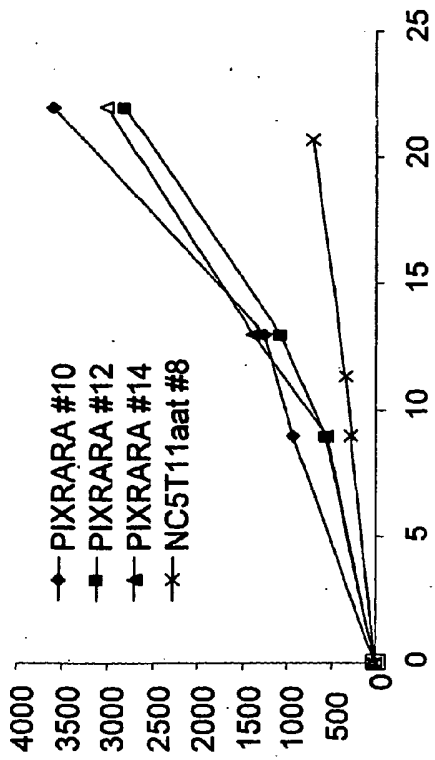


Fig. 10

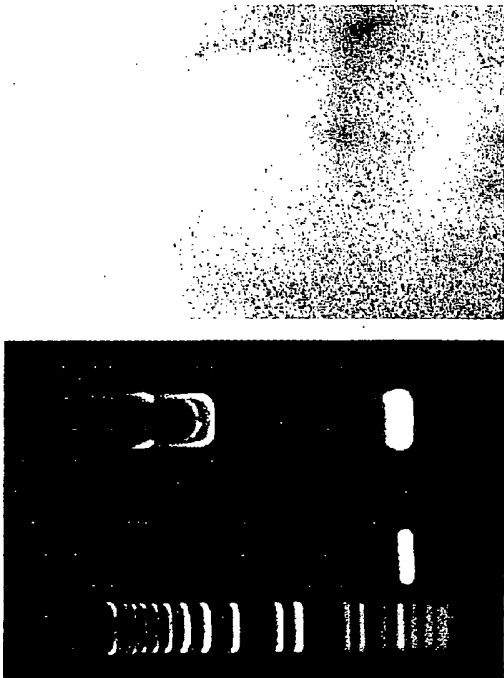


Fig. 11

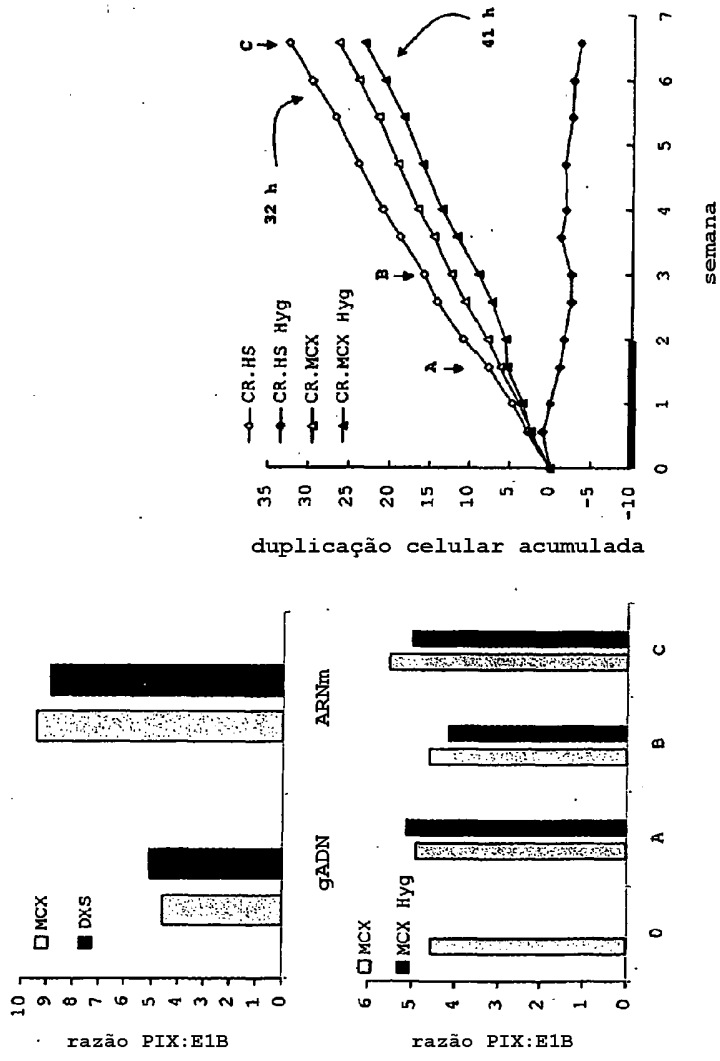


Fig. 12

