

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 016**

21 Número de solicitud: 201330722

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

20.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2014

Fecha de la concesión:

02.09.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.09.2015

73 Titular/es:

**3P BIOPHARMACEUTICALS (100.0%)
Mocholi 2, Pol. Mocholi, Polígono Moncholí
31110 Noáin (Navarra) ES**

72 Inventor/es:

**ARANDA, Alejandro;
BEZUNARTEA BEZUNARTEA, Jaione;
SMERDOU PICAZO, Cristian;
MOLERO SÁNCHEZ, Dámaso;
MISTINIENE, Edita;
SOLDEVILA FÁBREGA, Andreu y
SERRANO PÉREZ-NIEVAS, Paula**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Vectores alfavirales y líneas celulares para la producción de proteínas recombinantes**

57 Resumen:

Vectores alfavirales y líneas celulares para la producción de proteínas recombinantes. La presente invención se relaciona con polinucleótidos y vectores alfavirales para la expresión de genes de interés en células de mamífero. Adicionalmente, la invención se relaciona con células que comprenden dichos polinucleótidos y vectores alfavirales, y que son capaces de expresar de forma estable uno o más genes de interés. La invención también se relaciona con métodos para obtener dichas células, con métodos para expresar un gen de interés en dichas células, y con métodos para reemplazar el gen de interés que dichas células expresan de forma estable por otro gen de interés.

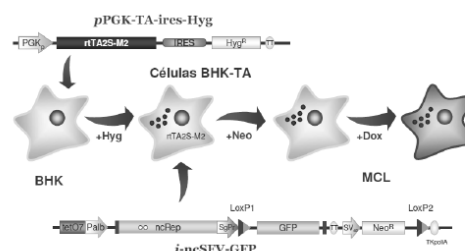


FIG. 1

ES 2 523 016 B1

DESCRIPCIÓN

VECTORES ALFAVIRALES Y LÍNEAS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de los vectores para la expresión de genes de interés en células de mamífero, concretamente, en el campo de los vectores
10 alfavirales. El uso de dichos vectores permite la generación de líneas celulares que expresan de forma estable un gen de interés.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las células de mamífero son el sistema de expresión más adecuado para la obtención de diferentes tipos de proteínas recombinantes, en especial aquellas proteínas destinadas a aplicaciones terapéuticas. Entre los vectores de expresión más eficaces para incorporar un gen de interés en una célula con el fin de expresar una proteína de interés se encuentran los vectores basados en alfavirus. Se han desarrollado vectores de expresión alfavirales a partir
20 de diferentes tipos de alfavirus, incluyendo el virus Sindbis (SIN), el virus del Bosque de Semliki (SFV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).

El replicón del alfavirus contiene en su extremo 5' un marco abierto de lectura que codifica la replicasa (Rep) vírica, que se traduce cuando el ARN viral se transfecta en células
25 eucariotas. La Rep se expresa como una poliproteína que se procesa, posteriormente, en cuatro subunidades (nsps 1 a 4). La Rep sin procesar puede copiar el vector de ARN en una cadena negativa de ARN, un proceso que sólo tiene lugar durante las primeras 3 a 4 horas tras la transfección o infección. Una vez procesada, la Rep utilizará el ARN de cadena negativa como molde para sintetizar más moléculas del replicón. La Rep procesada también
30 puede reconocer una secuencia interna en el ARN de cadena negativa, o promotor subgenómico, a partir del cual sintetizará un ARN de cadena positiva subgenómico que corresponde al extremo 3' del replicón. Este ARN subgenómico se traducirá para producir la proteína heteróloga en grandes cantidades.

35

Normalmente, los vectores de alfavirus están basados en replicones de ARN en los que los genes estructurales se han sustituido por un gen heterólogo. Sin embargo, la replicación de la mayoría de los vectores alfavirales es citopática, por lo que dichos vectores no permiten obtener una expresión duradera del gen de interés. Para solventar ese problema, varios grupos han identificado una serie de mutaciones en la replicasa de los alfavirus que pueden convertir esos vectores virales citopáticos en vectores virales no citopáticos, lo que permite una expresión más duradera de los productos recombinantes expresados por el vector viral. Estos estudios han conducido a la generación de diferentes vectores no citopáticos derivados de alfavirus.

Un mutante no citopático aislado de SIN, que contenía un sólo cambio de aminoácido (P por L) en la posición 726 en nsp2 (vector de SIN P726L en nsp2), mostró un hiperprocesamiento de la Rep (Frolov *et al.*, 1999, J. Virol. 73: 3854-65). Este mutante fue capaz de establecer replicación continua en células BHK de manera eficaz. Este vector no citopático de SIN se ha utilizado ampliamente *in vitro*, ya que es capaz de proporcionar una expresión duradera del transgén con buenos niveles de estabilidad y niveles de expresión que eran aproximadamente el 4% de los obtenidos con el vector de SIN original (Agapov *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 12989-94). No obstante, a pesar de que dicho vector no es citopático, carece de capacidad para generar líneas celulares estables con altos niveles de expresión.

Respecto a los mutantes no citopáticos de SFV descritos por Perri *et al.* (Perri *et al.*, 2000, J. Virol. 74: 9802-7), que incluyen los mutantes SF2A (mutación L10T en nsp2) y SF2C (mutación L713P en nsp2), así como el doble mutante PD (S259P y R650D en nsp2) descrito por Lundström *et al.* (Lundström *et al.*, 2001. Histochem. Cell. Biol. 115: 83-91), si bien pueden expresar niveles de proteína similares o incluso superiores a los del virus de tipo silvestre (mutante PD), en todos los casos esos mutantes continúan siendo citopáticos y no se ha descrito la generación de líneas celulares estables que expresen proteínas heterólogas basadas en dichos vectores virales.

La solicitud de patente WO2008065225 describe un vector SFV no citopático gracias a la presencia de las mutaciones R649H/P718T en la subunidad nsp2 de la replicasa. Dicho vector permite la obtención de líneas celulares capaces de expresar el gen de interés de forma constitutiva y estable mediante el cultivo en presencia de un antibiótico cuyo gen de resistencia está incorporado en el vector alfaviral (Casales *et al.* 2008. Virology. 376:242-51).

La utilización de vectores virales basados en replicones no citopáticos tiene asociado el inconveniente de que se pueden acumular mutaciones en el gen de interés, debido a que la replicasa viral, que carece de actividad correctora de errores, está constantemente copiando el ARN viral. Un segundo inconveniente de estos sistemas es el hecho de que no permiten la expresión de proteínas tóxicas para la célula ya que la expresión se produce de forma constitutiva. Finalmente en estos sistemas con frecuencia se observa una disminución en los niveles de expresión del gen de interés lo que puede deberse, en parte, a que la adaptación de las células a crecer en presencia del antibiótico, necesario para mantener la expresión del replicón alfaviral puede hacer que las células necesiten menos cantidad de replicón para sobrevivir. Estos problemas podrían solucionarse teóricamente mediante el diseño de un vector viral integrado en el genoma celular y en el que la expresión del replicón alfaviral pueda ser regulable mediante promotores inducibles u otros sistemas (WO9738087, WO2000006205 y WO2001081553). Sin embargo, no existen evidencias de que este tipo de vectores hayan permitido obtener una elevada expresión de las proteínas de interés de una forma sostenida en el tiempo. El uso de secuencias de ADN complementarias a las secuencias de ARN que constituyen el replicón alfaviral ha permitido diseñar vectores alfavirales que permitan la integración del gen de interés en el genoma celular, favoreciendo de este modo la obtención de una línea celular capaz de expresar de forma estable el gen de interés sin necesidad de añadir un antibiótico. Sin embargo, las líneas celulares obtenidas mediante estos vectores con frecuencia muestran una gran variabilidad en los niveles de expresión de las proteínas de interés, así como, en su caso, en la inducibilidad de la expresión de estas proteínas, probablemente debido a diferencias en el sitio de integración y el número de integraciones en el genoma celular, por lo que es necesario el aislamiento y selección de aquellos clones con características óptimas.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un sistema de expresión de genes de interés en células de mamífero que permita la expresión de dichos genes de forma estable y en cantidades elevadas, de forma que sea adecuado para la producción a gran escala de proteínas recombinantes.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un nucleótido que comprende

(i) una secuencia reguladora de la transcripción,

- (ii) una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus que se encuentra operativamente unida a dicha secuencia reguladora de la transcripción y en donde dicha secuencia complementaria del replicón del alfavirus comprende una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada entre el promotor subgenómico del replicón del alfavirus y la secuencia 3' no traducida del replicón del alfavirus,
- (iii) una secuencia de terminación de la transcripción en posición 3' con respecto al extremo 3' de la secuencia complementaria a un replicón de un alfavirus y
- (iv) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada en posición 3' respecto a la secuencia de terminación de la transcripción.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende el polinucleótido del primer aspecto.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una célula eucariota que comprende el polinucleótido del primer aspecto o el vector de expresión del segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con una célula eucarita que comprende el polinucleótido del primer aspecto en donde dicho polinucleótido se encuentra integrado en su genoma.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés que comprende

- (i) poner en contacto una célula con un polinucléotido el primer aspecto, en donde dicho polinucléotido comprende adicionalmente dicho gen de interés unido operativamente al promotor subgenómico del replicón, o con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido y
- (ii) seleccionar las células que han incorporado dicho polinucléotido o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende una secuencia de ADN que comprende, ordenados en la dirección 5' a 3',

- (i) una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio,
- (ii) una secuencia de un gen de interés,

- (iii) una secuencia 3' necesaria para la replicación de un alfavirus,
- (iv) una secuencia de terminación de la transcripción,
- (v) una secuencia de un gen de selección unida operativamente a un promotor y
- (vi) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés que comprende las etapas de:

- (i) introducir en una célula según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 49 un vector de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 62 a 73, en donde:

- (a) dicha célula comprende una secuencia heteróloga en posición 3' respecto al promotor subgenómico del replicón, en donde dicha secuencia heteróloga es una secuencia de un gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico, o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido,

- (b) la primera secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la primera secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector,

- (c) la segunda secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la segunda secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector

- (d) la célula expresa una recombinasa específica de dichas primeras y segundas secuencias de reconocimiento y,

- (e) la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus presente en el vector coincide con la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus que forma parte del replicón alfaviral,

- (ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir la sustitución mediante recombinación específica del gen de interés que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus por el gen de interés que forma parte del vector de acuerdo a las reivindicaciones 61 a 71 y

- (iii) seleccionar las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Generación de una línea celular maestra (MCL) que porta un vector no citopático inducible del virus del Bosque de Semliki (SFV) que expresa GFP.

Se transfectaron células BHK con un plásmido que expresa constitutivamente el activador transcripcional rtTA2S-M2 unido al gen de resistencia a higromicina (Hyg^R) mediante un una secuencia IRES (pPGK-TA-ires-Hyg, diagrama superior). Tras la selección con higromicina se transfectó un clon seleccionado con un plásmido que contiene el vector no citopático inducible de SFV que expresa GFP (i-ncSFV-GFP) y un gen de resistencia a neomicina (Neo^R) (diagrama inferior). En este vector la secuencia de ncSFV se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor mínimo de albúmina (Palb) fusionado con un elemento de respuesta a tetraciclina (tetO7), mientras que la secuencia de GFP se encuentra localizada tras el promotor subgenómico de SFV (SgPr). Se insertaron sitios mutantes LoxP en posición 5' del gen GFP (LoxP1) y en posición 3' del gen Neo^R (LoxP2), respectivamente. Las células fueron seleccionadas con neomicina, clonadas mediante dilución terminal y analizadas para determinar su inducibilidad, expresión de GFP, y ausencia de expresión en condiciones de no inducción, obteniéndose la línea maestra MCL. PGK_p, promotor de la fosfoglicerato kinasa; ncRep, replicasa no citopática de SFV; SV₄₀, promotor del virus de simio 40 (SV40); TT, Secuencia de terminación de la transcripción y de poliadenilación de SV40; TKpoliA, secuencia de terminación de la transcripción y de poliadenilación del gen de la timidina kinasa.

Figura 2. Determinación del sitio de la iniciación de la transcripción a partir del promotor mínimo inducible de albúmina.

Para determinar exactamente el nucleótido donde comienza la transcripción a partir del promotor tetO7-pAlb se utilizó el kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen, Carlsbad, CA). De forma breve, los plásmidos piPalb-GFP-172, -173 y -174 fueron contruidos tal y como se describe en Materiales y Métodos y se cotransfectaron con un plásmido que expresaba el activador transcripcional rtTA2sM2 bajo el control del promotor constitutivo PGK (PGK-rtTA-pA60, cedido amablemente por el Dr. Rubén Hernandez-Alcoceba, CIMA, Pamplona). Tras 24h de inducción con 2 µg/mL doxiciclina (DOX), se aisló el ARN celular total y se sintetizó la primera cadena del ADNc utilizando el oligonucleótido 42 (Tabla 4). Se eliminó el ARN molde así como los dNTPs no incorporados, el oligonucleótido y las proteínas y se añadió una cola de poliC al extremo 3' del ADNc usando la deoxinucleotidil-transferasa terminal y dCTP. Este ADNc fue amplificado mediante PCR con Taq ADN polimerasa, usando un oligonucleótido anidado (oligonucleótido 46), y un oligonucleótido de deoxiinosina

suministrado con el kit. La PCR fue diluida 10 veces y utilizada como molde para dos PCR anidadas consecutivas usando el “*Universal Amplification primer*” (suministrado con el kit) y los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 (oligonucleótidos 47 y 48). Tras las amplificaciones se obtuvo una única banda que se clonó en el vector pGEM-T-easy (Promega). Se secuenciaron varios clones de cada construcción y el extremo 5’ fue determinado para cada uno de ellos. Las secuencias sobre las fotografías indican el extremo 3’ del promotor mínimo pAlb (mpAlb). Las secuencias bajo las fotografías indican los nucleótidos del extremo 3’ de Palb (en negrita) y los nucleótidos del extremo 5’ de SFV (ATG) que estaban presentes en el extremo 5’ de los ARN transcritos. El primer número indica el comienzo de la transcripción con respecto al primer nucleótido de SFV. Entre paréntesis: número total de clones que comienzan en la posición 1 de SFV/número total de clones secuenciados, seguido del porcentaje de clones que comienzan en el primer nucleótido de SFV. pCMV-GFP, plásmido que contiene la secuencia de GFP tras el promotor CMV promoter, usado como control (Clontech). TT, Secuencia de terminación de la transcripción y de poliadenilación de SV40.

Figura 3. Cinética de expresión de GFP en MCL. (A y B) Se incubó la MCL con 2 µg/mL de DOX a 33°C o 37°C, y se analizó la presencia de células GFP positivas a los tiempos indicados mediante FACS **(A)** y microscopio de fluorescencia **(B)** usando células incubadas sin DOX como control. **(C)** Se analizaron los lisados celulares mediante Western blot con anticuerpos específicos para GFP, replicasa y actina. **(D)** La MCL se plaqueó a una densidad de 0.5×10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 24h se incubaron las células con DOX a las concentraciones y tiempos indicados. Tras 5 días el porcentaje de células positivas para GFP se analizó mediante FACS. Los resultados mostrados en A y B son la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes utilizando los pases 3, 5 y 7. Los resultados mostrados en B y C corresponden a células analizadas en pase 4. Ind., inducidas; No ind, No inducidas.

Figura 4. Cinética de la replicación de SFV. Se extrajo el ARN total de la MCL incubada a 33° o 37° con o sin DOX a 1.25 µg/mL DOX durante los tiempos indicados. Los niveles de ARN de ncSFV-GFP se determinaron mediante RT-PCR a tiempo real tal y como se describe en Materiales y Métodos. Ind., inducidas; No ind, No inducidas.

Figura 5. Estabilidad de la expresión de GFP. Se pasó la MCL 50 veces cada 48h con o sin los antibióticos de selección (neomicina e higromicina). A los pases indicados las células fueron incubadas durante 120h con 1.25 µg/mL DOX (Ind.) or sin DOX (No ind.) y se evaluó

la expresión de GFP mediante FACS **(A)** y Western blot con un anticuerpo específico contra GFP **(B)**. ct, línea estable que expresa GFP de forma constitutiva a partir del vector de ARN ncSFV-pac2A-GFP.

5 **Figura 6.** Cinética de expresión de GFP en una línea inducible convencional. Se obtuvo una línea BHK que expresaba de forma constitutiva el transactivador rtTA2S-M2 y que contenía el gen GFP tras el control transcripcional del promotor tetO7-PAIb y se trataron las células con 2 µg/mL DOX o sin DOX a 33°C. Los lisados celulares se analizaron a los tiempos indicados mediante Western blot usando un anticuerpo contra GFP y actina. MCL(+), MCL
10 incubada durante 5 días con DOX.

Figura 7. Intercambio de transgén mediado por recombinasa Cre. **(A)** Representación esquemática del proceso de selección de nuevas líneas celulares. Para generar una línea estable que expresa el gen de interés (GOI), se cotransfectó la MCL con un plásmido que
15 codificaba la recombinasa Cre (pCMV-CRE) y con un plásmido pSFV-Shuttle que portaba el gen de interés (pShuttle-SFV-GOI). Tras la recombinación mediada por Cre, el gen GFP es sustituido por el gen GOI, y las células se hacen sensibles a neomicina y resistentes a puromicina, que puede ser usada para seleccionar la nueva línea celular. **(B)** Evaluación de intercambio de transgenes usando el gen Tomato como GOI. Se transfectó la MCL con 1 µg
20 de pCMV-CRE y 2 µg pShuttle-SFV-Tomato. Tras 24h se añadió puromicina a una concentración final de 5 µg/mL y se seleccionaron las células hasta alcanzar confluencia. Una vez seleccionada la nueva MCL se evaluó para determinar la expresión de GFP y Tomato mediante fluorescencia (usando el filtro indicado) tras la inducción con DOX a una concentración de 1.25 µg/mL durante 5 días, usando la MCL como control. sg, promotor
25 subgenómico; EF1α, promotor del factor de elongación-1 alfa.

Figura 8. Generación y caracterización de líneas estables que expresan CT-1. **(A)** Diagrama del vector pShuttle-SFV con la secuencia de CT-1 (pShuttle-SFV-CT1). En este vector, la CT-1 está fusionada en fase con el péptido señal de preprotipsina (SP) y con una
30 secuencia que codifica una cola de 6 histidinas en el extremo amino-terminal (His). **(B y C)** Análisis de expresión de CT-1 en tres clones seleccionados (CT1-A, CT1-B and CT1-C) obtenidos tras el intercambio mediado por Cre. Los clones CT-1 fueron pasados 10 veces en ausencia de antibióticos de selección y se analizó la expresión de CT-1 en los sobrenadantes recogidos 120h tras la inducción con DOX, o sin inducción, mediante
35 Western blot con un antisuero específico para CT-1 **(B)** y mediante ELISA específico de CT-1 **(C)**. **(D)** Se ensayó la citotoxicidad tras la expresión de proteína mediante tinción de cristal

violeta a los tiempos indicados. El efecto citopático se cuantificó midiendo la intensidad de la tinción en cada placa con el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, EEUU), considerando la intensidad en los pocillos no inducidos como del 100%. *recCT*, 50 ng de CT-1 recombinante comercial expresada en *E. coli*.

5

Figura 9. Generación y caracterización de líneas estables que expresan la oncostatina M humana (OSM). **(A)** Diagrama del vector pShuttle-SFV con la secuencia de OSM (pShuttle-SFV-OSM). En este vector, la OSM está fusionada en fase con el péptido señal de preprotripsina (SP) y con una secuencia que codifica una cola de 6 histidinas en el extremo amino-terminal (His). **(B and C)** Análisis de expresión de OSM en tres clones seleccionados (OSM-A, OSM-B and OSM-C), obtenidos tras el intercambio mediado por Cre. Los clones OSM fueron pasados 10 veces en ausencia de antibióticos de selección y se analizó la expresión de OSM en los sobrenadantes recogidos 96h tras la inducción con DOX, o sin inducción, mediante Western blot con un antisuero específico para OSM **(B)** y mediante ELISA específico de OSM **(C)**. **(D)** Se ensayó la citotoxicidad tras la expresión de proteína mediante tinción de cristal violeta a los tiempos indicados y se cuantificó tal y como se ha descrito en la figura 8D. *recOSM*, 50 ng de OSM recombinante comercial expresada en *E. coli*.

10

15

20

Figura 10. Cinética de inducción y determinación de la actividad biológica de CT-1 y OSM. Para determinar la cinética de expresión de CT-1 y OSM se indujeron los clones seleccionados durante 5 días a 33°C con 2.5 µg/mL DOX, se recogieron los sobrenadantes cada 24h y se midió la cantidad de proteína recombinante secretada mediante un ELISA específico **(A and C)**. La actividad funcional de la CT-1 y de la OSM presentes en los sobrenadantes de los clones y pases indicados se evaluó mediante su capacidad para inducir la fosforilación de STAT3 en células HepG2 (para CT-1) **(B)** o Huh7 (para OSM) **(D)**. *rec*, proteínas recombinantes comerciales producidas en bacteria. Control de carga, banda inespecífica presente en todas las muestras.

25

30

Figura 11. Evaluación de la toxicidad de OSM en células BHK. Se sembraron células BHK en placas de 24 pocillos con 1×10^5 células/pocillo y 24h más tarde se trataron con las concentraciones indicadas de OSM. A los tiempos indicados se lavaron las células con PBS y las que permanecían adheridas se tiñeron con cristal violeta (Sigma, St. Louis, MO, USA). La cantidad de células adheridas fue determinada disolviendo el colorante con ácido acético al 10% y midiendo la absorbancia a 595 nm. El porcentaje de supervivencia se calculó como el porcentaje de absorbancia relativo al de células que no se incubaron con OSM.

35

Figura 12. Expresión de un anticuerpo monoclonal (mAb) en líneas celulares inducibles. (A) Diagrama del vector pShuttle-SFV con la secuencia del mAb A20 (pShuttle-SFV-A20). **(B)** Análisis de la expresión del mAb A20 después de inducir con DOX. Las bandas obtenidas por Western blot (muestras cargadas sin DTT) fueron analizadas por densitometría y cuantificadas, utilizando las bandas generadas a partir de mAb A20 purificado a partir de un hibridoma (A20 hybrid) para generar una curva estándar. SgPr, promotor subgenómico de SFV; LC cadena ligera de A20; HC, cadena pesada de A20.

Figura 13. Cinética de expresión en líneas celulares adaptadas a crecer en suspensión. (A) La MCL adaptada a crecer en suspensión (S-MCL), se incubó con 2 µg/mL de DOX (+) o sin DOX (-) a 33°C, y se analizó la expresión de GFP en los lisados celulares a los tiempos indicados mediante Western blot. MCL, células MCL adherentes incubadas durante 5 días con DOX. **(B)** La línea OSM-A se adaptó a crecer en suspensión, se indujo con DOX como se ha descrito, y se evaluó la expresión de OSM en el sobrenadante mediante un ELISA específico a los tiempos indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han diseñado un vector que comprende una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus en el que se ha incorporado una secuencia de un gen de interés junto con secuencias de reconocimiento para recombinación específica de sitio. Mediante dicho vector es posible la obtención y selección de células en las que el replicón alfaviral, que incluye la secuencia del gen de interés, se ha integrado en el genoma celular, de forma que las células expresan de forma estable el gen de interés (ejemplo 2). Adicionalmente, los autores de la presente invención han generado un vector de expresión como el descrito en el que el replicón alfaviral está bajo el control de un promotor inducible. Dicho vector se ha incorporado a células que adicionalmente se han modificado mediante la incorporación de un casete de expresión que codifica un activador transcripcional que, en presencia de un determinado ligando, es capaz de regular positivamente la actividad del promotor que regula la transcripción del replicón del alfavirus (ejemplo 1). De este modo se ha obtenido una línea celular que es capaz de expresar de forma inducible un gen de interés, evitando de esta forma tanto la acumulación de mutaciones en el gen de interés como el desarrollo de resistencia a antibióticos de selección, lo que conduciría a una disminución en la expresión del gen de interés a lo largo del tiempo. Mediante este sistema de expresión, los autores de la presente invención han observado que es posible la obtención de células que expresan la proteína GFP de forma

estable a diferentes tiempos de inducción (Figura 3) y a lo largo de sucesivas rondas de amplificación (Figura 5).

Adicionalmente, la presencia de los sitios de recombinación flanqueando la secuencia del gen de interés permite que, una vez que el casete de expresión alfaviral se ha incorporado en el genoma celular, dicho gen de interés sea intercambiable por un segundo gen de interés mediante recombinación o RMCE (del inglés, *recombinase-mediated cassette exchange*). De esta forma, una vez que se dispone de una línea celular que expresa de forma óptima un gen de interés (es decir, una línea celular que, en condiciones de inducción, es capaz de expresar de forma estable y a elevados niveles dicho gen de interés), no es necesario generar y seleccionar nuevas líneas celulares para la expresión de nuevos genes de interés, sino que la transfección de la primera línea celular con un vector lanzadera que comprende la secuencia del segundo gen de interés flanqueada por las secuencias de recombinación adecuadas, permitirá reemplazar el primer gen de interés por el segundo gen de interés mediante recombinación (ejemplos 4 a 7).

Siguiendo esta metodología, los autores de la presente invención han generado una línea celular BHK en cuyo genoma se ha integrado un casete de expresión alfaviral que comprende la secuencia del gen de la GFP bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina y flanqueado por sitios de recombinación LoxP. A partir de esta línea celular, denominada "línea celular maestra" o "MCL", se han obtenido líneas derivadas que expresan de forma estable las proteínas cardiotrofina-1 humana (figura 8B y 8C), oncostatina M humana (figura 9B y 9C) o las cadenas ligera y pesada del anticuerpo idiotípico A20 (figura 12B), mediante la transfección de la línea MCL con vectores lanzadera que incluyen las secuencias de cada uno de estos genes (figuras 8A, 9A y 12A respectivamente).

En base a estos descubrimientos se han desarrollado los siguientes aspectos inventivos.

Polinucleótido de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, en adelante polinucleótido de la invención, que comprende

- (i) una secuencia reguladora de la transcripción,
- (ii) una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus, en donde dicha secuencia se encuentra operativamente unida a dicha secuencia reguladora de la transcripción y, en donde la secuencia complementaria del

replicón del alfavirus comprende una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada entre el promotor subgenómico del replicón del alfavirus y la secuencia 3' no traducida del replicón del alfavirus

(iii) una secuencia de terminación de la transcripción en posición 3' con respecto al extremo 3' de la secuencia complementaria a un replicón de un alfavirus y

(iv) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada en posición 3' respecto a la secuencia de terminación de la transcripción.

El término "polinucleótido", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos.

Secuencia reguladora de la transcripción

El primer elemento del polinucleótido de la invención comprende una secuencia reguladora de la transcripción.

El término "secuencia reguladora de la transcripción", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción de uno o más polinucleótidos que se encuentran aguas abajo de dicha secuencia reguladora de la transcripción. La secuencia reguladora de la transcripción comprende un promotor y opcionalmente puede comprender elementos reguladores como elementos de respuesta a un agente inductor o elementos potenciadores o "*enhancer*".

El término "promotor", tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se caracteriza estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN incluyendo, pero sin limitarse a, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocidas en el estado de la técnica capaces de regular directa o indirectamente la transcripción a partir de un promotor.

El término "unido operativamente", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a la relación funcional de una secuencia con una secuencia promotora. De esta forma, una secuencia está unida operativamente a un promotor si dicho promotor afecta a la transcripción de dicha secuencia. Generalmente, la secuencia de un gen es contigua a la

secuencia del promotor al cual está operativamente unida. En el polinucleótido de la invención, la secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus está unida operativamente a un promotor, es decir, dicho promotor regula la transcripción de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus.

5

La “secuencia reguladora de la transcripción” que forma parte del polinucleótido de la invención y está unida operativamente a la secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus puede tener actividad constitutiva o actividad regulable.

10 El término “secuencia reguladora de la transcripción de actividad constitutiva” o “promotor constitutivo”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia reguladora o a un promotor cuya actividad se mantiene a un nivel relativamente constante en todas las células de un organismo o durante la mayoría de las etapas de desarrollo, con poca o ninguna consideración a las condiciones ambientales de la célula.

15

El término “secuencia reguladora de la transcripción de actividad regulable” o “promotor regulable”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier secuencia de ADN que es capaz de promover la transcripción de un polinucleótido localizado en la posición 3' en presencia de un compuesto o ciertas condiciones. Preferiblemente, los
 20 promotores regulables que pueden ser utilizados en el contexto del polinucleótido de la invención son los que responden a un agente inductor, que muestran una expresión basal nula o insignificante en la ausencia de dicho agente inductor y que son capaces de promover la activación de la transcripción de la secuencia situada en posición 3', es decir, la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus. Dependiendo del tipo de agente
 25 inductor, los promotores inducibles se clasifican en promotores Tet on/off (Gossen, M. y H. Bujard, 1992, Proc Natl Acad Sci, 89: 5547-5551; Gossen, M. *et al.*, 1995, Science 268: 1766-1769); Rossi, F.M.V. y Blau H.M., 1998, Curr Opin Biotechnol 9: 451-456); promotores PIP ON/OFF (US6287813); promotores dependientes de antiprogesterina (US2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci, 89:
 30 6314-6318; No *et al.*, 1996, Proc Natl Acad Sci, 93: 3346-3351, Suhr *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 7999-8004 y WO9738117), promotores dependientes de metalotioneína (WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera *et al.*, 1996, Nat.Med.2:1028-32).

Una “secuencia reguladora de la transcripción de actividad inducible” o “promotor inducible” es una secuencia o promotor que está regulado fisiológicamente o en relación al desarrollo, por ejemplo mediante la aplicación de un inductor químico.

- 5 En una forma de realización, la secuencia reguladora de la transcripción comprende un promotor específico de tejido, preferiblemente un promotor específico de hígado. Un promotor “específico de tejido” es un promotor activo sólo en tipos específicos de tejidos o células, es decir, un promotor que es más activo en uno o varios (por ejemplo dos, tres o cuatro) tejidos particulares que en otros tejidos (es decir, es capaz de llevar a niveles más
10 altos la expresión de una secuencia codificante a la que está operativamente unido en el tejido(s) para el que es específico comparado con cualquier otro). Típicamente, el gen situado en posición 3' de un promotor “específico de tejido” es un gen que es activo a un nivel mucho más alto en el/los tejido(s) para el que es específico dicho promotor que en ningún otro tejido. En este caso, puede haber poca o sustancialmente ninguna actividad del
15 promotor en otro tejido diferente de aquel(los) para el que es específico.

- En el contexto de esta invención, un “promotor específico de hígado” es un promotor que es más activo en hígado comparado con su actividad en cualquier otro tejido del cuerpo. Típicamente, la actividad de un promotor específico de hígado será considerablemente
20 mayor en hígado que en otros tejidos. Por ejemplo, tal promotor puede ser al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 ó al menos 10 veces más activo (por ejemplo determinado mediante su capacidad de dirigir la expresión en un tejido determinado al tiempo que previene la expresión en otras células o tejidos. Según esto, un promotor específico de hígado permite una expresión activa del gen unido en el hígado y previene la expresión en
25 otras células o tejidos.

- Los promotores específicos de hígado adecuados incluyen, sin limitación, un promotor de α 1-anti-tripsina (AAT), un promotor de globulina de unión a hormona tiroidea, un promotor de alfa fetoproteína, un promotor de alcohol deshidrogenasa, un promotor de IGF-II, el promotor
30 del factor VIII (FVIII), un promotor de núcleo básico (BCP) de HBV y promotor PreS2, un promotor de albúmina, un promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG), un promotor de híbrido región de control hepática (HCR)-ApoCII, un promotor híbrido HCR-hAAT, un promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de la albúmina de ratón (Ealb), un promotor de apolipoproteína E, un promotor de lipoproteína de baja densidad, un
35 promotor de piruvato quinasa, un promotor de fosfenol piruvato carboxiquinasa, un promotor de lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT), un promotor de apolipoproteína H (ApoH), el

promotor de la transferrina, un promotor de transtiretina, promotores de alfa-fibrinógeno y beta-fibrinógeno, un promotor de alfa 1-antiquimiotripsina, un promotor de glicoproteína alfa 2-HS, un promotor de haptoglobina, un promotor de ceruloplasmina, un promotor de plasminógeno, promotores de las proteínas del complemento (Clq, Clr, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, factor I y factor H del complemento), promotor del activador del complemento C3 y de la glicoproteína α 1-ácida. Se pueden encontrar promotores específicos de tejido adicionales en Tissue-Specific Promoter Database, TiProD (Nucleic Acids Research, J4:D104-D107 (2006)).

En una realización particular, el promotor específico de hígado es el promotor del gen de albúmina descrito por Kramer *et al.* (2003. Mol. Ther. 7, 375–85) o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Por “variante funcionalmente equivalente del promotor del gen de albúmina” se entiende cualquier promotor que tiene una identidad de secuencia mínima con el promotor del gen de albúmina, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, aún más preferiblemente al menos un 90%; todavía más preferiblemente al menos un 99%, y es capaz de llevar a cabo la misma función que dicho promotor, es decir, es capaz de promover la transcripción del gen de albúmina cuando la secuencia de dicho gen está operativamente unida a dicho promotor.

En una forma de realización preferida, el promotor específico de hígado es un promotor inducible específico de hígado, por ejemplo, un promotor específico de hígado inducible por tetraciclina tal como el promotor descrito por Wang *et al.* (Nature Biotech., 1997; 15:239-43), el promotor específico de hígado inducible por mifepristona (RU-486) descrito por Burcin *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96:355-60), el promotor específico de hígado regulable por tetraciclina descrito por Manickan *et al.* (J. Biol. Chem., 2001, 276:13989-13994), los promotores descritos por Han *et al.* (Molecular Therapy, 2005, 11, S161), el sistema de expresión de adenovirus regulado por tetraciclina para distribución *in vivo* al hígado descrito por Tietge *et al.* (J.Gen.Medicine, 2003, 5:567-575), el promotor específico de hígado inducible por mifepristona descrito por Crettaz *et al.* (Molecular Therapy (2006) 13, S224) y similares.

En una realización preferida, la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus tiene una actividad regulable.

En una realización particular, la secuencia reguladora de la transcripción comprende adicionalmente un elemento de respuesta a un agente inductor.

- 5 El término “elemento de respuesta a un agente inductor” se refiere a uno o más elementos de ADN que actúan en cis y que confieren a un promotor la capacidad de activar la transcripción en respuesta a la interacción de dicho elemento con los dominios de unión de ADN de un factor de transcripción o de un transactivador cuya actividad transcripcional se induce en presencia del agente inductor, normalmente a consecuencia de un cambio
10 conformacional en el transactivador resultante de la unión al agente inductor. Por tanto, la expresión “elemento de respuesta a un agente inductor” debe de entenderse como elemento de respuesta a un activador transcripcional en presencia de un agente inductor. El dominio de unión de ADN del factor de transcripción o del transactivador es capaz de unirse, en presencia o ausencia del agente activador, a la secuencia de ADN del elemento de
15 respuesta para iniciar o inhibir la transcripción de genes situados en posición 3’ con respecto al promotor. El término “elemento de respuesta” se usa indistintamente con “elemento de respuesta transcripcional” o TRE (transcriptional response element).

- En una forma preferida de realización, el elemento de respuesta a un agente inductor es un
20 elemento de respuesta a un ligando. En una forma de realización aún más preferida, el elemento de respuesta a un ligando es un elemento de respuesta a un transactivador activable por antibióticos, preferiblemente un elemento de respuesta a tetraciclina o un análogo de tetraciclina y, aún más preferiblemente, un elemento de respuesta a tetraciclina o un análogo de tetraciclina que comprende un número variable de copias de la secuencia
25 operadora de 42 pares de bases (denominado TetO) tal y como fue descrita originalmente en Baron et al. (Nucleic Acids Res., 1995, 17:3605-3606). El número de copias del TetO puede ser de al menos 2, al menos 5 o, preferiblemente, no más de 7. Este tipo de elementos de respuesta a tetraciclina puede activar la transcripción de forma bidireccional en presencia del transactivador reverso activado por tetraciclina (o su análogo doxiciclina)
30 según fue descrito originalmente por Gossen *et al.* (Science, 1995, 278:1766-1769). En una forma preferida de realización, el elemento de respuesta a transactivador+tetraciclina comprende 7 copias de la secuencia operadora, en cuyo caso se denomina TetO7. En una forma aún más preferida, la secuencia reguladora de la transcripción, formada por el conjunto de promotor-operador, comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4.

35

En una realización preferida, el promotor regulable se debe colocar en una posición tal que la transcripción se inicia en el primer nucleótido de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus. En una realización particular, el promotor regulable es el promotor mínimo de albúmina que comprende el elemento de respuesta a tetraciclina TetO7, descrito por Zabala *et al.* (Zabala *et al.*, 2004, Cancer Research, 64: 2799-2804) y cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, con el fin de que la transcripción se inicie en el primer nucleótido de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus, el promotor no comprende los últimos 22 nucleótidos de la SEQ ID NO: 4. En una realización particular, el promotor comprende una secuencia igual a los primeros 467 nucleótidos de SEQ ID NO: 4, es decir, el promotor comprende la secuencia SEQ ID NO: 5. En otra realización particular, el promotor comprende la secuencia SEQ ID NO: 6. En otra realización particular, el promotor comprende la secuencia SEQ ID NO: 7. En otra realización particular, el promotor comprende la secuencia SEQ ID NO: 8. En una realización preferida, el promotor comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 pero no comprende la secuencia SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, el promotor consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8.

Secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus que comprende una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio

El segundo elemento del polinucleótido de la invención comprende una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus que se encuentra operativamente unida a dicha secuencia reguladora de la transcripción.

El término “secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia de ADN que es complementaria a la secuencia de ARN de un replicón de un alfavirus.

El término “replicón de un alfavirus”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polinucleótido de ARN que expresa las proteínas estructurales y no estructurales del alfavirus del que deriva que permiten que dicho ARN dirija su propia replicación al ser introducido en una célula receptora. Típicamente, el replicón del alfavirus comprende los siguientes elementos, ordenados desde el extremo 5' al 3':

- Una secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus,

- Una secuencia nucleotídica que codifica una poliproteína que comprende las secuencias de las proteínas no estructurales nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4 de un alfavirus, denominada poliproteína no estructural,
 - Un promotor subgenómico del alfavirus
- 5 - Una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus, incluyendo una secuencia de poliadeninas.

El término “alfavirus”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier virus de ARN del género alfaviridae. Una descripción de miembros del género alfaviridae se puede encontrar en Strauss and Strauss, Microbiol. Rev., 58:491-562 (1994). Ejemplos de alfavirus incluyen, sin limitación, el virus Aura, el virus Bebaru, el virus Cabassou, el virus Chikungunya, el virus de la encefalomiелitis equina oriental, el virus Fort Morgan, el virus Getah, el virus Kyzylagach, el virus Mayoaro, el virus Middleburg, el virus Mucambo, el virus Ndumu, el virus Pixuna, el virus Tonate, el virus Trinit, el virus de la encefalomiелitis equina occidental, el virus Whataroa, el virus Sindbis (SIN), el virus del Bosque de Semliki o SFV (del inglés, *Semliki Forest Virus*), el virus de la encefalomiелitis equina venezolana (VEE) y el virus del río Ross. Las secuencias genómicas de distintos alfavirus, así como las secuencias de distintas proteínas estructurales y no estructurales son conocidas en el estado de la técnica tales como las secuencias del virus de SIN (GenBank Accession Nos. J02363, NCBI Accession No. NC_001547), del SFV (GenBank Accession No. X04129, NCBI Accession No. NC_003215), del VEE (GenBank Accession No. L04653, NCBI Accession No. NC_001449), etc.

La secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus, también denominada “secuencia 5' no traducida” o “5'-UTR”, según se usa en la presente invención, se refiere a la secuencia que aparece en el extremo 5' del genoma de los alfavirus que no se traduce y que contiene la región necesaria para la replicación del alfavirus, esto es, la secuencia que es reconocida por la polimerasa durante la síntesis de la molécula de ARN a partir del molde de ARN de polaridad negativa. En una forma preferida de realización, la secuencia 5' no traducida comprende la secuencia definida por SEQ ID NO: 1.

El término “secuencia que codifica la poliproteína no estructural” o “secuencia que codifica la replicasa Rep”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia que codifica la proteína no estructural replicasa o Rep, capaz de dirigir la replicación del ARN alfaviral. Dicha proteína no estructural es un poliprecursor nsP1-4, es decir, una proteína que posteriormente es procesada para dar lugar a cuatro proteínas independientes: nsP1,

nsP2, nsP3 y nsP4. En una realización preferida, la secuencia que codifica la poliproteína no estructural procede del SFV. Brevemente, el genoma de un alfavirus comprende secuencias que codifican proteínas no estructurales (nsPs), secuencias que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, la cápside, proteínas de la envoltura, etc), así como secuencias reguladoras necesarias para la replicación y empaquetamiento. El genoma de ARN de un alfavirus comprende un gen que codifica una replicasa Rep que, dentro de una célula eucariota, se traduce para dar lugar a una poliproteína que posteriormente es procesada en cuatro subunidades (nsp 1 a 4). La replicasa Rep no procesada es capaz de copiar el genoma alfaviral de ARN en una cadena negativa de ARN, a partir de la cual la replicasa ya procesada sintetiza más moléculas de replicón. Asimismo, Rep procesada es capaz de reconocer una secuencia interna en el ARN viral, denominada promotor subgenómico, a partir de la cual se sintetiza un ARN subgenómico de cadena positiva, que se traduce para dar lugar a las proteínas estructurales del alfavirus.