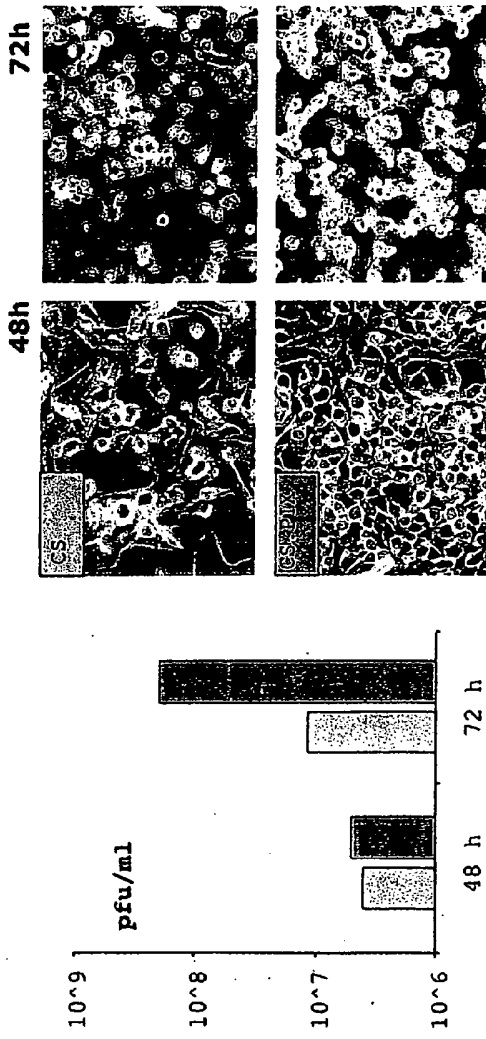


Fig. 13

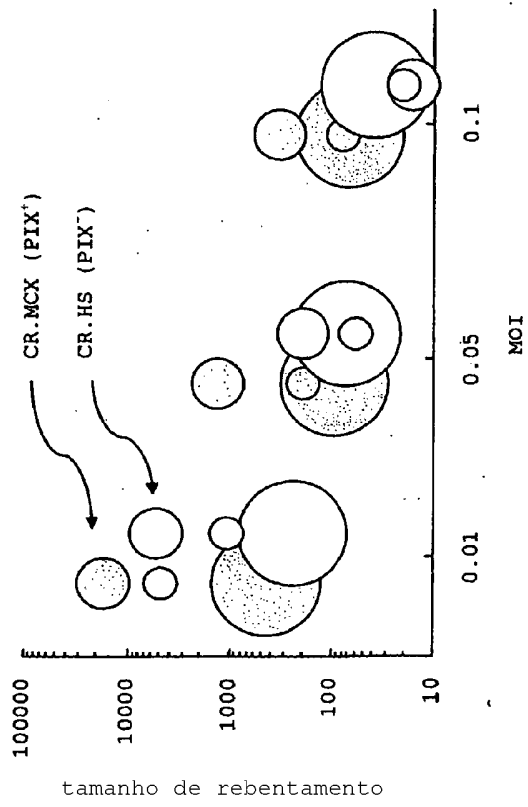


Fig. 14

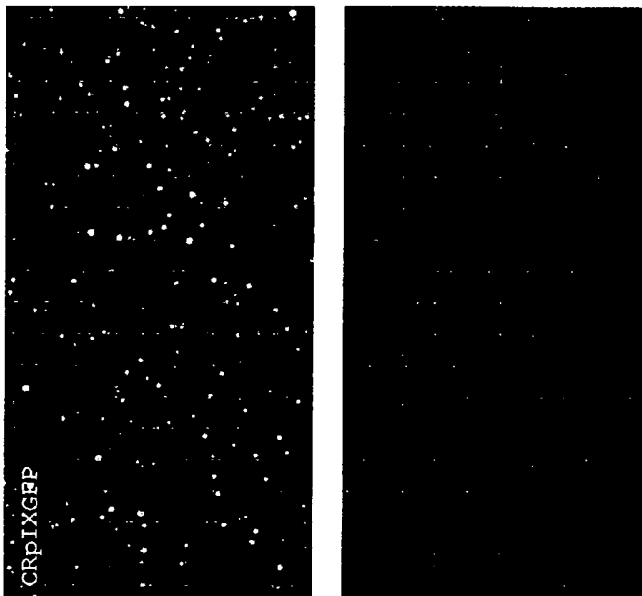


Fig. 15