La proteína nsp1 está implicada en la iniciación (o continuación) de la síntesis de la cadena de polaridad negativa del ARN viral y en la adición del cap al extremo 5' del ARN genómico y subgenómico durante la transcripción puesto que nsp1 tiene actividad metiltransferasa y guaniltransferasa. nsp1 también modula la actividad de nsp2 puesto que las poliproteínas que contienen nsp1 no procesan de forma efectiva la unión entre nsp2 y nsp3.

nsp2 es una proteína multifuncional implicada en la replicación del genoma viral y en el procesamiento de la poliproteína poliestructural. El extremo N-terminal de nsp2 tiene actividad helicasa. Asimismo, la síntesis del ARN subgenómico parece que requiere de la actividad de nsp2. El dominio C-terminal de nsp2 es capaz de procesar proteolíticamente en trans y en cis la poliproteína estructural en las zonas de unión nsp1/nsp2, nsp2/nsp3, y nsp3/nsp4

nsp3 es una proteína con dos dominios claramente diferenciados y cuya función en la replicación viral no está totalmente esclarecida aunque se sabe que nsp3 se requiere para la síntesis del ARN viral.

nsp4 es la RNA polimerasa que contiene el motivo aminoacídico GDD característico de esta enzima. La secuencia del polipéptido de nsP4 tiene una longitud similar entre los distintos alfavirus (607 aminoácidos en VEE, 610 aminoácidos en SIN y 614 aminoácidos en SFV) presentando un elevado grado de conservación entre ellos (Kinney, et al., 1989, Virology, 170:19-30).

En una forma preferida de realización, la secuencia que codifica la poliproteína no estructural pertenece a SFV. En una forma de realización aún más preferida, dicha secuencia comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 2.

5 El término “promotor subgenómico del alfavirus” o “promotor 26S”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un promotor definido originalmente en un genoma alfaviral que es capaz, junto con las polimerasas virales y celulares, de dirigir la transcripción de un ARNm subgenómico de longitud inferior a la del genoma viral durante el proceso de replicación del genoma alfaviral. En los alfavirus, el promotor subgenómico procede de la
10 región del genoma que se encuentra entre las regiones codificantes de las proteínas no estructurales y estructurales de dicho alfavirus. Típicamente, el promotor subgenómico comprende una región central o *core* que aporta la mayor parte de la actividad promotora y regiones flanqueantes (promotor extendido o nativo) que aumentan la capacidad activadora de la transcripción. En el caso del virus SFV (cepa SFV4) el promotor subgenómico está
15 comprendido entre las posiciones 7348 y 7378 mientras que la región mínima que es necesaria para la transcripción se corresponde a los nucleótidos 7354-7378 (Rausalu K. *et al.*, 2009 Virol J. 6: 33).

El promotor subgenómico puede estar truncado (por ejemplo, para producir un promotor subgenómico mínimo) o modificado de forma que su actividad esté reducida, o aumentada
20 usando métodos conocidos en la técnica. En una realización particular, el promotor subgenómico alfaviral procede de SFV.

El término “secuencia 3’ necesaria para la replicación del alfavirus” también denominada “secuencia 3’ no traducida” o “3’-UTR”, según se usa en la presente invención, corresponde
25 a una región no traducida que aparece tras el codón de terminación. La región 3’ no traducida del polinucleótido de la invención contiene típicamente una secuencia de reconocimiento de la polimerasa de ARN. Esta secuencia, denominada secuencia de reconocimiento de la polimerasa del alfavirus, CSE terminal 3’ o secuencia de replicación 3’ (véase Strauss and Strauss, 1994, *supra.*), proporciona un sitio de reconocimiento para el
30 origen de replicación en la cadena negativa. La secuencia exacta que se use como secuencia de reconocimiento no es particularmente limitante así como la extensión de la misma siempre que mantenga la capacidad de funcionar como secuencia de reconocimiento. La región 3’ no traducida contiene típicamente una cola de poliadenina que permite aumentar la estabilidad del ARN y, por tanto, la cantidad de los productos
35 resultantes de la traducción de dicha ARN. La cola de poli(A) puede ser de cualquier tamaño

siempre que sea suficiente para aumentar la estabilidad en el citoplasma de la molécula del vector de la invención. La cola de poli(A) comprende al menos 10 nucleótidos de adenosina y, más preferiblemente, al menos 25 o 40 nucleótidos de adenosina. En una forma preferida de realización, la region 3' no traducida procede de SFV. En una forma de realización aún más preferida, la region 3' no traducida comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO: 3.

La secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus comprende una secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio (en adelante, primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio) en donde dicha secuencia se encuentra localizada entre el promotor subgenómico del alfavirus y la secuencia 3' no traducida del replicón del alfavirus.

El término "recombinasa específica de sitio", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína que es capaz de promover la recombinación específica de sitio entre sitios objetivo para dicha recombinasa. Recombinasas adecuadas para su uso en la invención incluyen la recombinasa Cre del fago P1 (específico para la secuencia LoxP), la recombinasa FLP de *S. cerevisiae* (específico para la secuencia FRT), la integrasa del fago *Streptomyces* Φ C31 (específico para attB, secuencias attP), la recombinasa TP901-1, la recombinasa R4 o la integrasa lambda.

Las "secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio" deben ser elegidas sobre la base de la recombinasa que se utilizará cuando se co-transfecten las células para la selección y generación de la línea celular estable. Por lo tanto, si la recombinasa es la recombinasa Cre, las secuencias de reconocimiento deben ser sitios LoxP. Si la recombinasa es la recombinasa FLP, las secuencias de reconocimiento deben ser sitios FRT.

En una realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias LoxP, específicas para la recombinasa Cre.

El término "recombinasa Cre", tal y como se usa en la presente descripción, incluye tanto la recombinasa Cre del fago P1, como se describió originalmente por Abreinski y Hoess (Abreinski y Hoess, 1984, J. Biol. Chem. 259: 1509-1514), así como proteínas de fusión que comprenden la secuencia de la recombinasa y un segundo polipéptido regulador de la actividad de la recombinasa. La recombinasa Cre, tanto si se utiliza como tal como si se emplea en forma de una proteína de fusión, puede estar modificada para que tenga una

mayor especificidad con respecto a las secuencias diana, tal y como se ha descrito en WO2000060091.

El término “secuencia LoxP”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refiere a una secuencia de 34 pares de bases, que a su vez está formada por dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases que flanquean una región central de 8 pares de bases. La invención también contempla el uso de variantes de la secuencia loxP de tipo salvaje que son incapaces de sufrir recombinación con las secuencias loxP, pero que sólo pueden recombinarse con variantes LoxP idénticos, tales como los descritos en WO9925851 y WO2007085906. Variantes de las secuencias loxP útiles en el contexto de la invención incluyen las secuencias loxP, loxP2, loxP511 (descrito en WO2007085906), loxP514, loxB, loxC2, LOXL, loxR, loxA86, loxA117, loxP3 y loxP23.

En una realización particular, el replicón del alfavirus es un replicón del virus del Bosque de Semliki o SFV (del inglés, *Semliki Forest Virus*). Preferiblemente, el replicón del alfavirus es un replicón no citopático. En una realización aún más preferida, el replicón de SFV comprende una o más mutaciones que confieren a dicho replicón un fenotipo no citopático.

El término “replicón no citopático” o “replicón con fenotipo no citopático”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a que el replicón del alfavirus, en particular el replicón de SFV, no es capaz de inducir una serie de cambios morfológicos o funcionales en la célula como consecuencia de la infección viral y que se manifiestan como redondeamiento celular, separación del sustrato, lisis celular, formación de cuerpos apoptóticos o parada de la síntesis de proteínas endógenas. La citopatogenicidad de un replicón alfaviral puede determinarse de manera rutinaria por un experto usando cualquier método conocido en el estado de la técnica incluyendo la observación directa de las células tras la puesta en contacto de las mismas con un colorante vital, como por ejemplo el metil violeta, tal y como se describe en la solicitud de patente WO2008065225.

Tal y como el experto en la materia conoce, existen diferentes mutaciones que tienen como efecto que el replicón de un alfavirus, preferiblemente un replicón de SFV, tenga un fenotipo no citopático. Preferiblemente, dichas mutaciones afectan a la secuencia que codifica la poliproteína no estructural, es decir, a la secuencia que afecta a la replicasa Rep. Aún más preferiblemente, dichas mutaciones afectan a la región de la secuencia que codifica la subunidad nsp2 de dicha poliproteína no estructural. Todavía más preferiblemente, dicha mutación se selecciona del grupo formado por las mutaciones P718T, R649H y una combinación de ambas. En una realización incluso más preferida del polinucleótido de la

invención, el replicón de SFV presenta las mutaciones P718T y R649H en la región que codifica la subunidad nsp2 de la poliproteína no estructural del alfavirus o replicasa Rep, tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2.

5 Secuencia de terminación de la transcripción

El polinucleótido de la invención comprende una secuencia de terminación de la transcripción en posición 3' respecto al extremo 3' de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus.

10

El término "secuencia de terminación de la transcripción", tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia de ADN que dirige la terminación de la transcripción por parte de la ARN polimerasa. Dichas secuencias también pueden dirigir la escisión postranscripcional y la poliadenilación del ARN transcrito. En una realización particular, la secuencia de terminación de la transcripción comprende una señal de poliadenilación, denominándose

15 secuencia de poliadenilación/terminación. En una realización preferida, la secuencia de terminación deriva del virus SV40. En una realización aún más preferida, la secuencia de terminación de la transcripción comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 13.

20 Segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio

El polinucleótido de la invención comprende una secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio (en adelante, segunda secuencia de reconocimiento de recombinasa específica de sitio) situada en posición 3' respecto a la secuencia de ADN

25 complementaria al replicón del alfavirus.

En una realización preferida, la primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio (localizada en la secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus) y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de

30 sitio (localizada en posición 3' respecto a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus) son secuencias heteroespecíficas, es decir, son secuencias diferentes que no pueden recombinar entre sí en presencia de dicha recombinasa. Ejemplos ilustrativos no limitativos de secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio heteroespecíficas son las descritas por Lee and Saito (Gene 1998, 216: 55-65)

35

En otra realización preferida, la primera y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias que incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional, es decir, que una vez que tiene lugar la recombinación, la secuencia flanqueada por los sitios de recombinación ya no puede escindirse mediante una nueva recombinación. Ejemplos ilustrativos no limitativos de secuencias que incorporan mutaciones como las mencionadas son las descritas por Arakawa (Arakawa *et al.*, 2001, BMC Biotechnology, 1: 7).

En una realización preferida, la primera y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas y adicionalmente incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional.

En una realización aún más preferida, la primera y la segunda secuencia LoxP se seleccionan del grupo formado por las parejas:

- (i) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10
- (ii) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12
- (iii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12
- (iv) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10
- (v) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9
- (vi) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11
- (vii) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11
- (viii) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9

En una realización particular, los genes estructurales del alfavirus que están bajo el control del promotor subgenómico han sido eliminados. Preferiblemente, dichos genes estructurales han sido sustituidos por una secuencia heteróloga.

En una realización particular del polinucleótido de la invención, la secuencia complementaria al replicón del alfavirus además comprende una secuencia heteróloga en posición 3' respecto al promotor subgenómico del replicón y respecto a la primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio.

El término "secuencia heteróloga", tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia que no se encuentra de forma natural en el genoma del alfavirus del cual deriva el replicón al cual es complementario la secuencia de ADN que forma parte del polinucleótido de la invención. La secuencia heteróloga puede ser de cualquier origen, es decir, puede derivar

de cualquier organismo diferente al alfavirus del cual deriva el replicón, o bien puede ser una secuencia artificial. En una realización particular, la secuencia heteróloga se selecciona del grupo formado por:

- (i) una secuencia de relleno,
- 5 (ii) una secuencia que comprende un sitio de clonación múltiple,
- (iii) una secuencia de un gen de interés operativamente unida al promotor subgenómico del replicón del alfavirus y
- (iv) cualquier combinación de las mismas.

10 En una forma preferida de realización, la secuencia heteróloga es una de relleno o secuencia “stuffer”.

El término “secuencia de relleno” o “stuffer”, según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ADN que se inserta en otra secuencia de ADN con el fin de aumentar su tamaño. Típicamente, las regiones de relleno no contienen regiones que

15 codifiquen para proteínas, regiones reguladoras de la expresión génica ni otros elementos reguladores de la expresión, tales como regiones promotoras, aumentadores transcripcionales o sitios de procesamiento de ARN. La secuencia de relleno puede estar formada por al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, el

20 menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 2000, al menos 3000, al menos 4000, al menos 5000, al menos 6000, al menos 7000, al menos 8000, al menos 9000 o al menos 10000 nucleótidos.

El término “marco abierto de lectura” o “ORF” (del inglés, *open reading frame*), tal y como se

25 usa en la presente descripción”, se refiere a una secuencia de ADN comprendida entre un codón de iniciación de la traducción (ATG) y un codón de terminación. Dicha secuencia de ADN no contiene ningún codón de terminación interno y, por lo general, se puede traducir en un péptido.

30 El término “sitio de clonación múltiple”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una serie de dos o más secuencias diana para endonucleasas de restricción próximas entre sí. Sitios de clonaje múltiple incluyen dianas para endonucleasas de restricción que permiten la inserción de fragmentos que muestran extremos romos, extremos 5' protuberantes o extremos 3'

35 protuberantes.

El término “gen de interés”, tal y como se usa en la presente descripción”, se refiere a cualquier gen cuya expresión en una célula sea deseada. El gen de interés puede ser tanto un gen que codifica un polipéptido o proteína, como un gen que, una vez transcrito, da lugar a un ARN capaz de hibridar con la secuencia de un ARN mensajero inhibiendo su expresión, como por ejemplo, un ARN de interferencia pequeño o siARN (del inglés *small interfering RNA*), un micro ARN o un ARN en horquilla pequeño o shARN (del inglés, *small hairpin RNA*).

- 10 Cuando el polinucleótido de la invención comprende una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus que además comprende una secuencia de un gen de interés, dicha secuencia está operativamente unida al promotor subgenómico del alfavirus.

En una realización particular, el gen de interés codifica una proteína de interés o un precursor de la misma. El término “proteína de interés”, tal y como aquí se emplea, se refiere a cualquier proteína cuya expresión en una célula se desee conseguir. El término “precursor” se refiere a un polipéptido que, una vez procesado, puede dar lugar a una proteína de interés. En una realización particular, el precursor de la proteína de interés es un polipéptido que comprende una secuencia señal o péptido señal. El término “secuencia señal” o “péptido señal”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a un péptido de una longitud relativamente corta, en general de entre 5 y 30 residuos de aminoácidos, que dirige a las proteínas sintetizadas en la célula hacia la ruta de secreción. El péptido señal habitualmente contiene una serie de aminoácidos hidrofóbicos que adoptan una estructura secundaria de hélice alfa. Adicionalmente, muchos péptidos incluyen una serie de aminoácidos cargados positivamente que pueden contribuir a que la proteína adopte la topología adecuada para su translocación. El péptido señal suele tener en su extremo carboxilo un motivo de reconocimiento por parte de una peptidasa, que es capaz de hidrolizar el péptido señal dando lugar a un péptido señal libre y una proteína madura.

- 30 En una realización particular del polinucleótido de la invención, la proteína de interés es una proteína fluorescente, preferiblemente la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés, *green fluorescent protein*). En otra realización particular, la proteína de interés es cardiotrofina-1. En otra realización particular, la proteína de interés es oncostatina-M. En otra realización particular, la proteína de interés es un anticuerpo de cadena sencilla o la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo, preferiblemente la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo idiотipo A20.

El término “proteína fluorescente”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a un polipéptido con capacidad de emitir luz en respuesta a una absorción de luz o de otra radiación electromagnética. Ejemplos ilustrativos no limitativos de proteínas fluorescentes son la proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), variantes de GFP para diferentes longitudes de onda de emisión, intensidad de emisión y/o estabilidad de la proteína tales como la Superfolder GFP, variantes de EGFP para distintas longitudes de onda de emisión (colores) como la proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv (caracterizado por presentar las mutaciones F99S, M153T y V163A en la secuencia de GFP), Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, y T-Sapphire. Otros polipéptidos fluorescentes incluyen la proteína roja fluorescente (RFP), DsRed y sus variantes DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP, y la proteína fluorescente Kindling (KFP). En una realización particular, la proteína fluorescente es la proteína verde fluorescente o GFP.

El término “proteína verde fluorescente” o “GFP”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína compuesta de 239 aminoácidos, con un peso molecular de 26,9 kDa y que presenta fluorescencia verde brillante cuando se expone a la luz azul ultravioleta. A pesar de que muchos otros organismos marinos tienen proteínas verdes fluorescentes similares, GFP tradicionalmente se refiere a la primera proteína aislada de la medusa *A. victoria*. La GFP de *A. victoria* tiene un máximo de excitación principal a una longitud de onda de 395 nm y uno menor a 475 nm. Su máximo de emisión es a 509 nm. El rendimiento de fluorescencia cuántica de la GFP es de 0,79. En *A. victoria*, la GFP transduce la quimioluminiscencia azul de la acuorina a luz verde fluorescente mediante una transferencia de energía.

Alternativa- o adicionalmente, el polipéptido heterólogo puede ser un polipéptido de interés terapéutico de forma que los vectores de la invención pueden ser usados para la expresión in vitro de dicho polipéptido o para el tratamiento de enfermedades que requieran la expresión de dicho polipéptido. Así, la invención contempla vectores en los que la secuencia heteróloga contiene genes o cDNAs que codifican uno o varios polipéptidos de interés terapéutico que incluyen, sin limitación, eritropoietina (EPO), leptinas, hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), hormona liberadora de hormona somatotropa (GHRH), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina, hormona adrenocorticotropa (ACTH),

hormona somatotropa o del crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), tiotropina (TSH u hormona estimulante del tiroides), prolactina, oxitocina, hormona antidiurética (ADH o vasopresina), melatonina, factor inhibidor Mülleriano, calcitonina, hormona paratifoidea, gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina,

5 factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento de tipo insulina tipo II (IGF-II), péptido natriurético atrial (PNA), gonadotrofina coriónica humana (GCH), insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (PP), leptina, neuropéptido Y, renina, angiotensina I, angiotensina II, factor VIII, factor IX, factor tisular, factor VII, factor X, trombina, factor V, factor XI, factor XIII, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), factor de

10 necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 7 (IL-7), interleukina 8 (IL-8 y chemoquinas), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 16 (IL-16), interleuquina 15 (IL-15), el receptor de IL-15, interleuquina 21 (IL-21), interleuquina 24 (IL-24), interferones alpha, beta, gamma, CD3, ICAM-1, LFA-1, LFA-3, quimioquinas incluyendo RANTES 1 α , MIP-1 α , MIP-1 β , factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado de las

15 plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), protevnsas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF y relacionados), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento glial, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento endotelial,

20 antitripsina 1 alfa, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), cardiotrofina 1 (CT-1), oncostatina M (OSM), anfiregulina (AR), ciclosporina, fibrinógeno, lactoferrina, activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), quimotripsina, inmunoglobinas, hirudina, superóxido dismutasa, imiglucerasa, β -Glucocerebrosidasa, alglucosidasa- α , α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, galsulfasa, α -galactosidasa A humana, inhibidor de la proteinasa α -1, lactasa, enzimas pancreáticas (lipasa, amilasa, proteasa), adenosina deaminasa, inmunoglobulinas, albúmina, toxinas botulínicas de tipo A y B, collagenasa, deoxiribonucleasa I humana, hialuronidasa, papaína, L-asparaginasa, lepirudina, estreptoquinasa, el dominio extra de fibronectina (EDA),

25 péptidos inhibidores del factor de transformación celular beta (TGF- β) tales como los descritos en WO0331155, WO200519244 and WO0393293, cuyo contenido se incorpora en la presente invención por referencia, casetes de expresión apropiados para la transcripción de moléculas de RNA de interferencia (shRNA, siRNA, miRNA, RNA de ribonucleoproteínas U1 modificadas).

30 En una forma preferida de realización, el gen de interés codifica el precursor de cardiotrofina-1.

35

El término “cardiotrofina-1” o “CT-1”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una citoquina perteneciente a la familia de la interleuquina 6, capaz de unirse y activar la señalización mediada al menos por el complejo del receptor LIFR consistente en el heterodímero gp130/LIFR β . La cardiotrofina-1 puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización preferida, la cardiotrofina es la proteína humana cuyo número de acceso en la base de datos de UniProt es Q16619 (6 de marzo de 2013), incluyendo tanto la isoforma 1 (número de acceso Q16619-1) como la isoforma 2 (número de acceso Q16619-2).

En otra forma preferida de realización, el gen de interés codifica el precursor de oncostatina M.

El término “oncostatina M”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una citoquina pleiotrópica perteneciente a la familia de la interleuquina 6. La oncostatina M es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 28 kDa producida principalmente por células T, monocitos/macrófagos y células dendríticas. La oncostatina-M puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización preferida, la oncostatina-M es la proteína humana cuyo número de acceso en la base de datos de UniProt es P13725 (6 de marzo de 2013).

En otra forma preferida de realización, el gen de interés codifica un anticuerpo.

El término “anticuerpo”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada aquí como VH) y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada aquí como VL). Típicamente, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada y dos regiones variables de la cadena ligera. El término “anticuerpo” abarca fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y/o de longitud total de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas).

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de

complementariedad" ("CDR"), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de las FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE UU, Publicación del NIH No. 91-3242; y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En el presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada región variable de la cadena pesada y ligera típicamente está compuesta de tres CDR y cuatro FR, organizadas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además todo o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada (HC, del inglés *heavy chain*) o ligera (LC, del inglés *light chain*), respectivamente. En una forma de realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas pueden estar unidas por puentes disulfuro. La región constante de la cadena pesada típicamente incluye tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera típicamente incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término anticuerpo abarca tanto anticuerpos formados por cadenas pesadas y cadenas ligeras como anticuerpos de cadena sencilla. Por tanto, en una realización particular, el gen de interés codifica un anticuerpo de cadena sencilla o un precursor del mismo. En otra forma preferida de realización, el gen de interés codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un precursor de la misma. En otra forma preferida de realización, el gen de interés codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un precursor de la misma.

El término "cadena pesada" o "HC" (del inglés "*heavy chain*"), tal como se usa en el presente documento, abarca tanto una cadena pesada de longitud completa como fragmentos de la misma. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H, y tres dominios de región constante, C_H1, C_H2 y C_H3. El dominio V_H está en el extremo amino terminal del polipéptido y el dominio C_H3 está en el extremo carboxilo terminal.

El término “cadena ligera”, tal como se usa en el presente documento, abarca una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L , y un dominio de región constante, C_L .

- 5 Como la cadena pesada, el dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amino terminal del polipéptido.

El término “anticuerpo de cadena sencilla”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula modificada mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un
10 ligador peptídico adecuado, formando como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

El término “anticuerpo A20”, tal y como aquí se utiliza, se refiere al anticuerpo producido por
15 la línea celular de linfoma de ratón depositada bajo el número ATCC TIB-208.

En una realización particular, la proteína de interés adicionalmente comprende al menos una secuencia etiqueta.

20 El término “secuencia etiqueta” o “péptido etiqueta” o “tag”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido útil para facilitar la detección, aislamiento y/o purificación de una proteína. Por lo general, dicha secuencia etiqueta se localiza en una parte de la proteína de interés que no afecta adversamente a su funcionalidad. Prácticamente cualquier polipéptido que pueda ser utilizado para detectar, aislar y/o purificar
25 una proteína puede estar presente en la proteína de interés. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho polipéptido útil para detectar, aislar y/o purificar una proteína, tal como una proteína de interés, puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a
30 celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 523-525), β -galactosidasa, VSV-glicoproteína, etc. En una realización particular y preferida, la proteína de interés comprende una cola de polihistidinas.

35 En una realización particular, el replicón del alfavirus comprende al menos una secuencia de un segundo gen de interés en posición 3' respecto a la primera secuencia de reconocimiento

para una recombinasa específica de sitio. Dicha secuencia de un segundo gen de interés puede estar

- (i) Operativamente unida a un promotor subgenómico adicional o
- (ii) Operativamente asociada a la secuencia del primer gen de interés, estando unida a la secuencia del primer gen de interés por medio de un IRES o de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico posttraduccional. En estos casos, la expresión del segundo gen de interés depende del mismo promotor subgenómico que controla la expresión del primer gen de interés.

El término “IRES” o “sitio de entrada ribosomal interna” o “*internal ribosomal entry site*”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia que aparece en los ARNm y que son capaces de reclutar la maquinaria traduccional a un codón de iniciación de la traducción interno con ayuda de factores que actúan en trans (reviewed in Jackson, Translational Control of Gene Expression, pp. 127-184. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000). Los elementos IRES aparecen frecuentemente en ARNm de origen viral. Elementos IRES útiles para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, IRES de picornavirus (por ejemplo, poliovirus), virus de la encefalomiocarditis (EMCV), FMDV, IRES de flavivirus (por ejemplo del virus de la hepatitis C), IRES de pestivirus (por ejemplo, el virus de la peste porcina clásica (CSFV)), IRES de retrovirus (por ejemplo, el virus de la leucemia murina o MLV), de lentivirus (por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia del simio o SIV) o IRES de ARNm celulares tales como los que aparecen en factores de traducción (eIF4G), en factores de transcripción (c-Myc), IRES de factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, IGF-II, PDGF-2 o FGF-2), de genes homeóticos (por ejemplo, el IRES de Antennapedia), de proteínas de supervivencia (por ejemplo del inhibidor de la apoptosis asociado a X (XIAP) o Apaf-1), IRES de chaperonas (por ejemplo, el IRES de la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina o BiP).

El término “secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una secuencia de nucleótidos que, una vez traducida, da lugar a una secuencia de aminoácidos que es susceptible de ser escindida una vez que la proteína ha sido traducida. En una realización preferida, la secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia que codifica una autoproteasa, es decir, una proteasa que actúa en cis entre las proteínas resultantes de la traducción del primer gen de interés y del segundo gen de interés. Es decir, en una realización particular, dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia nucleotídica que, al traducirse, proporciona un sitio de corte por medio del cual la proteína de fusión o

- poliproteína expresada es procesada post-traduccionalmente en las proteínas que componen dicha proteína de fusión o poliproteína. A modo ilustrativo, dicha autoproteasa puede proceder de un virus, por ejemplo, un picornavirus, un alfavirus, etc. En una realización preferida, la autoproteasa es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa o FMDV. La utilización de estos sitios de rotura autoproteolítica post-traduccional ha sido descrita previamente en la solicitud de patente europea EP 736099 y también por Ryan y Drew (EMBO J. 1994,13: 928-33), particularmente la utilización de la secuencia codificante de la región 2A de la poliproteína de FMDV (autoproteasa 2A de FMDV).
- Alternativamente, en otra realización particular, dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de corte para una proteasa que actúe en trans; en este caso, dicha proteasa podría ser expresada por la célula transfectada con el vector viral de la invención, bien de forma nativa o recombinante, o, alternativamente, dicha proteasa podría ser añadida exógenamente para liberar el producto heterólogo de interés de la proteína de fusión que comprende el producto del primer gen de interés y el producto del segundo gen de interés. Prácticamente cualquier secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de corte para una proteasa que actúe en trans, y, en consecuencia, la secuencia aminoacídica codificada por dicha secuencia, puede ser utilizada en el contexto de la presente invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de corte de una proteasa que actúe en trans puede ser una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica susceptible de ser cortada por una endopeptidasa, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de corte para una proteasa que actúe en trans es una secuencia nucleotídica que codifica un sitio de corte para una proteasa de un virus, por ejemplo, un potivirus, tal como la proteasa del virus del grabado del tabaco (ETV, del inglés Etch Tobacco Virus), etc. y dicha proteasa podría ser expresada por la célula transfectada con el vector viral de la invención (bien de forma nativa o porque haya sido transformada apropiadamente), etc.
- Alternativamente, en otra realización particular, dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de corte reconocible por un reactivo químico, e.g., bromuro de cianógeno que corta en los residuos de metionina, etc.
- En una realización aún más particular, el replicón del alfavirus comprende las secuencias de dos genes de interés. En una realización todavía más particular, dichas secuencias están

operativamente unidas a dos promotores subgenómicos diferentes e independientes. En una realización incluso más particular, el primer gen de interés codifica una primera cadena de un anticuerpo o un precursor de la misma y el segundo gen de interés codifica una segunda cadena de dicho anticuerpo o un precursor de la misma. Dichas primera y segunda cadena se refieren a la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente o a la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. En una realización incluso más particular, dichas secuencias son la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo A20 y la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo (ATCC TIB-208).

10 En una realización particular, el polinucleótido de la invención adicionalmente comprende un gen de selección localizado en la región comprendida entre el primer y el segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa.

El término “gen de selección”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a un gen cuya expresión confiere resistencia a un antibiótico, un gen que permite sintetizar un nutriente esencial que sea omitido en el medio de cultivo, o un gen que ofrece una ventaja selectiva a las células que han incorporado dicho gen de selección.

En una realización preferida, el gen de selección es un gen cuya expresión confiere resistencia a un antibiótico por ejemplo, el gen que confiere resistencia a la higromicina (hph), el gen que confiere resistencia a la neomicina (neoR), el gen que confiere resistencia a la puromicina (enzima puromicina N-acetiltransferasa o pac), etc. En una realización aún más preferida del polinucleótido de la invención, el gen que confiere resistencia a un antibiótico se selecciona del grupo formado por el gen de resistencia a puromicina y el gen de resistencia a neomicina.

Alternativamente, el gen de selección es un gen que permite sintetizar un nutriente esencial que sea omitido en el medio de cultivo. Un ejemplo incluye el gen trpB de *Escherichia coli*, que codifica la subunidad beta de la triptófano sintetasa. Este gen permite la supervivencia de células de mamíferos y multiplicación en medio que contiene indol en lugar de triptófano. Un segundo ejemplo incluye el gen hisD de *Salmonella typhimurium*, que codifica histidinol deshidrogenasa, que cataliza la oxidación dependiente de NAD⁺ de L-histidinol a L-histidina en dos etapas. En medio que carece de histidina y que contiene histidinol, sólo las células de mamífero que expresan el producto hisD pueden sobrevivir (Hartman S.C. y Mulligan R.C., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85(21): 8047-51).

Un ejemplo de gen de selección que ofrece una ventaja selectiva a las células que han incorporado dicho gen incluye el gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) en células modificadas por ingeniería genética para ser deficientes para DHFR. La proteína DHFR cataliza la reducción de 5,6-dihidrofolato a 5,6,7,8-tetrahidrofolato, un paso esencial en el metabolismo de la purina. El uso de DHFR permite la selección genética de las células deficientes en DHFR haciéndolas crecer en la ausencia de los precursores de purina hipoxantina y timidina (HT) (Kaufman R.J. y Sharp P.A., 1982, J. Mol. Biol., 159(4): 601-21).

En el caso de que la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus sea una secuencia regulable, el gen de selección se localiza fuera del replicón del alfavirus y está operativamente unido a un promotor constitutivo. De esta forma, no es necesario que tenga lugar la transcripción de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus para que se exprese el gen de selección, de forma que la selección de las células que han incorporado el nucleótido de la invención puede hacerse sin necesidad de añadir el ligando que activa al promotor regulable que controla la transcripción de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus.

En el caso de que la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus comprenda un promotor constitutivo, el gen de selección puede estar

- (i) asociado a la secuencia del gen de interés por medio de un IRES o por una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona, o alternativamente,
- (ii) bajo el control de un segundo promotor constitutivo.

Los términos “IRES” y “secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona” han sido previamente descritos. En una realización preferida, la secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona es una secuencia que codifica una autoproteasa. En una realización particular, la proteasa es la proteasa 2A de FMDV.

En una realización particular, cuando el gen de selección está unido operativamente a un promotor constitutivo diferente al promotor que regula la expresión de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus, dicho promotor constitutivo comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el polinucleótido de la invención adicionalmente comprende una señal de poliadenilación o una señal de terminación de la transcripción y poliadenilación en posición 3' respecto al segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio.

5

El término “señal de poliadenilación”, tal y como se usa aquí, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que media la unión de un tramo de poliadenina (poli(A)) al extremo 3' del ARN mensajero. La cola de poli(A) puede ser de cualquier tamaño siempre que sea suficiente para aumentar la estabilidad en el citoplasma del polinucleótido de la invención.

10 La cola de poli(A) comprende al menos 10 nucleótidos de adenosina y, más preferiblemente, al menos 25 o 40 nucleótidos de adenosina. Señales de poliadenilación adecuadas para su uso en la presente invención incluyen sin limitación, la señal de poliadenilación temprana-tardía de SV40, la señal de poliadenilación de la timidina quinasa del virus del Herpes simple o HSV, la señal de poliadenilación del gen de la protamina, la señal de poliadenilación de
15 Elb de adenovirus 5, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, la señal de poliadenilación de la variante humana de la hormona de crecimiento y similares. El término “señal de terminación de la transcripción y poliadenilación” se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia de terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación. En una realización particular, el polinucleótido de la invención
20 comprende una señal de terminación de la transcripción y poliadenilación en posición 3' respecto al segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio. En una realización aún más particular, la señal de terminación de la transcripción y poliadenilación es la señal de terminación de la transcripción y poliadenilación del gen de la timidina quinasa derivada del HSV. En una realización particular, la señal de terminación de la transcripción y
25 poliadenilación comprende la secuencia SEQ ID NO: 70.

El polinucleótido de la invención puede incorporarse en un vector de expresión con el fin de ser administrado a una diana. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión, en adelante primer vector de expresión de la invención, que comprende el
30 polinucleótido de la invención.

Vectores de expresión de la invención

El término “vector de expresión” o “plásmido de expresión”, tal y como aquí se utiliza, se
35 refiere a una construcción de ADN replicativo utilizada para expresar el polinucleótido de la invención en una célula, preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una

célula de mamífero. Preferiblemente, el primer vector de expresión también contiene un origen de replicación en procariotas, necesario para la propagación del vector en bacterias. Adicionalmente, el primer vector de expresión también puede contener un gen de selección para bacterias, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, etc. El primer vector de expresión también puede contener uno o varios sitios de clonaje múltiple.

El polinucleótido de la invención así como las construcciones de ARN o ADN necesarias para preparar el vector de expresión de la invención se pueden obtener mediante métodos convencionales de biología molecular incluidos en los manuales generales de laboratorio, por ejemplo, en "Molecular cloning: a laboratory manual" (Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3ª ed. Cold Spring Harbor, New York) o en "Current protocols in molecular biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman y K. Struhl Eds, vol. 2. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, N. Y. Actualizado a septiembre de 2006).

Los alfavirus o genomas de alfavirus o fragmentos de los mismos se pueden obtener mediante diversas técnicas y de diversas fuentes. Se pueden sintetizar artificialmente, clonar a partir de plásmidos o de virus aislados por RT-PCR, o derivarse o purificar directamente a partir de muestras de virus depositadas en bibliotecas.

Células de la invención

El polinucleótido de la invención, así como el vector de expresión que comprende dicho polinucleótido, pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células que pueden ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho nucleótido o vector. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula eucariota, en adelante célula de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención o un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la invención.

A modo de ejemplo, el vector o plásmido que comprende el polinucleótido de la invención puede ser un vector o plásmido que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en los cuales se ha integrado. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido de la invención integrado en su genoma.

Las células de la invención se pueden obtener introduciendo en una célula el polinucleótido de la invención o el vector de expresión que incorpora el polinucleótido de la invención mediante técnicas bien conocidas tal como infección, transducción, transfección, electroporación y transformación usando el polinucleótido de la invención aislado, incorporado en liposomas artificiales o formando parte del vector de expresión mencionado anteriormente.

El término “célula eucariota”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una célula que tiene un núcleo diferenciado delimitado por una membrana, tal como, por ejemplo, una célula animal.

En una realización preferida, la célula de la invención es una célula de mamífero, aún más preferiblemente una célula BHK, es decir, una célula de riñón de hámster recién nacido. En otra realización particular, la célula eucariota es una célula que puede crecer en suspensión, es decir, una célula que puede crecer en cultivo sin adherirse a una superficie de cultivo.

En el caso de que el polinucleótido de la invención comprenda una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción en donde dicha secuencia es una secuencia regulable por un ligando, puede ser de interés que la célula comprenda adicionalmente una secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional operativamente unido a un promotor constitutivo, en donde dicho activador transcripcional es capaz de regular la transcripción a partir de la secuencia reguladora de la transcripción mediante su unión al sitio de elemento de respuesta a un ligando. De esta forma, cuando dicha célula se ponga en contacto con el ligando del activador transcripcional, dicho activador adoptará un cambio conformacional que le permitirá unirse a la secuencia reguladora de la transcripción que está unida a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus, activando su transcripción.

Por tanto, en una realización particular, la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia complementaria del replicón del alfavirus es una secuencia regulable y la célula comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional unido operativamente a un promotor constitutivo, en donde dicho activador transcripcional es capaz de regular la transcripción a partir de dicha secuencia reguladora de la transcripción mediante su unión al sitio de elemento de respuesta a un ligando.

El término “activador transcripcional” o “transactivador”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a un polipéptido que, cuando se une a un ligando, es capaz de promover la transcripción de un polinucleótido que está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción que comprende elementos de respuesta específicos para dicho ligando. Es decir, la actividad de una secuencia reguladora de la transcripción puede ser modulada por factores adicionales que pueden suministrarse o eliminarse dependiendo de la necesidad de promover la transcripción de los polinucleótidos cuya expresión regulan. Los expertos en la materia observarán que el activador transcripcional, en presencia de su ligando, es capaz de unirse a la secuencia reguladora de la transcripción de actividad regulable que está unida operativamente a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus, regulando la actividad del promotor comprendido en dicha secuencia reguladora y por tanto regulando la expresión de dicha secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus.

Adicionalmente, el experto en la materia apreciará que la invención contempla cualquier método para regular la expresión del regulador transcripcional siempre que permita la expresión de forma regulada y con un mínimo de transcripción basal. En particular, la invención contempla el uso de reguladores transcripcionales cuya inducción tiene lugar no mediante un aumento de los niveles de expresión del regulador transcripcional sino mediante un cambio conformacional en respuesta a la unión del agente inductor que puede resultar en la translocación del factor de transcripción al núcleo donde ejerce su efecto o en un aumento de la actividad transcripcional. Este tipo de reguladores transcripcionales suelen estar formados por un dominio de unión a ADN o DBD (DNA binding domain), un dominio de unión a un ligando o LBD (ligand binding domain), y un dominio de activación de la transcripción o AD (activating domain).

El dominio de unión de ADN puede ser cualquier dominio para el que exista un elemento de unión específico conocido, incluyendo dominios de unión a ADN sintéticos, quiméricos o análogos. Dominios de unión a ADN adecuados para la presente invención incluyen (i) homeodominios (Scott *et al.*, 1989, Biochim. Biophys. Acta 989:25-48; Rosenfeld *et al.*, 1991, Genes Dev. 5:897-907) formados, por regla general, por una cadena de aproximadamente 61 amino ácidos que presenta una estructura secundaria compuesta por tres hélices alfa, (ii) dedos de zinc formados por dos a tres docenas de dedos de fórmula general Cys2His2 organizados en tándem (por ejemplo TFIIIA, Zif268, Gli, and SRE-ZBP) en donde cada módulo comprende una hélice alfa capaz de contactar con una región de ADN de 3 a 5 pares de bases siendo necesarios al menos 3 dedos de zinc para generar un sitio de unión a ADN de alta afinidad y al menos dos dedos de zinc para generar sitios de unión a

- ADN de baja afinidad, (iii) los dominios de unión a ADN denominados hélice-giro-hélice o HLH (helix-turn-helix) tales como TetR, MAT1, MAT2, MATa1, Antennapedia, Ultrabithorax, Engrailed, Paired, Fushi tarazu, HOX, Unc86, Oct1, Oct2 y Pit-1, (iv) dominios de unión a ADN del tipo cremalleras de leucina (leucine zipper) tales como GCN4, C/EBP, c-Fos/c-Jun y JunB. Ejemplos de dominios de unión a ADN adecuados en la presente invención incluyen el dominio de unión a ADN de GAL4, de LexA, de factores de transcripción, de receptores nucleares del grupo H, receptores nucleares de la superfamilia de las esteroides/hormonas tiroideas. El experto en la materia apreciará que la invención contempla el uso de dominios de unión a ADN híbridos formados por varios motivos de unión a ADN que pueden reconocer sitios de unión a ADN distintos a los de los elementos que los componen. Así, es posible el uso de dominios de unión de ADN formados por la unión de un dedo de zinc y un homeobox. En una forma preferida de realización, el dominio de unión a ADN es el procedente del represor transcripcional Tet de E.coli.
- Las secuencias de unión a ligando capaces de promover la localización nuclear de un activador transcripcional que los contienen, adecuadas para el uso en la presente invención, incluyen la secuencia de localización derivada de PPAR (receptores activados por activadores peroxisomales), que se translocan al núcleo en presencia de 15-desoxy-[Delta]-prostaglandina J2, receptores del ácido retinoico que se translocan al núcleo en presencia de los isómeros alfa, beta o gamma del ácido 9-cis-retinoico, receptores de farnesoide X, activables por ácido retinoico y TTNPB, receptores X hepáticos activables por 24-hidroxicolesterol, receptores de benzoato X, activables por 4-amino-butilbenzoato, receptor constitutivo de androstano, receptores de pregnano, inducibles por pregnolono-16-carbonitrilo, receptores de esteroides y xenobióticos, inducibles por rifampicina, receptores de progesterona, activables por medroxiprogesterona así como por agonistas y antagonistas de mifepristona y derivados de 19-nortestosterona, receptores de glucocorticoides activables por glucocorticoides, receptores de hormonas tiroideas, activables por T3 y/o T4, y receptores de estrógenos, activables por estrógenos y sus derivados tales como el 17-betaestradiol y el estradiol, transactivadores tTA activables por tetraciclina/doxiciclina “tet-off” (Gossen y Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551), transactivadores rtTA activables por tetraciclinas “tet-on” (Gossen *et al.*, 1995, Science, 268: 1766-1769), transactivador inducible por muristerona A o ligandos análogos del receptor de la ecdisona (No *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351), transactivadores activables por el ligando RSL1, como el sistema RheoSwitch inicialmente descrito por Palli *et al.* (2003, Eur. J. Biochem., 270: 1308-1315), un transactivador activable por rapamicina o análogos de la rapamicina (Ho *et al.*, 1996, Nature, 382: 822-826; Amara *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 94: 10618-10623), y un transactivador activable por coumermicina/novobiocina, que actúan competitivamente como inductor y represor respectivamente (Zhao *et al.*, 2003, Hum. Gene Ther., 14: 1619-1629).