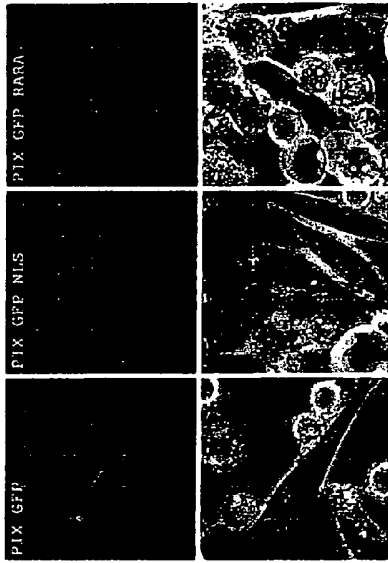


Fig. 16

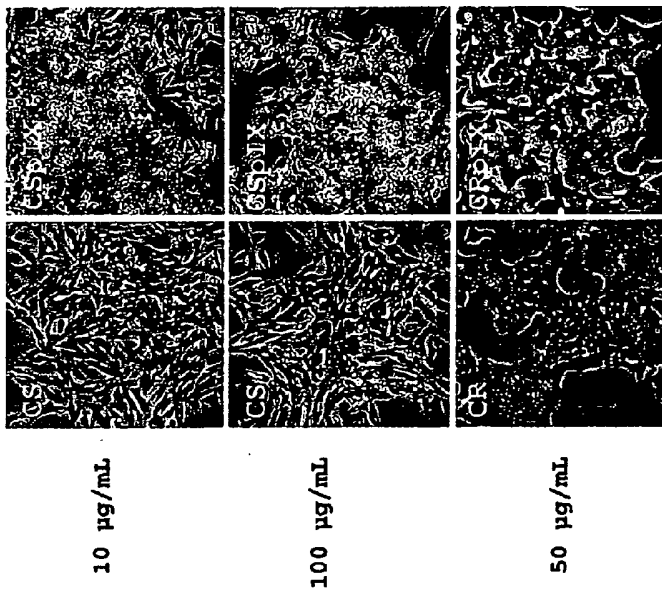


Fig. 17

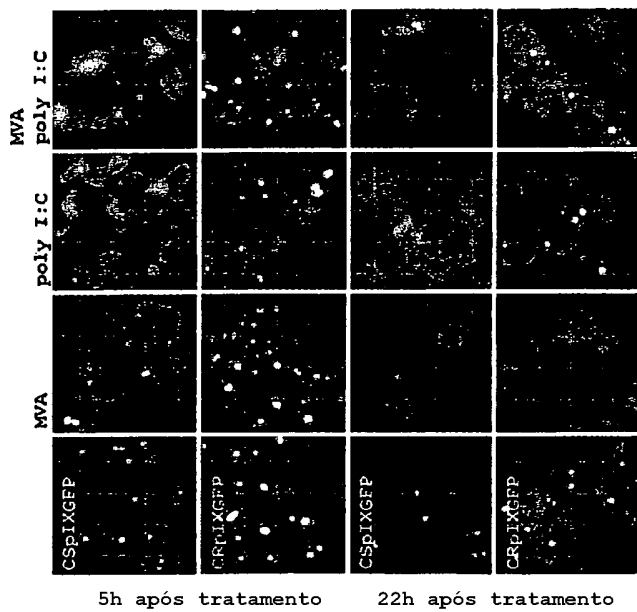


Fig. 18