5 Por último, el dominio de activación transcripcional puede ser un dominio de activación ácido, un dominio de activación rico en prolinas, un dominio de activación rico en serinas/treoninas y un dominio de activación rico en glutamina. Ejemplos de dominios de activación ácidos incluyen las regiones de VP16 y la región de GAL4 formada por los aminoácidos 753-881. Ejemplos de dominios de activación transcripcional ricos en prolina
10 incluyen los aminoácidos 399-499 de CTF/NF1 y los aminoácidos 31-76 de AP2. Ejemplos de dominios de activación ricos en serina-treonina incluyen los aminoácidos 1-427 de ITF1 y los aminoácidos 2-452 de ITF2. Ejemplos de dominios de activación ricos en glutamina incluyen los aminoácidos 175-269 de Oct1 y los aminoácidos 132-243 de Sp1. Las secuencias de cada uno de las regiones descritas así como otros dominios de activación
15 transcripcional han sido descritos por Seipel, K. *et al.* (EMBO J. (1992) 13:4961-4968). Adicionalmente, otros dominios de activación transcripcional pueden ser obtenidos a partir de los anteriores usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Adicionalmente, el dominio de activación puede ser el dominio de activación de los receptores nucleares del grupo H, de los receptores nucleares de hormonas tiroideas o esteroideas, el dominio de
20 activación de VP16, de GAL4, de NF-κB, de B42, de BP64, o de p65.

En una forma preferida de realización, el dominio de activación transcripcional es la proteína 16 del virión del herpes simplex (en adelante VP16), cuya secuencia de amino ácidos ha sido descrita por Triezenberg, S. J. *et al.* (Genes Dev., 1988, 2:718-729). Este dominio
25 puede estar formado por en torno a 127 amino ácidos del extremo C-terminal de VP16. Alternativamente, el dominio de activación transcripcional puede estar formado por los 11 aminoácidos de la región C-terminal de VP16 y que mantienen la capacidad de activar la transcripción. Regiones adecuadas del extremo C-terminal de VP16 adecuadas para su uso como dominios de activación transcripcional han sido descritos por Seipel, K. *et al.* (EMBO
30 J. (1992) 13:4961-4968). En una forma aún más preferida, el activador transcripcional comprende la región mínima de dicha proteína formada por 13 aminoácidos cuya secuencia es PADALDDFDLML (SEQ ID NO: 15) tal y como ha sido descrito por Baron *et al.* (Nucleic Acids. Res., 1997, 25:2723-2729).

35 En una forma preferida de realización el activador transcripcional es un activador transcripcional activable por tetraciclina o sus análogos.

El término “análogo de tetraciclina”, según se usa en la presente invención, se refiere a compuestos estructuralmente relacionados con tetraciclina con capacidad de unión al represor de tetraciclina (TetR) con una K_a de al menos en torno a 10^{-6} M. Preferiblemente, el análogo de tetraciclina tiene una afinidad por el TetR de al menos 10^{-9} M. Ejemplos de análogos de tetraciclina adecuados para la presente invención incluyen, sin limitación, anhidrotetraciclina, doxiciclina (Dox), clorotetraciclina, oxitetraciclina, epioxitetraciclina, cianotetraciclina, demeclociclina, meclociclina, metociclina y otros de los que han sido descritos por Hlavka y Boothe, "The Tetracyclines" en "Handbook of Experimental Pharmacology 78, R. K. Blackwood et al. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-New York, 1985; L. A. Mitscher, "The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics", Medicinal Research 9, Dekker, N.Y., 1978; Noyee Development Corporation, "Tetracycline Manufacturing Processes" Chemical Process Reviews, Park Ridge, N.J., 2 volumes, 1969; R. C. Evans, "The Technology of the Tetracyclines", Biochemical Reference Series 1, Quadrangle Press, New York, 1968; y H. F. Dowling, "Tetracycline", Antibiotic Monographs, no. 3, Medical Encyclopedia, New York, 1955.

En una realización particular el análogo de tetraciclina es doxiciclina.

En una forma preferida de realización, el activador transcripcional activable por tetraciclinas puede ser el denominado proteína represora de tetraciclina reversa, o tetR reverso, que se refiere a un polipéptido que (i) muestra afinidad específica por el agente inductor, (ii) muestra afinidad específica por el elemento de respuesta del tipo tet cuando se encuentra unido al agente inductor y (iii) se desplaza del elemento tet cuando no se encuentra unido al agente inductor. Este activador incluye tanto formas naturales del mismo como derivados funcionales. En una forma preferida de realización, el activador regulable por tetraciclina puede ser el denominado transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA) caracterizado porque en presencia de tetraciclina o de sus análogos sufre un cambio conformacional que le permite convertirse en activador de la transcripción, siendo inactivo en ausencia de tetraciclina. De esta forma se evitan los problemas asociados con los transactivadores derivados del represor TetR de E.coli que es capaz de activar la transcripción de genes que presentan elementos de respuesta a tetraciclina en ausencia de tetraciclina y que, en presencia de tetraciclina, dejarían de activar. Los transactivadores reversos dependiente de tetraciclina (rtTA) incluyen, preferiblemente, el transactivador rtTA o cualquiera de las variantes de rtTA descritas por Urlinger, S. *et al.* (Proc.Natl.Acad.Sci USA, 2000; 97:7963–7968). En una forma preferida de realización, la variante de rtTA es la

variante conocida como rtTA2sM2, caracterizada en que requiere para su activación una concentración de doxiciclina 10 veces menor que la que requiere el rtTA original. El transactivador rtTA2sM2 es un polipéptido codificado por el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO: 16.

5

El término “promotor constitutivo” ha sido descrito previamente en relación con el polinucleótido de la invención.

10

La secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional unido operativamente a un promotor constitutivo puede incorporarse a la célula de la invención mediante técnicas bien conocidas tal como infección, transducción, transfección, electroporación y transformación usando dicha secuencia de ADN aislada, incorporada en liposomas artificiales o formando parte de un vector de expresión.

15

En una forma preferida de realización, la secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional unido operativamente a un promotor constitutivo está integrada en el genoma de la célula de la invención.

20

En una realización particular, la secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional comprende adicionalmente un gen de selección operativamente asociado a la secuencia que codifica dicho activador transcripcional mediante un IRES o mediante una secuencia que codifica un un sitio de corte proteolítico post-traducciona. El término gen de selección ha sido definido previamente en relación con el polinucleótido de la invención. En una realización preferida, el gen de selección que forma parte de la secuencia de ADN que

25

codifica un activador transcripcional es un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a higromicina. El gen de selección está unido operativamente al mismo promotor que el activador transcripcional, estando dicho gen de selección y dicho activador transcripcional separados por un IRES. Los términos “IRES” y “secuencia que codifica un un sitio de corte proteolítico post-traducciona” han sido previamente descritos en relación

30

con el polinucleótido de la invención. En una realización particular, la secuencia que codifica un un sitio de corte proteolítico post-traducciona es una secuencia que codifica una autoproteasa, preferiblemente la autoproteasa 2A de FMDV.

Primer método “in vitro” para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés

35

Cuando el polinucleótido de la invención comprende una secuencia heteróloga que comprende la secuencia de un gen de interés, dicho polinucleótido, o un vector que comprende dicho polinucleótido, puede ser utilizado para generar una célula que es capaz de expresar dicho gen de interés. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro*, en adelante primer método de la invención, para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés que comprende

- (i) poner en contacto una célula con el polinucleótido de la invención, en donde dicho polinucleótido comprende adicionalmente dicho gen de interés unido operativamente al promotor subgenómico del replicón, o con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido y
- (ii) seleccionar las células que han incorporado dicho polinucleótido o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido.

El término "*in vitro*", tal y como aquí se utiliza, se refiere a que el método no se lleva a cabo sobre el cuerpo de un sujeto, humano o animal, sino sobre células aisladas a partir de dicho sujeto.

La etapa (i) del primer método de la invención implica poner en contacto una célula con el polinucleótido de la invención, que comprende adicionalmente el gen de interés unido operativamente al promotor subgenómico del replicón, o con un vector que comprende dicho polinucleótido. Esta etapa tiene como resultado que el polinucleótido, o el vector que comprende dicho polinucleótido, se incorpora dentro de la célula, y puede ser llevada a cabo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia para introducir polinucleótidos o vectores en una célula. Ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas que pueden ser empleadas para introducir polinucleótidos o vectores en una célula incluyen infección, transducción, transfección, electroporación y transformación usando el polinucleótido de la invención aislado, incorporado en liposomas artificiales o formando parte del vector de expresión mencionado anteriormente.

La etapa (ii) del método comprende seleccionar aquellas células que han incorporado el polinucleótido de la invención, que comprende adicionalmente el gen de interés unido operativamente al promotor subgenómico del replicón o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido. Dicha selección puede ser llevada a cabo mediante cualquier técnica adecuada conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden obtenerse clones a partir de las células resultantes de la etapa (i) del primer método de la invención mediante, por ejemplo, dilución límite de dichas células tal y como se detalla en

los ejemplos. Dichos clones pueden analizarse para detectar la incorporación del polinucleótido de la invención mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia adecuada para la detección de secuencias concretas de polinucleótidos, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, o bien puede analizarse la presencia de una proteína codificada por el polinucleótido de la invención mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia adecuada para la detección de proteínas, por ejemplo, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunoblotting, etc.

En el caso de que el polinucleótido de la invención comprenda un gen de selección, la selección puede ser llevada a cabo poniendo las células en condiciones restrictivas en función del tipo de gen de selección, es decir, en condiciones en las cuales la expresión del gen de selección suponga una ventaja para las células. Por ejemplo, si el polinucleótido de la invención comprende un gen de selección que permite sintetizar un nutriente, la selección de la etapa (ii) del primer método de la invención comprenderá poner a las células en un medio de cultivo que carece de dicho nutriente. En el caso de que el polinucleótido de la invención comprenda un gen de selección cuya expresión confiere resistencia a un antibiótico, la selección de la etapa (ii) del primer método de la invención comprenderá poner a las células en un medio de cultivo que comprende dicho antibiótico para el cual otorga resistencia el gen de selección.

En una realización particular del primer método de la invención, el polinucleótido de la invención comprende un gen de resistencia que confiere resistencia a un antibiótico, preferiblemente neomicina o puromicina, por lo que la etapa (ii) del método comprende poner a las células en un medio de cultivo que contiene neomicina o puromicina, según corresponda.

En una realización particular, la secuencia reguladora de la transcripción que está operativamente unida a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus es una secuencia regulable, por lo que el primer método de la invención comprende adicionalmente las etapas de

- (iii) introducir en dicha célula un polinucleótido que codifica un activador transcripcional específico para dicha secuencia reguladora de la transcripción y
- (iv) seleccionar las células que hayan incorporado dicho polinucleótido que codifica un activador transcripcional específico para dicha secuencia reguladora de la transcripción.

Los términos “activador transcripcional” y “secuencia reguladora de actividad regulable” han sido descritos previamente en relación con el polinucleótido y célula de la invención.

- 5 En una forma preferida de realización del primer método de la invención, el activador transcripcional es un activador transcripcional regulable por un ligando, preferiblemente un activador transcripcional regulable por tetraciclina o un análogo de tetraciclina, y la secuencia reguladora de la transcripción regulable por dicho activador transcripcional, que está operativamente unido a la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus,
10 es una secuencia regulable por tetraciclina o un análogo de tetraciclina.

En una forma más preferida de realización, el activador transcripcional es un activador transcripcional regulable por doxiciclina.

- 15 En una forma de realización aún más preferida, el activador transcripcional regulable por doxiciclina es el activador transcripcional que se localiza aguas abajo del promotor del gen PGK, tal y como ha sido descrito por Urlinger (Urlinger *et al.*, supra) o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
- 20 En una realización todavía más preferida, el activador transcripcional regulable por doxiciclina comprende la secuencia SEQ ID NO: 16.

- Las etapas (iii) y (iv) pueden llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente en relación con las etapas (i) y (ii) del primer método de la
25 invención. Las etapas (iii) y (iv) pueden llevarse a cabo simultáneamente, antes o después de las etapas (i) y (ii).

- En una realización particular del primer método de la invención, el polinucleótido de la invención comprende un primer gen de selección y el polinucleótido que codifica un
30 activador transcripcional específico para el promotor regulable comprende un segundo gen de selección, por lo que la etapa (ii) de selección de las células que han incorporado de forma estable el polinucleótido de la invención que comprende adicionalmente un primer gen de selección y la etapa (iv) de selección de las células que han incorporado de forma estable el polinucleótido que codifica un activador transcripcional y que adicionalmente comprende
35 un segundo gen de selección se llevan a cabo en condiciones selectivas para las células que expresen dicho primer y/o segundo gen de selección.

En una realización particular, el primer y el segundo gen de selección son genes que confieren resistencia a un antibiótico. Preferiblemente, el primer y el segundo gen de selección son diferentes. En una realización particular, el primer gen de selección se selecciona del gen que confiere resistencia a neomicina y el gen que confiere resistencia a puromicina. En una realización particular, el segundo gen de selección es el gen que confiere resistencia a higromicina. En una realización particular, el primer gen de selección se selecciona del gen que confiere resistencia a neomicina y el gen que confiere resistencia a puromicina y el segundo gen de selección es el gen que confiere resistencia a higromicina.

Método para expresar un gen de interés

La célula de la invención puede comprender un polinucleótido, o un vector que comprende dicho polinucleótido, que comprende una secuencia heteróloga de un gen de interés y, por tanto, dicha célula puede ser empleada para expresar dicho gen de interés. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para expresar un gen de interés, en adelante método para expresar un gen de interés de la invención, que comprende poner la célula de la invención, en donde dicha célula comprende el polinucleótido de la invención que además comprende adicionalmente la secuencia del gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico del replicón, o con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido, en condiciones adecuadas para la activación de la transcripción de la secuencia complementaria al replicón alfaviral.

Las condiciones adecuadas para la activación de la transcripción de la secuencia de ADN complementaria al replicón alfaviral dependerán del tipo de secuencia reguladora de la transcripción a la que está unida operativamente dicha secuencia complementaria al replicón alfaviral. Así, cuando la secuencia de ADN complementaria al replicón alfaviral está unida operativamente a una secuencia reguladora de actividad constitutiva, dichas condiciones adecuadas comprenderán las condiciones habituales de cultivo de la célula. Dichas condiciones dependerán del tipo de célula y son conocidas por el experto en la materia. En una realización particular, las células son células BHK y las condiciones de cultivo son las que figuran en los ejemplos. Cuando la secuencia de ADN complementaria al replicón alfaviral está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción de actividad regulable, dichas condiciones comprenderán condiciones adecuadas para la activación de dicha secuencia reguladora, y variarán dependiendo del tipo de secuencia reguladora. Por ejemplo, en una forma de realización, la secuencia reguladora de la

transcripción que controla la expresión del replicón alfaviral es una secuencia regulable por un ligando en presencia de un activador transcripcional específico, por lo que dichas condiciones comprenden poner en contacto la célula con dicho ligando o un precursor del mismo. En una forma de realización preferida, la secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia de ADN complementaria al replicón del alfavirus es una secuencia regulable por tetraciclina o un análogo de tetraciclina, por ejemplo doxiciclina, y las condiciones adecuadas para la activación de dicha secuencia reguladora comprenden poner en contacto la célula con tetraciclina o un análogo de tetraciclina, por ejemplo doxiciclina.

El experto en la materia determinará el tiempo necesario que las células deben estar en contacto con el ligando así como la concentración necesaria del mismo para que tenga lugar la expresión del gen de interés. A modo orientativo, en el caso de que el ligando sea doxiciclina, las células se pondrán en contacto con doxiciclina durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 horas y 120 horas, preferiblemente 96 horas, a una concentración de doxiciclina comprendida entre 0.25 y 10 µg/ml, preferiblemente entre 1 y 2,5 µg/ml, más preferiblemente a 1,25 µg/ml, y a una temperatura de entre 28°C y 40°C, preferiblemente de entre 30°C y 35°C, más preferiblemente a 33°C. En una realización particular, las células se ponen en contacto con doxiciclina a una concentración de 1,25µg/ml, durante 96 horas y a una temperatura de 33°C.

En una forma de realización, las condiciones adecuadas para activar la transcripción de la secuencia de ADN complementaria al replicón alfaviral son aquellas que permiten la expresión del gen de interés. La expresión del gen de interés puede ser determinada mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, si el gen de interés codifica una proteína de interés, la expresión de dicho gen puede determinarse mediante la detección de dicha proteína, empleando para ello cualquier técnica habitualmente usada por el experto en la materia para detectar proteínas como inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunoblotting, ELISA, etc. En el caso de que dicha proteína comprenda una secuencia etiqueta, ésta puede ser empleada para detectar la proteína de interés y diferenciarla de una posible expresión endógena de dicha proteína. La proteína de interés también puede ser detectada mediante un ensayo que permita detectar una actividad biológica de dicha proteína, tal como consta en los ejemplos para las proteínas cardiotrofina-1 y oncostatina-M. En el caso de que el gen de interés, una vez transcrito, dé lugar a un ARN capaz de hibridar con la secuencia de un ARN mensajero inhibiendo su expresión, como por ejemplo, un ARN de interferencia pequeño, un micro ARN o un ARN en

horquilla pequeño, la expresión del gen de interés se puede detectar mediante la detección de dicho ARN mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia adecuada para la detección de este tipo de ARN, incluyendo métodos genéricos para la detección de ácidos nucleicos, especialmente ARN y métodos optimizados para la detección de especies de ARN pequeñas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de métodos que pueden ser empleados para detectar este tipo de ARN incluyen:

- a. Métodos basados en hibridación, como análisis por Northern blot e hibridación *in situ*.
- b. RT-PCR en tiempo real multiplex y/o singleplex
- c. Detección de moléculas individuales tal como se describe por Neely, *et al.*, Nat. Methods. 3(1):41-6 (2006) y en los documentos US 6.355.420; US 6.916.661 y US 6.632.526;
- d. Métodos de citometría de flujo a base de perlas tal como se describen por Lu, *et al.*, Nature 435:7043 (2005) y en el documento US 6.524.793; y
- e. Ensayos que usan matrices de ácidos nucleicos tal como se describen por Nelson, *et al.*, Nat. Methods 1(2):155-61 (2004); Wu, *et al.*, RNA 13(1):151-9 (2007) y en los documentos US 6.057.134; US 6.891.032; US 7.122.303; US 6.458.583; US 6.465.183; US 6.461.816; US 6.458.583; US 7.026.124; US 7.052.841; US 7.060.809; US 6.436.640 y US 7.060.809.

Segundo vector de la invención

Una vez que se ha obtenido una célula que ha incorporado en su genoma el nucleótido de la invención comprendiendo una secuencia heteróloga, por ejemplo, la secuencia de un gen de interés, es posible intercambiar dicha secuencia heteróloga por una segunda secuencia heteróloga, por ejemplo, un segundo gen de interés, de forma que se obtenga una célula capaz de expresar el segundo gen de interés. Para llevar a cabo dicha sustitución de la primera secuencia heteróloga por la segunda secuencia heteróloga, se puede emplear un vector de expresión "lanzadera" o *shuttle* que comprende la segunda secuencia heteróloga flanqueada por secuencias de reconocimiento para una recombinasa capaces de recombinar con las secuencias de reconocimiento para recombinasa presentes en el polinucleótido que está integrado en la célula diana. En este sentido, la invención se relaciona con un vector, en adelante segundo vector de la invención, que comprende una secuencia de ADN que comprende, ordenados en la dirección 5' a 3',

- (i) una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio,

- (ii) una secuencia de un gen de interés,
- (iii) una secuencia 3' necesaria para la replicación de un alfavirus,
- (iv) una secuencia de terminación de la transcripción,
- (v) una secuencia de un gen de selección unida operativamente a un promotor
y
- (vi) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio.

Los términos “vector”, “secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio”, “gen de interés”, “secuencia 3' necesaria para la replicación de un alfavirus”, “secuencia de terminación de la transcripción”, “gen de selección”, “promotor” y “operativamente unido”, han sido descritos previamente, así como realizaciones particulares y preferidas de los mismos.

En una realización particular, el segundo vector de la invención no comprende una señal de poliadenilación entre la secuencia del gen de selección (v) y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio (vi). Esto permite que, en el caso de que la región comprendida entre las dos secuencias de reconocimiento para una recombinasa se integren al azar en cualquier sitio del genoma de la célula diferente a la región adecuada, el gen de selección no se exprese adecuadamente al carecer de la señal de poliadenilación. De esta forma, únicamente aquellas células en las que la región del segundo vector de la invención comprendida entre las dos secuencias de recombinación se integre en la región adecuada, es decir, en la región comprendida entre las dos secuencias de recombinación presentes en el polinucleótido de la invención integrado en el genoma de dicha célula, serán seleccionadas cuando dichas células se pongan en condiciones selectivas para el gen de selección comprendido en el segundo vector de la invención.

En una realización particular, el segundo vector de la invención adicionalmente comprende al menos una secuencia de un gen de interés adicional, por ejemplo, dos, tres o más secuencias de genes de interés adicionales. En esta realización particular, la secuencia del gen de interés adicional puede estar:

- a. separada de la secuencia del primer gen de interés por un IRES o por una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona, de tal forma que cuando el fragmento de ADN comprendido entre los sitios de reconocimiento de la recombinasa se integre en la célula diana tanto el primer

gen de interés como el gen o genes de interés adicional quedarán operativamente unidos al promotor subgenómico del alfavirus, o

- b. unida operativamente a un promotor subgenómico situado entre la secuencia del gen de interés (ii) y la secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus (iii).

5

Los términos "IRES" y "secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona" han sido descritos previamente en relación con el nucleótido de la invención. En una realización preferida, la secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona es una secuencia que codifica una autoproteasa, preferiblemente la autoproteasa 2A de FMDV.

10

En una realización particular, la secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus procede del Semliki Forest Virus.

15

En una realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias LoxP.

El término "secuencia LoxP" ha sido descrito previamente en relación con el polinucleótido de la invención.

20

En una realización preferida, la primera y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas, es decir, son secuencias diferentes que no pueden recombinar entre sí en presencia de dicha recombinasa específica.

25

En otra realización preferida, la primera y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias que incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional, es decir, que una vez que tiene lugar la recombinación, la secuencia flanqueada por los sitios de recombinación ya no puede escindirse mediante una nueva recombinación.

30

En una realización preferida, la primera y la segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas y adicionalmente incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional.

35

En una realización aún más preferida, la primera y la segunda secuencia LoxP se seleccionan del grupo formado por las parejas:

- (a) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10
- (b) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12
- 5 (c) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12
- (d) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10
- (e) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9
- (f) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11
- (g) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11
- 10 (h) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9

En una realización particular, el gen de interés es un gen que codifica una proteína de interés o un precursor de la misma. En una realización particular del segundo vector de la invención, la proteína de interés es una proteína fluorescente, preferiblemente la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés, *green fluorescent protein*). En otra realización particular, la proteína de interés es cardiotrofina-1. En otra realización particular, la proteína de interés es oncostatina-M. En otra realización particular, la proteína de interés es un anticuerpo de cadena sencilla o la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo, preferiblemente la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo A20.

20 En una realización particular, la proteína de interés adicionalmente comprende una secuencia etiqueta. El término "secuencia etiqueta" ha sido previamente descrito.

25 *Segundo método "in vitro" para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés*

El segundo vector de la invención puede ser empleado para sustituir una primera secuencia heteróloga, por ejemplo, un primer gen de interés, en la célula de la invención por una segunda secuencia heteróloga, por ejemplo un segundo gen de interés, mediante recombinação. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés, en adelante segundo método de la invención, que comprende las etapas de:

- (i) introducir en la célula de la invención el segundo vector de la invención, en donde:
 - 35 (a) dicha célula comprende una secuencia heteróloga en posición 3' respecto al promotor subgenómico del replicón, en donde dicha secuencia

heteróloga es una secuencia de un gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico, o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido,

(b) la primera secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la primera secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector,

(c) la segunda secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la segunda secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector

(d) la célula expresa una recombinasa específica de dichas primeras y segundas secuencias de reconocimiento y,

(e) la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus presente en el vector coincide con la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus que forma parte del replicón alfaviral,

(ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir la sustitución mediante recombinación específica de sitio del gen de interés que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus por el gen de interés que forma parte del segundo vector de la invención y

(iii) seleccionar las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés.

Todos los términos han sido descritos anteriormente en relación con los otros aspectos de la invención.

Según el segundo método de la invención, la célula expresa una recombinasa específica para las secuencias de reconocimiento presentes en el segundo vector de la invención y en el polinucleótido de la invención. La expresión de dicha recombinasa puede ser endógena en la célula o bien puede conseguirse introduciendo en la célula una recombinasa exógena, por ejemplo, incorporando a la célula un polinucleótido o vector que comprende una secuencia que codifica dicha recombinasa.

Los métodos para introducir en la célula polinucleótidos o vectores han sido previamente descritos.

La etapa (ii) del segundo método de la invención comprende mantener a las células en condiciones adecuadas para permitir la sustitución mediante recombinación del gen de interés que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus por el gen de interés que forma parte del segundo vector de la invención. Dichas condiciones variarán dependiendo del tipo de célula y de las secuencias concretas, y pueden ser determinadas por el experto en la materia mediante experimentación rutinaria. A modo ilustrativo, dichas condiciones comprenden mantener a las células en un medio de cultivo adecuado, que variará dependiendo del tipo celular y es conocido por el experto en la materia, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 hora y 48 horas. El experto en la materia sabe cómo determinar si se ha producido la sustitución de la primera secuencia heteróloga, por ejemplo el primer gen de interés, por la segunda secuencia heteróloga, por ejemplo, el segundo gen de interés. Por ejemplo, se puede determinar que la sustitución ha ocurrido correctamente si la célula ha adquirido la resistencia proporcionada por el gen de selección que forma parte del segundo vector de la invención, siempre que dicho gen de selección sea diferente al gen de selección que forma parte del polinucleótido de la invención que estaba comprendido en la célula. Adicionalmente, también es posible determinar que la sustitución ha ocurrido correctamente mediante PCR del ADN genómico, RT-PCR de ARN del vector de alfavirus o, alternativamente, si se detecta en la célula, mediante alguno de los métodos enumerados anteriormente, expresión del segundo gen de interés junto con pérdida de expresión del primer gen de interés

La etapa (iii) del segundo método de la invención comprende seleccionar las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés. Dicha selección puede llevarse a cabo tal y como se ha explicado anteriormente en relación con la etapa (ii) del primer método de la invención. En una realización particular, la etapa de selección de las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés se lleva a cabo mediante selección por medio del gen de selección que forma parte del segundo vector de la invención, en donde dicho gen de selección es distinto al que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus. En una realización aún más particular, el polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus comprende un gen de selección que otorga resistencia a neomicina, mientras que el segundo vector de la invención, que comprende el segundo gen de interés, comprende un gen de selección que otorga resistencia a puomicina; en este caso, la selección de las células

en las que se ha reemplazado el primer gen de interés por el segundo gen de interés se lleva a cabo poniendo en contacto dichas células con puromicina.

5 En una realización particular, si el gen de selección que forma parte del segundo vector de la invención carece de señal de poliadenilación, entonces la célula comprende una señal de poliadenilación en posición 3' respecto a la segunda secuencia de reconocimiento de recombinasa específica de sitio. De esta forma, una vez que las secuencias de reconocimiento de recombinasa presentes en el segundo vector de la invención hayan recombina-
10 do con las secuencias de reconocimiento presentes en la célula, y por tanto se haya reemplazado el primer gen de interés, integrado en el genoma celular, por el segundo gen de interés, presente en el segundo vector de la invención, el gen de selección que forma parte de dicho vector se integrará en la célula en posición 5' respecto a la señal de poliadenilación que está en posición 3' respecto a la segunda secuencia de reconocimiento de recombinasa específica de sitio presente en la célula, de forma que dicho segundo gen
15 de selección se podrá expresar adecuadamente.

En una realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas, es decir, son secuencias diferentes que no pueden recombinar entre sí en presencia de dicha recombinasa.

20 En otra realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias que incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional, es decir, que una vez que tiene lugar la recombinación, la secuencia flanqueada por los sitios de recombinación ya no puede escindirse mediante una
25 nueva recombinación.

En una realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas y adicionalmente incorporan mutaciones que hacen que la recombinación sea unidireccional.

30 En una realización preferida, las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas LoxP y la recombinasa específica de sitio es la recombinasa Cre.

35 En una realización particular,

- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 9, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 10 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 11, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 12;
- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 9, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 12 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 11, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 10 ;
- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 10, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 9 y la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 12, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 11 y
- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 10, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 11 y la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 12, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 9.

La invención se explica a continuación por medio de los siguientes ejemplos que tienen un carácter puramente ilustrativo y en ningún caso limitativo de la invención.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Cultivo celular

La línea celular BHK-21 (ATCC: CCL-10) se cultivó en medio mínimo esencial de Glasgow (Glasgow-MEM, Gibco BRL, UK) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), 10% de “tryptose phosphate broth” (TPB), glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, estreptomicina 100 µg/ml y penicilina 100 IU/ml (medio BHK completo). Las líneas celulares Huh7 y HepG2 (ATCC-HB8065) fueron incubadas en Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM, estreptomicina 100 µg/ml y penicilina 100 IU/ml. Las células BHK adaptadas a crecer en suspensión fueron cultivadas medio de cultivo SMEM (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 10% de FBS, 10% de TPB, glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 IU/ml y ácido plurónico F-68 al 0.1% (Gibco BRL, UK) (medio SMEM completo) o en EX-CELL™ CD CHO, suplementado con 10% de TPB, glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 IU/ml y ácido plurónico F-68 al 0.1% (medio libre de suero). Las transfecciones fueron realizados utilizando Lipofectamine (Gibco BRL, Rockville, MD) diluida en Opti-MEM® Reduced-Serum Medium (Gibco-BRL), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la selección de las diferentes líneas celulares estables, el medio de cultivo fue suplementado con higromicina B (Invitrogen), neomicina (G418, Gibco BRL), o puromicina (Sigma, St. Louis, MO) a 250 µg/mL, 750 µg/mL y 5 µg/mL, respectivamente, agregadas 24h después de la transfección. Para los estudios de inducción, las células adherentes fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos e incubadas en presencia de DOX durante 96-120h. En caso de las células en suspensión, la DOX fue agregada directamente a un cultivo de 2.5×10^5 células/mL y las incubaciones en presencia del inductor se realizaron durante 10 días.

Plásmidos

30

Consideraciones generales

Todos los fragmentos de PCR fueron generados utilizando *Pfu* o *Pfu* Turbo (Invitrogen) y los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4. Estos fragmentos se purificaron usando el Gel Extraction Kit (Quiagen), se adenilaron y clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega), se secuenciaron y finalmente se subclonaron en los plásmidos indicados utilizando los sitios de restricción señalados.

35

Nº de oligo		Identificador de secuencia		Orientación 5'-3' ^a	Secuencia ^b	Enzima de restricción
1	SEQ ID NO: 17		F		CCCGGGATGAAAAAGCCTGAACTCA	XmaI
2	SEQ ID NO: 18		R		GCGGCCGCCTATTCTTTTGGCCCTCGGAC	NotI
3	SEQ ID NO: 19		F		ATGGCGGATGTGTGACATACACG	-
4	SEQ ID NO: 20		R		GCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCGTGGTGGTTAATCTCTCGCGTAG	-
5	SEQ ID NO: 21		F		ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	-
6	SEQ ID NO: 22		R		ACTAGTCTTAAAGATACATTGATGAGTTTGG	SpeI
7	SEQ ID NO: 23		F		ATGCATCGCGATAGCGGTACCGAGCTCTTACGCTCGAGT	Nsil - NruI
8	SEQ ID NO: 24		R		GGTGGCAGGAGCTGGAACAAAAATCTTTTGGCGTCGTGTATGTCACACA TCCGCCAT	-
9	SEQ ID NO: 25		R		ATCGTGTGTGCAGAAAGACTCGCTC GGTGGCAGGAGCTGGAACAAAAATCTTTTGGCGTCGTGTATGTCACACA TCCGCCAT	-
10	SEQ ID NO: 26		R		GATCGTGTGTGCAGAAAGACTCGCTC GGTGGCAGGAGCTGGAACAAAAATCTTTTGGCGTCGTGTATGTCACACA TCCGCCAT	-
11	SEQ ID NO: 27		F		ATGTCGTGTGTGCAGAAAGACTCGCTC AGAGCTCGGCCGCCCTCGGCCCTCTGA	SacI - SfiI
12	SEQ ID NO: 28		R		ATGCATGGCGGTAATACGGTTA	Nsil
13	SEQ ID NO: 29		F		ATGGCGGATGTGTGACATACACG	-
14	SEQ ID NO: 30		R		GGGCCCCGATATCCAAGATGAGTGTGTC	Apal - EcoRV
15	SEQ ID NO: 31		R		ACTAGTATAA CTTCGTATAGTACACATTATACGAACGGTAGTGGCGGA AGAACTCC AGCATG	SpeI
16	SEQ ID NO: 32		F		GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	BamHI
17	SEQ ID NO: 33		R		CCCGGGATCTTAATTAATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA	XmaI – PacI
18	SEQ ID NO: 34		F		GATCTACCGTTCGTATAAAGTATCCTATACGAAGTTATC	-
19	SEQ ID NO: 35		R		GATCGATAA ACTTCGTATAGGATACTTTTATACGAACGGTA	-
20	SEQ ID NO: 36		F		CATATGTACCGTTTCGTATAAAGTATCCT	NdeI

21	SEQ ID NO: 37	R	ACTAGT GCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCG	SpeI
22	SEQ ID NO: 38	F	GATATC GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAG	EcoRV
23	SEQ ID NO: 39	R	GCGGCG CTTACGACACCTGAAATGGAAGAAAAAAGCTTTGAA	NotI
24	SEQ ID NO: 40	F	TATAACTTCGTATAAAGTATCCTATACGAACGGTATCTAGATCTCGCG AGCTCAGCCATATG	-
25	SEQ ID NO: 41	R	TATGGCTGAGCTCGCGAGATCTAGATACCGTTCGTATAGGATACTTTA TACGAAGTTAT	-
26	SEQ ID NO: 42	F	CATATG TTAGGGTAGGCAATGGCATTGA	NdeI
27	SEQ ID NO: 43	R	CAGCTG CTGGCTTAACTATGCGGCATC	PvuII
28	SEQ ID NO: 44	F	CATGGGATCATAACTTCGTATAATGTGTACTATACGAACGGCCATG	-
29	SEQ ID NO: 45	R	GATCCATGGCCGTTCGTATAGTACACATTATACGAAATTATGATCC	-
30	SEQ ID NO: 46	F	AGATCT GCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	BglII
31	SEQ ID NO: 47	R	CATATG TTACTTTACAGCTCGTCCATG	NdeI
32	SEQ ID NO: 48	F	AGATCT GCACCATGTGCGGCCCTGCTGATCCTGG	BglII
33	SEQ ID NO: 49	R	CATATG TCAGCCGAGCCCCCGGGCAG	NdeI
34	SEQ ID NO: 50	F	GGATCC <u>TGCGGAG</u> CACCATGTGCGGCCCTGCTGATCCTGGCCCTGGTCG GAGCCGCCGTGCCCCACCAACCAACCAACCGGGCTATAGGCAGCT GCTCG	BamHI - NruI
35	SEQ ID NO: 51	R	GGATCC <u>ATATGCTATCTCCGGCTCCGGTTCGGGGC</u>	BamHI - NdeI
36	SEQ ID NO: 52	F	CCTAGGGGGACATTAAAGCGTTTAAAG	-
37	SEQ ID NO: 53	R	GTCCCTCCTTGAAAGTCGATGC	-
38	SEQ ID NO: 54	R	CGACATGGTGCAGATCTAGA	-
39	SEQ ID NO: 55	R	CCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCC	-
40	SEQ ID NO: 56	F	TGCTCCTGCCGAGAAAAGTAT	-
41	SEQ ID NO: 57	F	AAGCTTCCGCCACGACCGGTGCCG	-
42	SEQ ID NO: 58	F	CTGTTCTCGACGCGTCGTC	-
43	SEQ ID NO: 59	R	GAGGTGTTTCCACGACCC	-
44	SEQ ID NO: 60	F	GGGATGTTTGCTCCAACCAA	-
45	SEQ ID NO: 61	R	GGCCTTTTGACTCAAGGATTTAA	-
46	SEQ ID NO: 62	R	TGCTTGTCGGCCATGATATA	-
47	SEQ ID NO: 63	R	GAACCTCAGGGTCAGCTTGC	-
48	SEQ ID NO: 64	R	AACTTGTCGGCCGTTTACGTC	-

49	SEQ	ID	NO:	65	F	AGATCT CACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG	BglII
50	SEQ	ID	NO:	66	R	CCAAATCTAGGACCGCCGTAGAGGTTTAAACACTCATTCCTGTTGAAGCT	-
51	SEQ	ID	NO:	67	F	ACCTCTACGGCGGTCCCTAGATTGGTGC GTTAATACACAGAATTC TGAT	-
52	SEQ	ID	NO:	68	R	TGCACCATGGCATGGAACTTCATCATGGTC CATATG CTATTACCCGGAGTCCGGGAG	NdeI

^aF, forward (sentido); R, reverse (antisentido)
^bLos sitios de restricción indicados en la última columna se indican en negrita, cursiva o subrayados

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para clonajes y reacciones de PCR

pPGK-TA-ires-Hyg

El gen que confiere resistencia a higromicina fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos 1 y 2, utilizando el plásmido pTK-Hyg (Clontech) como molde, y clonado en pIRES (Clontech) a continuación de la secuencia de entrada interna del ribosoma (internal ribosome entry site, IRES) del virus de la encefalomiocarditis (ECMV), utilizando los sitios de restricción Xma I y Not I. De este modo fue generado el vector pIRES-Hyg. El gen que codifica para el transactivador rtTas2M2 (Urlinger, Baron et al. 2000) fue clonado bajo el control transcripcional del promotor PGK y fusionado a la construcción previa que contiene el casete IRES-higromicina del plásmido pIRES-Hyg, utilizando los sitios Xho I y Mlu I, para generar el plásmido pPGK-TA-ires-Hyg (Figura 1).

piPalb-GFP

Para fusionar los primeros 85 nucleótidos de la región 5' no traducida (5'UTR) de SFV y el gen GFP se realizó una PCR cruzada. La primera PCR fue llevada a cabo utilizando como molde el plásmido pSFV-1 (Liljestrom y Garoff. 1991, Biotechnology (N Y). 1991 9:1356-61) y los oligonucleótidos 3 y 4. La segunda PCR fue realizada con los oligonucleótidos 5 y 6, utilizando el plásmido pCMV-GFP (Clontech) como molde. Los fragmentos resultantes de ambas reacciones fueron purificados, mezclados en cantidades equimolares y utilizados como molde de la PCR cruzada con los oligonucleótidos 3 y 6, para obtener un fragmento de 1057 pares de bases (pb) que contiene la región 5'UTR de SFV, GFP y la señal de poliadenilación de SV40 (Fragmento 5'-UTR-SFV-GFP-SV40PolyA). Para colocar este fragmento bajo el control transcripcional de promotores tetO7-pAlb de diferentes longitudes se realizó una nueva PCR cruzada. Primero, los fragmentos que contienen los diferentes promotores fueron generados utilizando el oligonucleótido 7 en combinación con los oligonucleótidos 8, 9 y 10, utilizando como molde el plásmido AAV8-Tet_{bidir}-Alb-CMV_m-luc (Vanrell et al. 2011. Mol Ther. 19:1245-53). Las PCRs cruzadas fueron realizadas utilizando como molde estos fragmentos junto al fragmento 5'-UTR-SFV-GFP-SV40PolyA, y los oligonucleótidos 6 y 7. Los fragmentos así obtenidos fueron clonados en pGEM-T-easy, generando los plásmidos piPalb-172-GFP, piPalb-173-GFP y piPalb-174-GFP, que contienen la secuencia 5'UTR SFV ubicada a 172, 173 y 174 nucleótidos del inicio del promotor mínimo de albúmina, respectivamente, seguida del gen de GFP y de la señal de poliadenilación. Por otra parte, en estas construcciones el gen GFP está localizado en la posición de inicio del marco abierto de lectura de la replicasa de SFV.

i-ncSFV-GFP

Primero se generó por PCR un fragmento de 2078 pb que contiene el gen que confiere resistencia a neomicina, seguido de la señal de poliadenilación de la timidina quinasa y el origen de replicación pUC (neo-polyA-ori), utilizando como molde pSFV-1 y los oligonucleótidos 11 y 12. Este fragmento fue clonado en pGEM-T-easy y denominado pGEM-A1. Por otra parte, la fusión entre el promotor tetO7-Palb que contiene los primeros 174 pb del promotor mínimo de albúmina y el fragmento 5' de SFV que incluye los primeros 280 nucleótidos del replicón fue generado por PCR cruzada. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos 7 y 10 utilizando como molde el plásmido piPalb-174-GFP. La segunda PCR se llevó a cabo con los oligonucleótidos 13 y 14 sobre el plásmido pSFV-1. Los dos fragmentos fueron purificados, mezclados y utilizados como molde para la PCR cruzada, con los oligonucleótidos 7 y 14. El producto de PCR fue digerido con Nsi I y EcoR V y el fragmento de 796 pb obtenido fue subclonado en pGEM-A1 digerido con los mismos enzimas, para generar el plásmido pGEM-A2 en el que la secuencia tetO7-Palb-5'UTR-SFV fue unida a la secuencia neo-polyA-ori. pGEM-A2 fue digerido con Sfi I y EcoR V, y el fragmento de 2874 pb fue subclonado en los mismos sitios del plásmido pBK-T-ncSFV-1, derivado del pBK-T-SFV-1 (Berglund *et al.* 1998. Nat Biotechnol. 16:562-5) que contiene las mutaciones P718T y R649H en la subunidad nsp2 de la replicasa (Casales *et al.* 2008. Virology. 376:242-51). De esto modo se generó el vector i-nSFV, en el que la secuencia completa del replicón no citopático de SFV se encuentra bajo el control transcripcional del promotor inducible tetO7-Palb y es seguida del gen que confiere resistencia a la neomicina bajo el control del promotor SV40. Con el objeto de introducir el sitio LoxP2 (ver tabla 2), se generó por PCR un fragmento de 1103 pb que incluye esta secuencia utilizando los oligonucleótidos 11 y 15 y el plásmido pSFV-1 como molde. Este fragmento fue digerido con Spe I y Avr II y subclonado entre los dos sitios Avr II del plásmido i-ncSFV. Por otra parte, se generó un fragmento que contiene el gen GFP por PCR utilizando los oligonucleótidos 16 y 17 y pCMV-GFP como molde,. Este fragmento fue subclonado en los sitios BamH I y Xma I del plásmido i-ncSFV, a continuación del promotor subgenómico de SFV. Finalmente, el sitio LoxP1 (ver tabla 2) fue producido sintéticamente por hibridación de los oligonucleótidos 18 y 19 e insertado en el sitio BamHI para generar el vector i-nsSFV-GFP.

Sitio LoxP	Secuencia	Identificador secuencia
wt	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	SEQ ID NO: 69
1 ^a	TACCG TTCGTATAA <u>AG</u> TATCCTATACGAAGTTAT	SEQ ID NO: 9
2 ^b	TACCG TTCGTATAATGT <u>GT</u> ACTATACGAAGTTAT	SEQ ID NO: 10
3 ^c	ATAACTTCGTATAA <u>AG</u> TATCCTATACGAAC GGTA	SEQ ID NO: 11
4 ^d	ATAACTTCGTATAATGT <u>GT</u> ACTATACGAAC GGTA	SEQ ID NO: 12

Tabla 2. Secuencias LoxP salvaje y mutantes

^a El sitio LoxP1 incluye las mutaciones 62a (Arakawa et al, 2001, *supra*), en negrita, y las mutaciones 2272, subrayadas (Lee and Saito, 1991, *supra*).

^b El sitio LoxP2 incluye las mutaciones 62a, en negrita, y la mutación 5171, subrayada (Lee and Saito, 2001, *supra*).

^c El sitio LoxP3 contiene la mutación 62b, en negrita (Arakawa et al, 2001, *supra*) y la mutación 2272, subrayada.

^d El sitio LoxP4 contiene la mutación 62b, en negrita, y la mutación 5171, subrayada.

iGFP

El vector i-ncSFV-GFP fue digerido con Pac I y Spe I para eliminar la secuencia 3'UTR de SFV, tratado con Klenow y ADN polimerasa T4 para generar extremos romos y religado con DNA ligasa de T4. Utilizando esta construcción, se generó por PCR un fragmento de 3687 pb que contiene las secuencias LoxP1-GFP-SV40PolyA-SV40Prom-neo-LoxP2-TK-PolyA, usando los oligonucleótidos 20 y 21. El fragmento así generado fue subclonado en el vector piPalb174-GFP entre los sitios Nde I and Spe I.

Plásmidos pShuttle-SFV

El promotor EF1a (EF1aP) fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos 22 y 23 y a partir del plásmido AAV-Luc (Berraondo *et al.* 2005. Mol. Ther.12:68-76), obteniéndose un fragmento de 1182 pb que fue subclonado en el plásmido pBS-pac (de la Luna *et al.* 1988. Gene, 62:121-6) en los sitios EcoR V y Not I. De esta forma se generó el plásmido pBS-EF1aP-pac, en el que la expresión de pac es dirigida por EF1aP. La secuencia de LoxP3 (ver tabla 2) seguida de un sitio múltiple de clonado que contiene los sitios de restricción Bgl I, Nru I, Sac I, Bln I y Nde I fue generada por hibridación de los oligonucleótidos 24 y 25, y el fragmento sintético obtenido de 62 pb fue introducido en pBS-EF1aP-pac delante de la secuencia EF1aP-pac utilizando el sitio Nde I y generando de este modo el plásmido pBS-LoxP3-MCS-EF1aP-pac. El fragmento que contiene la secuencia 3'UTR de SFV y la señal de poliadenilación de SV40 fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos 26 y 27 y pSFV-1 como molde, y subclonados entre los sitios Nde I y Pvu II de pBS-LoxP3-MCS-EF1aP-pac. La señal de poliadenilación de SV40 presente al final de la secuencia pac (presente en pBS-pac y diferente a la que se encuentra a continuación de la secuencia 3'UTR de SFV) fue eliminada por digestión con Nco I y BamH I, seguida de la introducción del sitio LoxP4 (ver tabla 2) usando el dímero sintético obtenido por hibridación de los

oligonucleótidos 28 y 29. La secuencia del promotor de SV40 presente en el vector pBS-pac fue eliminada por digestión con EcoR V y Pvu II seguida de religación del plásmido, para obtener finalmente el vector pShuttle-SFV. pShuttle-SFV-Tomato fue generado por inserción del gen Tomato, previamente amplificado del plásmido pCAG-tdTOMATO-IRES-neo, gentilmente cedido por la Dra. Beatriz Pelacho (CIMA, Pamplona), utilizando los oligonucleótidos 30 y 31, en los sitios Bgl II y Nde I de pShuttle-SFV. Para generar el vector pShuttle-SFV-CT, el gen CT-1 fue amplificado utilizando el vector ncSFV-CT1 (Casales *et al.* 2010. N Biotechnol. 27:138-48) y los oligonucleótidos 32 y 33, y el fragmento obtenido fue insertado en los sitios Bgl II y Nde I del vector pShuttle-SFV. pShuttle-SFV-OSM fue generado amplificando el gen de OSM desde un plásmido que contiene la secuencia de la oncostatina M humana (pCR2.1topo-hOSM, gentilmente cedido por la Dra. Esther Larrea, CIMA) utilizando los oligonucleótidos 34 y 35. El fragmento de 671 pb obtenido fue insertado en los sitios Nru I y Nde I de pShuttle-SFV. En esta construcción, los últimos 31 aminoácidos de OSM fueron eliminados para obtener la forma madura de la proteína, y el péptido señal de OSM (primeros 25 aminoácidos) fueron remplazados por el péptido señal de la preprotripsina, para conseguir una secreción óptima. Por otra parte, una secuencia codificante para seis histidinas fue incluida entre el péptido señal y el extremo amino terminal de la OSM madura.

Para obtener el vector pShuttle-SFV-A20, los genes de la cadena ligera y pesada del anticuerpo A20 fueron amplificados a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de células A20 (ATCC TIB-208). Para insertar un promotor subgenómico entre ambas cadenas se realizó una PCR cruzada. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos 49 y 50. La segunda PCR fue realizada con los oligonucleótidos 51 y 52. Los fragmentos resultantes de ambas fracciones fueron purificados, mezclados en cantidades equimolares y utilizados como molde de la PCR cruzada, con los oligonucleótidos 49 y 52, para obtener un fragmento de 2191 pb que contiene la cadena ligera, un promotor subgenómico y la cadena pesada. Este fragmento fue digerido con Bgl II y Nde I y clonado en pShuttle-SFV, utilizando los mismos sitios de restricción.

Clonaje de células por dilución límite

Las células fueron tripsinizadas, lavadas, resuspendidas en medio BHK completo a una concentración final de 5 células/mL, distribuidas en placas de 96 pocillos agregando 100 µL por pocillo e incubadas durante un máximo de cuatro semanas, cambiando el medio de cultivo cada semana. Después de al menos dos semanas de incubación, los pocillos que

contenían una única colonia fueron tripsinizados, resuspendidos en medio y expandidos secuencialmente en placas de 24 pocillos, 6 pocillos, botellas de cultivo de 25 cm² y 75 cm². Los clones seleccionados fueron congelados en medio de congelación (DMSO al 10% en FBS) y almacenados en nitrógeno líquido. Un promedio de 20 clones fueron seleccionados de cada cultivo parental.

Análisis por RT-PCR

Se recogieron aproximadamente 10⁶ células y se purificó el ARN total con TRI-Reagent (SIGMA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN fue retrotranscrito a ADNc utilizando oligonucleótidos con secuencias al azar (Promega) y SuperScript III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA). La RT-PCR cuantitativa fue llevada a cabo utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Biorad, Hercules CA) y combinaciones de oligonucleótidos específicos. Para la detección de ARNs de SFV que codifican GFP se utilizaron los oligonucleótidos 36 y 37, mientras que las moléculas que codifican CT-1 y OSM fueron detectadas con el oligonucleótido 36 en combinación con los oligonucleótidos 38 y 35, respectivamente. Por otra parte, el intercambio correcto entre los genes de neomicina y puromicina fue evaluado por combinación de un oligonucleótido específico para la secuencia de TK-PolyA (Oligonucleótido 39) con los oligonucleótidos 40 y 41, respectivamente. La replicasa fue detectada utilizando los oligonucleótidos 42 y 43. Los valores fueron normalizados por comparación con la expresión de actina, utilizando los oligonucleótidos 44 y 45.

Análisis de la estabilidad del ARN

Se purificó ARN total a partir de varios pases (entre pase 5 y 25) de la línea MCL tras incubar cada pase durante 120h con 1.25 µg/mL de DOX. El ARN se purificó con TRI-Reagent (SIGMA) y se retrotranscribió a ADNc tal como se describió anteriormente. Estos ADNcs se usaron como molde para amplificar un fragmento correspondiente al gen GFP utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *Pfu* (Stratagene, Cedar Creek, TX) y los oligonucleótidos 16 y 17. Los fragmentos obtenidos fueron purificados, adenilados y clonados en pGEM-T-easy. Se secuenció un promedio de 21.5 clones por pase en cada línea celular utilizando el 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para determinar la tasa de mutaciones, las secuencias de todos los clones fueron comparadas con la secuencia del gen de GFP en el vector original utilizando el programa ClustalX.

Intercambio de transgenes mediado por la recombinasa Cre

Se sembró la MCL en placas de 6 pocillos a una densidad de 0.5×10^6 células/pocillo en medio BHK completo sin antibióticos de selección. Tras 24h las células fueron transfectadas con 0.5-4 µg del plásmido pShuttle-SFV conteniendo el gen de interés, mezclado con 1 µg de pBS185CMV-Cre (Sauer y Henderson, 1990. New Biol 2: 441-9). Al día siguiente, las células fueron incubadas con medio BHK completo suplementado con 5 µg/mL de puromicina y se seleccionaron células resistentes a dicho antibiótico cambiando el medio cada tres días. Las células fueron cultivadas hasta confluencia y expandidas. Estos cultivos parentales fueron inducidos con DOX para verificar la expresión de la proteína heteróloga, y los cultivos con mejor expresión fueron clonados por dilución límite y expandidos.

Análisis de la expresión de proteínas heterólogas

Los lisados celulares se obtuvieron incubando las células con una solución compuesta por Igepal al 1% (Sigma), Tris-HCl pH 7.6 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y 1 µg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma). Tras 10 min. a 4°, las muestras fueron centrifugadas durante 6 min. a 6000 rpm en centrífuga refrigerada. Para los experimentos de Western Blot, los sobrenadantes y lisados de células que expresan las proteínas heterólogas fueron analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos primarios apropiados: suero policlonal de conejo contra GFP (Abcam, Cambridge, UK), actina (Sigma), o nsp2 de SFV (Casales *et al.* 2008 Virology. 376:242-51), suero policlonal biotinilado de cabra específico contra CT-1 humana (R&D, Minneapolis, MN), o un anticuerpo murino monoclonal específico contra OSM humana (R&D). Por otra parte, se usó un antisuero contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa obtenido en cabra (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), un polímero estreptavidina-peroxidasa (Sigma) y un antisuero contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa obtenido en cabra (Pierce Biotechnology) como anticuerpos secundarios, respectivamente. En todos los casos las proteínas fueron visualizadas utilizando el Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA). Las proteínas GFP recombinante (Cell Biolabs, Inc., CA, USA), CT-1 y OSM humanas recombinantes (R&D) producidas en *E. coli* fueron utilizadas como controles. Las cantidades de CT-1 y OSM presentes en los sobrenadantes de las líneas estables fueron cuantificados por ELISAs específicos para CT-1 humana (ELISA Pair Set Kit

RHF650CK, BioSupply UK) y OSM humana (DSL-10-9400 Active Free, DSL, Webster, TX), respectivamente.

Análisis de la actividad biológica de CT-1 y OSM

5

Para evaluar la actividad de la CT-1 humana, se cultivaron células HepG2 en placas de 12 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo durante 24h con FBS al 10% y otras 48h en ausencia de FBS. En ese momento, fueron agregadas diferentes cantidades de CT-1 producida por las líneas estables o de CT-1 recombinante comercial, como control positivo.

10 Pasados 30 min. se obtuvieron lisados celulares que fueron analizados por Western Blot utilizando antisueros de conejo específico contra STAT3 fosforilado (Cell signalling, Danvers, MA) y contra actina, usando un antisuero de oveja contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como anticuero secundario en ambos casos. El mismo tipo de ensayo fue utilizado para evaluar la actividad de OSM, incubando
15 células Huh7 durante 24h en presencia de FBS al 10%, eliminando el suero durante otras 48h y agregando diferentes cantidades de OSM humana producida a partir de líneas estables, o de OSM humana recombinante comercial como control positivo. Después de 60 min. de incubación, los lisados se analizaron por Western Blot con antisueros específicos contra STAT3 fosforilado y actina. Las proteínas fueron visualizadas utilizando el Western
20 Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, escaneadas con ImageQuant ECL imager (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) y cuantificadas con el programa ImageQuant TL software (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). El grado de fosforilación de STAT3 fue calculado como el ratio entre STAT3 fosforilado y la proteína total. Las actividades de CT-1 y OSM fueron determinadas mediante interpolación de esos ratios en una curva estándar generada
25 con los ratios obtenidos con diferentes cantidades de la proteína humana recombinante comercial correspondiente. La actividad específica fue calculada dividiendo la cantidad de proteína correspondiente a la actividad observada (según la curva estándar) por la cantidad real de proteína presente en cada muestra, determinada por ELISA. La fracción de fosforilación de STAT3 producida por un 1 ng de proteína recombinante comercial fue
30 considerada como 1 unidad arbitraria (UA).

Purificación y caracterización bioquímica de CT-1 y OSM

Los clones seleccionados que expresan CT-1 y OSM fueron incubados a 33°C con medio
35 BHK completo suplementado con 1.25 µg/mL de DOX durante 96 o 72h, respectivamente. A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por medio EX-CELL CHO durante 24h. El

medio de cultivo fue recogido y centrifugado a 1000g durante 5 min. Las proteínas CT-1 y OSM fueron purificados por cromatografía de pseudoafinidad utilizando una columna de Ni²⁺-nitrilotriacético (QIAGEN, Germany) siguiendo las instrucciones del proveedor y eluidas con imidazol 125 mM, en un ÄKTA Explorer. La presencia de proteína recombinante fue analizada en cada paso de purificación a través de SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, seguidos de tinciones con plata o Western Blot. Las bandas de interés fueron digeridas en un gel con tripsina y la identificación de las proteínas fue obtenida por análisis de los fragmentos de digestión en una cromatografía líquida y espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS).

Adaptación de células adherentes a cultivos en suspensión

Los cultivos en suspensión fueron iniciados tripsinizando células adherentes y resuspendiéndolas en medio SMEM completo a una densidad de 2.5×10^5 células/mL. Las células fueron incubadas a 37° en botellas con agitación continua a 100 rpm y diluidas con medio nuevo cada cuatro días hasta alcanzar la densidad inicial. La velocidad de crecimiento y la viabilidad celular del cultivo fueron monitorizadas diariamente durante las primeras tres semanas de cultivo. Una vez que el crecimiento del cultivo en suspensión fue estable, el suero fue eliminado progresivamente reduciendo su concentración en cada pase un 50%. Para este propósito, en cada pase el medio fue mezclado con medio libre de suero hasta que la concentración final de suero fue del 0.5%, momento en el cual las células fueron lavadas y crecidas en medio libre de suero.

EJEMPLO 1: Generación de una línea celular estable que contiene un vector no citopático inducible del virus del Bosque de Semliki (SFV) que expresa GFP

Se generó una línea celular estable con un replicón no citopático inducible de SFV que expresaba GFP (i-ncSFV-GFP). Para ello, en un primer paso se transfectaron células BHK con un plásmido que contiene el gen del transactivador rtTA2sM2 (TA) (Urlinger, Baron *et al.* 2000, Proc Natl Acad Sci USA, 97(14): 7963-8) tras el promotor constitutivo PGK, seguido de una secuencia IRES y del gen que confiere resistencia a higromicina (pPGK-TA-ires-Hyg, Figura 1). Tras seleccionar con higromicina, se obtuvo la línea celular BHK-TA que en presencia de doxiciclina (DOX) fue capaz de transactivar la expresión de genes que se encuentren bajo el control de un elemento de respuesta a tetraciclina (TRE). En un segundo paso, las células BHK-TA se transfectaron con un plásmido que contiene la secuencia de ADNc del vector ncSFV-GFP bajo el control transcripcional del promotor mínimo de

albúmina (Palb) fusionado a TRE (tetO₇) (ver Materiales y Métodos). Este plásmido también lleva un gen de resistencia a neomicina tras el promotor de SV40 (Figura 1). El extremo 5' de ncSFV fue clonado exactamente en la posición 174 de Palb, ya que de forma inesperada se observó que ésta era la posición en la que comenzaba la transcripción a partir de este promotor (Figura 2). Es muy importante que la transcripción comience exactamente en el extremo 5' de SFV para que el ARN de este vector pueda replicarse (Berglund et al. 1998, Nat. Biotechnol. 16:562-5). Tras seleccionar con neomicina, se aislaron varios clones mediante dilución terminal y se analizó la expresión de GFP con y sin DOX, seleccionándose el clon que presentaba las características de inducibilidad deseadas: expresión de GFP en >80% de las células al añadir DOX y total ausencia de expresión de GFP cuando no se añadía DOX. Este clon fue expandido y se denominó Línea Celular Maestra (MCL).

EJEMPLO 2: Caracterización de MCL: Cinética de inducción, temperatura óptima y estabilidad

Se monitorizó la expresión de GFP y de la replicasa de SFV tras la adición de DOX (2.5 µg/mL) a 33° y 37°, respectivamente. Tras 24h a 33° comenzaron a verse células que expresaban GFP que llegaron a constituir el 90% de todas las células a las 96h (Figuras 3A y 3B). Sorprendentemente, la inducción a 37° solo dio lugar a un máximo de 40-50% de células positivas para GFP. El análisis de expresión de GFP por Western blot mostró una cinética similar (Figura 3C). La inducción de replicasa fue más rápida, alcanzando un máximo a las 24h a 33°, y siendo casi indetectable a 37° (Figura 3C). Los niveles de ARN de ncSFV-GFP alcanzaron un máximo a las 72h de incubación con DOX, aunque a 33° los niveles fueron 10 veces mayores que a 37° (Figura 4). Con objeto de optimizar la inducción de MCL se ensayaron diferentes concentraciones de DOX a diferentes tiempos. La máxima inducción de GFP se obtuvo con ≥0.3 µg DOX/mL incubando ≥96h (Figura 3D). Por ello, en experimentos posteriores se usó siempre 1.25 µg DOX/mL durante 96h. Para evaluar la estabilidad de la MCL se pasó esta línea celular 50 veces durante 5 meses en presencia o ausencia de los antibióticos usados para su selección (higromicina y neomicina). En cada pase se incubaron las células con o sin DOX y se analizó el porcentaje de células que expresaban GFP mediante FACS. Tras 50 pases, el 80-90% de las células expresaban GFP al añadir DOX, indicando una alta estabilidad de la MCL (Figura 5A). Esta estabilidad fue confirmada mediante Western blot (Figura 5B). El hecho de que no hubiera diferencias entre crecer la MCL en presencia o ausencia de higromicina/neomicina indicó que esta línea podía ser mantenida sin selección.

Con objeto de analizar la estabilidad genética de la MCL se obtuvieron ADNc de GFP tras la inducción en varios pases. Se secuenció una media de 21.5 clones/pase en cada una de las dos líneas (mantenida con o sin higromicina/neomicina). En cada clon se secuenciaron 660 nucleótidos correspondientes al gen GFP, lo que se tradujo en 14190 nucleótidos secuenciados/pase y 113500 nucleótidos totales. En este análisis se detectaron muy pocas mutaciones en la secuencia de GFP, determinándose una frecuencia total de mutación de 1×10^{-4} , que es menor que la tasa de mutación descrita para la ADN polimerasa de alta fidelidad usada para amplificar los ADNc (Tabla 1). Asimismo, esta tasa de mutación fue menor que la descrita en líneas estables generadas con el vector de ARN de ncSFV (Casales, Aranda *et al.*, 2010, New Biotechnology **27**(2): 138-148).

Pase	Hyg/Neo	Secuencias mutadas ^a	Mutaciones ^b	Tasa de Mutación ^c
5	+	17% (4/24)	4	2.6×10^{-4}
15	+	0% (0/17)	0	$<9.0 \times 10^{-5}$
20	+	0% (0/23)	0	$<6.6 \times 10^{-5}$
25	+	4% (1/24)	3	1.9×10^{-4}
5	-	0% (0/21)	0	$<7.3 \times 10^{-5}$
10	-	13% (2/16)	2	1.8×10^{-4}
17	-	4% (1/23)	1	6.7×10^{-5}
23	-	8% (1/24)	2	1.3×10^{-4}

^aPorcentaje de clones mutados (%). Entre paréntesis: número de clones mutados/número total de clones analizados.

^bNúmero total de cambios de nucleótido en todos los clones analizados de cada pase.

^cLa tasa de mutación fue calculada dividiendo el número de cambios de nucleótidos en cada pase por el número total de pares de bases secuenciadas.

Tabla 1. Estabilidad genética del ARN de GFP en MCL

EJEMPLO 3: Comparación de MCL con una línea celular inducible convencional

En la línea MCL la expresión del transgén se debe a la auto-replicación del vector de ARN, lo que debería conducir a niveles de expresión mayores que los obtenidos con una línea celular convencional. Para verificar esto, se generó una línea celular convencional inducible mediante la transfección de células BHK-TA con un plásmido que contiene el gen GFP bajo el control transcripcional del promotor tetO₇-PAIb (iGFP) y el gen de resistencia a neomicina. Tras seleccionar las células con este último antibiótico se aislaron varios clones mediante dilución terminal y se analizó la expresión de GFP con y sin DOX. Se eligió un clon óptimo en el que tras la adición de DOX se podía detectar hasta un 90% de células que expresaban GFP a las 96h y en el que no había expresión detectable de GFP en ausencia de DOX. La expresión de GFP en esta línea control fue también confirmada por Western blot (Figura 6). De forma destacada, los niveles de expresión de GFP tras 96h de inducción eran mucho menores en la línea control que los obtenidos con la MCL.

EJEMPLO 4: Generación de nuevas líneas estables derivadas de MCL mediante el intercambio de transgenes mediado por recombinasa

Para generar nuevas líneas estables inducibles de forma rápida y sencilla se diseñó una estrategia para intercambiar el gen GFP y el gen de resistencia a neomicina presentes en MCL por un fragmento de ADN que contiene un nuevo transgén de interés y el gen que confiere resistencia a puromicina (*pac*), mediante un proceso de recombinación mediada por la recombinasa Cre. Para ello previamente se habían introducido sitios LoxP mutantes en dos posiciones del vector i-ncSFV-GFP-neo integrado en MCL (Figura 1). El primer sitio LoxP (LoxP1) se clonó entre el promotor subgenómico de SFV y el gen GFP, mientras que el segundo sitio LoxP (LoxP2) se clonó entre el gen de resistencia a neomicina y su señal de poliadenilación (Figura 7A). Los sitios LoxP1 y LoxP2 contienen mutaciones que impiden la recombinación entre ellos (Tabla 2), pero que permiten una recombinación unidireccional con sitios LoxP que contengan mutaciones complementarias (Lee y Saito 1998, *Gene* **216**(1): 55-65; Arakawa, Lodygin *et al.* 2001, *BMC Biotechnol* **1**: 7). La combinación de estos dos tipos de mutaciones en los mismos sitios LoxP no se había descrito previamente. Para introducir un nuevo transgén de interés en MCL se construyó un vector lanzadera (pShuttle-SFV), que contenía un sitio múltiple de clonaje en el que se puede introducir el transgén deseado seguido del extremo 3' de SFV y del gen *pac* desprovisto de su señal de poliadenilación (Figura 7A). Este casete estaba flanqueado por sitios LoxP (LoxP3 y LoxP4) que también contienen mutaciones que impiden la recombinación entre ellos pero que permiten una recombinación unidireccional e irreversible con los sitios LoxP1 y LoxP2, respectivamente (Tabla 2). Para comprobar este sistema de intercambio se generó un vector

pSFV-shuttle que contenía el gen Tomato, que codifica para una proteína fluorescente roja (pShuttle-SFV-Tomato). Se cotransfectó la MCL con pShuttle-SFV-Tomato y con un plásmido que expresa la recombinasa Cre (pCMV-CRE), y a las 24h se añadió puromicina a una concentración de 5 µg/mL. De esta forma se obtuvo un cultivo celular resistente a puromicina en el que una alta proporción de células expresaban Tomato tras la adición de DOX sin observarse expresión de GFP (Figura 7B). El hecho de que en este cultivo había un 40% de células resistentes a puromicina que no expresaban Tomato indicaba que el intercambio correcto no había tenido lugar en el 100% de las células. A pesar de ello, el hecho de que una alta proporción de células podía expresar el nuevo gen de interés facilita considerablemente la selección y crecimiento de clones individuales.

EJEMPLO 5: Generación de líneas celulares estables que expresan cardiotrofina-1 humana (CT-1)

Para comprobar si las líneas inducibles descritas podían utilizarse para la producción de proteínas terapéuticas se clonó el gen de CT-1 en el vector pShuttle-SFV fusionado con un péptido señal y con una cola de 6 histidinas en el extremo NH₂ (pShuttle-SFV-CT, Figura 8A). Este vector se cotransfectó con pCMV-CRE en MCL y a las 24h se añadió puromicina a 5 µg/ml. Mediante dilución terminal se seleccionaron tres clones (CT1-A, CT1-B y CT1-C) en los que la expresión de CT-1 aumentaba de forma drástica tras 48h de inducción alcanzando una concentración en los sobrenadantes de 3 mg/L/24h a las 120h (Figura 10A). Los tres clones mostraron una alta estabilidad con niveles de expresión de CT-1 de 1-5 mg/L en 10 pases consecutivos y total ausencia de expresión cuando no se añadía DOX (Figura 8B y 8C). La CT-1 producida por estas líneas mostró ser funcional siendo capaz de inducir fosforilación de STAT3 en células HepG2 incubadas en ausencia de suero durante 48h (Figura 10B). Esta actividad se mantuvo en todos los pases analizados (3, 5 y 10 para cada clon) y fue igual o superior a la de CT-1 comercial.

EJEMPLO 6: Generación de líneas celulares estables que expresan oncostatina-M (OSM)

La OSM es una citoquina de la familia de la interleukina-6 con propiedades antitumorales y antivirales (Larrea, Aldabe *et al.*, 2009, J Virol **83**(7): 3298-311), que es capaz de inhibir el crecimiento de numerosas líneas celulares (Horn, Fitzpatrick *et al.*, 1990, Growth Factors **2**(2-3): 157-65). Este efecto inhibitorio también se ha observado en líneas celulares utilizadas comúnmente para producción de proteínas recombinantes, como las células BHK

(Figura 11), lo que dificulta enormemente la producción de esta proteína. Una ventaja importante del sistema de expresión inducible de ncSFV es que se podría utilizar para expresar proteínas que son tóxicas para las células productoras, ya que estas células podrían ser crecidas hasta alcanzar la densidad y número deseado antes de inducir la expresión. Para probar esta hipótesis se clonó el gen que codifica la forma madura de OSM en el vector pShuttle-SFV tal y como se describe en Materiales y Métodos, generándose el plásmido pShuttle-SFV-OSM (Figura 9A). Este vector fue cotransfectado junto con pCMV-CRE en la MCL, tras lo cual se seleccionaron las células con puromicina a 5 µg/ml. Mediante dilución terminal se seleccionaron tres clones (OSM-A, OSM-B y OSM-C) en los que la expresión de OSM aumentaba de forma drástica tras 48h de inducción, alcanzando una concentración en los sobrenadantes de 1 mg/L/24h a las 96h (Figura 10C). A partir de las 72h de inducción los cultivos que expresaban OSM mostraron un fuerte efecto citopático, que no fue observado en cultivos no inducidos o en aquellos que expresaban CT-1 (Figura 8D and 9D). Los tres clones mostraron una alta estabilidad, mostrando niveles de expresión de OSM de 1-8 mg OSM/L en 10 pases consecutivos y con total ausencia de expresión cuando no se añadía DOX (Figura 9B y 9C). La OSM producida por estas líneas mostró ser funcional, siendo capaz de inducir fosforilación de STAT3 en células Huh7 incubadas en ausencia de suero durante 48h (Figura 10D). Esta actividad se mantuvo en todos los pases analizados (1, 5 y 10 para cada clon) y fue igual o superior a la de OSM comercial. Estos datos confirman que el sistema i-ncSFV puede ser utilizado para generar líneas estables que expresen proteínas tóxicas funcionales a niveles elevados y con alta estabilidad.

EJEMPLO 7: Generación y caracterización de líneas celulares estables que expresan anticuerpos monoclonales

Para establecer si nuestro sistema era capaz de producir anticuerpos monoclonales (mAbs) se generó una línea que expresa el anticuerpo idiotípico A20, derivado de un linfoma folicular murino. Para ello, se clonaron los genes que codifican la cadena ligera (LC) y pesada (HC) del anticuerpo en el vector pShuttle-SFV bajo el control de promotores subgenómicos independientes, generándose el vector pShuttle-SFV-A20 (Figura 12A). Dicho vector fue cotransfectado con pCMV-CRE en la MCL y pasadas 24h se agregó puromicina a una concentración final de 5 µg/ml. Después de la selección de las células, el cultivo se indujo con doxiciclina y la expresión del anticuerpo monoclonal fue evaluada en el sobrenadante por Western Blot en condiciones no reductoras, confirmando que el sistema permite la correcta expresión de anticuerpos, alcanzando niveles de expresión de hasta 8 mg/L/24h (Figura 12B).

EJEMPLO 8: Purificación y caracterización bioquímica de CT-1 y OSM expresadas a partir de líneas que portan el vector i-ncSFV

- 5 Para purificar CT-1 y OSM se crecieron los clones CT1-A y OSM-A hasta tener una cantidad final de 10^8 células y se incubaron con 100 ml de medio suplementado con DOX durante 3 ó 4 días, respectivamente. A ese tiempo se reemplazó el medio por medio sin suero y 24h más tarde se purificó la CT-1 y la OSM del sobrenadante celular mediante columnas de Ni^{2+} -nitrilotriacético (QIAGEN, Germany). El rendimiento en la purificación fue de 0.69 mg/L para
- 10 CT-1 y de 1.54 mg/L para OSM (Tabla 3). La identidad de cada proteína fue confirmada mediante análisis de LC–MS/MS.

CT-1	Volumen (mL) ^a	CT-1 (mg/L) ^b	CT-1 total (µg)	Recuperación (%)
<i>Sobrenadante CT-1</i>	100	4.6	460	NA ^d
<i>Cromatografía Ni-NTA</i>	1	68.8	69	15
OSM	Volumen (mL) ^a	OSM (mg/L) ^b	OSM total (µg)	Recuperación (%)
<i>Sobrenadante OSM</i>	100	3.6	360	NA
<i>Cromatografía Ni-NTA</i>	1	154.0	154	43

^aVolumen de la solución de CT-1 u OSM.

^bConcentración de CT-1/OSM determinada mediante ELISA.

^c1 AU: grado de fosforilación de STAT3 producido por 1 ng de CT-1/OSM comercial recombinantes

^dNA: No aplica.

Tabla 3. Purificación de CT-1 y OSM a partir de líneas celulares derivadas de i-ncSFV

15 **EJEMPLO 9: Adaptación de las líneas inducibles seleccionadas al crecimiento en suspensión y sin suero**

- En una primera fase se iniciaron cultivos en suspensión de la línea MCL y del clon OSM-A mediante el cultivo de células tripsinizadas en frascos con agitación (spinner flasks) usando
- 20 un medio formulado especialmente para células en suspensión que contenía un 10% de suero. Tras tres semanas de cultivo con pases periódicos, las dos líneas se habían adaptado a crecer en suspensión. En una segunda fase los cultivos se sometieron a varios pases en los que la concentración de suero se redujo progresivamente hasta ser completamente eliminado, proceso que llevó aproximadamente un mes. Tanto la línea MCL
- 25 como la línea OSM-A adaptadas a crecer en suspensión fueron capaces de expresar niveles elevados de GFP y OSM, respectivamente, cuando se indujeron a 33° con doxiciclina (Figura 13).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende
 - (i) una secuencia reguladora de la transcripción,
 - 5 (ii) una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus que se encuentra operativamente unida a dicha secuencia reguladora de la transcripción y en donde dicha secuencia complementaria del replicón del alfavirus comprende una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada entre el promotor subgenómico del replicón del alfavirus y la
 - 10 (iii) una secuencia de terminación de la transcripción en posición 3' con respecto al extremo 3' de la secuencia complementaria a un replicón de un alfavirus y
 - (iv) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada en posición 3' respecto a la secuencia de terminación de la
 - 15 transcripción.
2. El polinucleótido según la reivindicación 1 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas.
- 20 3. El polinucleótido según las reivindicaciones 1 o 2 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias LoxP.
4. El polinucleótido según la reivindicación 3 en donde la primera y la segunda secuencia LoxP se seleccionan del grupo formado por las parejas
 - 25 (a) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10
 - (b) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12
 - (c) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12
 - (d) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10
 - (e) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9
 - 30 (f) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11
 - (g) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y
 - (h) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9
5. El polinucleótido según la reivindicación 4 en donde la secuencia reguladora de la
- 35 transcripción comprende un promotor específico de hígado.

6. El polinucleótido según la reivindicación 5 en donde el promotor específico de hígado es el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
7. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la secuencia reguladora de la transcripción tiene una actividad regulable.
8. El polinucleótido según la reivindicación 7 en donde la secuencia reguladora de la transcripción que tiene una actividad regulable comprende adicionalmente un elemento de respuesta a un agente inductor.
9. El polinucleótido según la reivindicación 8 en donde el elemento de respuesta a un agente inductor es un elemento de respuesta a un ligando.
10. El polinucleótido según la reivindicación 9 en donde el elemento de respuesta a un ligando es un elemento de respuesta a tetraciclina o a un análogo de tetraciclina.
11. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 en donde la secuencia reguladora de la transcripción comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5.
12. El polinucleótido según la reivindicación 11 en donde la secuencia reguladora de la transcripción comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 8 y en donde la secuencia reguladora de la transcripción no comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
13. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde la secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus además comprende una secuencia heteróloga en posición 3' respecto al promotor subgenómico del replicón y respecto a la primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio.
14. El polinucleótido según la reivindicación 13 en donde dicha secuencia heteróloga se selecciona del grupo formado por
- (i) una secuencia de relleno,
 - (ii) una secuencia que comprende un sitio múltiple de clonaje,
 - (iii) una secuencia de un gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico del replicón del alfavirus y
 - (iv) cualquier combinación de las mismas.

15. El polinucleótido según la reivindicación 14 en donde dicha secuencia heteróloga es una secuencia de un gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico del replicón del alfavirus y en donde el gen de interés codifica una proteína de interés o un precursor de la misma.
16. El polinucleótido según la reivindicación 15 en donde la proteína de interés adicionalmente comprende al menos una secuencia etiqueta.
17. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 en donde el replicón del alfavirus comprende al menos una secuencia de un segundo gen de interés, en donde dicha secuencia de un segundo gen de interés se encuentra en posición 3' respecto a la primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio y en donde dicha secuencia de un segundo gen de interés está operativamente unida a un promotor subgenómico adicional o se encuentra operativamente asociada a la secuencia del primer gen de interés por medio de un IRES o de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional.
18. El polinucleótido según la reivindicación 17 en donde la secuencia del segundo gen de interés está operativamente asociada a la secuencia del primer gen de interés por medio de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional y en donde dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia que codifica una autoproteasa.
19. El polinucleótido según la reivindicación 18 en donde la autoproteasa es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa.
20. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en donde el primer gen de interés y el segundo gen de interés codifican, respectivamente, una primera y una segunda cadena de un anticuerpo.
21. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en donde el replicón de un alfavirus es un replicón del Semliki Forest Virus.

22. El polinucleótido según la reivindicación 21 en donde el replicón del Semliki Forest Virus comprende al menos una mutación que confiere a dicho replicón un fenotipo no citopático.
- 5 23. El polinucleótido según la reivindicación 22 en donde dicha mutación se localiza en la región que codifica la replicasa.
24. El polinucleótido según la reivindicación 23 en donde dicha mutación se localiza en la región que codifica la subunidad nsp2 de dicha replicasa.
- 10 25. El polinucleótido según la reivindicación 24 en donde dicha mutación se selecciona del grupo formado por las mutaciones P718T, R649H y una combinación de ambas.
- 15 26. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 que comprende adicionalmente un gen de selección, en donde dicho gen de selección se localiza en la región comprendida entre el primer y el segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa y en donde
- 20 (i) si la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia complementaria del replicón del alfavirus es una secuencia regulable, entonces el gen de selección se encuentra fuera de dicho replicón y unido a un promotor constitutivo o
- 25 (ii) si la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia complementaria del replicón del alfavirus comprende un promotor constitutivo, entonces dicho gen de selección está operativamente asociado al gen de interés por medio de un IRES o de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona, o dicho gen de selección está bajo el control de un segundo promotor constitutivo.
- 30 27. El polinucleótido según la reivindicación 26 en donde el gen de selección está operativamente asociado al gen de interés por medio de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona y en donde dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona es una secuencia que codifica una autoproteasa.
- 35 28. El polinucleótido según la reivindicación 27 en donde la autoproteasa es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa.

29. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 en donde el gen de selección se encuentra operativamente unido a un promotor constitutivo.
- 5 30. El polinucleótido según la reivindicación 29 en donde el promotor constitutivo al que se encuentra unido el gen de selección comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 14.
- 10 31. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30 en donde el gen de selección es un gen que confiere resistencia a un antibiótico.
32. El polinucleótido según la reivindicación 31 en donde el gen que confiere resistencia a un antibiótico se selecciona del grupo formado por el gen de resistencia a neomicina y el gen de resistencia a puromicina.
- 15 33. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 en donde la secuencia de terminación de la transcripción comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 20 34. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 que adicionalmente comprende una señal de poliadenilación o una señal de terminación de la transcripción y poliadenilación en posición 3' respecto al segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa.
- 25 35. El polinucleótido según la reivindicación 34 en donde la señal de terminación de la transcripción y poliadenilación comprende la secuencia SEQ ID NO: 70.
- 30 36. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.
37. Una célula eucariota que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o un vector de expresión según la reivindicación 36.
- 35 38. Una célula eucariota que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 en donde el polinucleótido se encuentra integrado en su genoma.

39. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 37 o 38 en donde la secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a la secuencia complementaria del replicón del alfavirus es una secuencia regulable y en donde dicha célula comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional unido operativamente a un promotor constitutivo, en donde dicho activador transcripcional es capaz de regular la transcripción a partir de dicha secuencia reguladora de la transcripción mediante su unión al sitio de respuesta a un ligando.
40. La célula según la reivindicación 39 en donde la secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional está integrada en el genoma.
41. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 39 o 40 en donde el ligando es tetraciclina o un análogo de tetraciclina.
42. La célula según la reivindicación 41 en donde el análogo de tetraciclina es doxiciclina.
43. La célula según la reivindicación 42 en donde el activador transcripcional regulable por doxiciclina comprende la secuencia SEQ ID NO: 16.
44. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43 en donde la secuencia de ADN que codifica un activador transcripcional comprende adicionalmente un gen de selección operativamente asociado a la secuencia que codifica dicho activador transcripcional por medio de un IRES o de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional.
45. La célula según la reivindicación 44 en donde el gen de selección está operativamente asociado a la secuencia que codifica el activador transcripcional por medio de una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional y en donde dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traduccional es una secuencia que codifica una autoproteasa.
46. La célula según la reivindicación 45 en donde la autoproteasa es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa.

47. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46 en donde el gen de selección codifica una proteína que confiere resistencia a higromicina.
- 5 48. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47 en donde dicha célula eucariota es una célula de mamífero.
49. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48 en donde dicha célula eucariota es una célula que puede crecer en suspensión.
- 10 50. Un método *in vitro* para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés que comprende
- (i) poner en contacto una célula con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde dicho polinucleótido comprende adicionalmente dicho gen de interés unido operativamente al promotor subgenómico del replicón, o con un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido y
- 15 (ii) seleccionar las células que han incorporado dicho polinucleótido o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido.
51. El método según la reivindicación 50 en donde la secuencia reguladora de la transcripción que está operativamente unida a la secuencia complementaria del replicón del alfavirus es una secuencia regulable y en donde dicho método comprende adicionalmente las etapas de
- 20 (i) introducir en dicha célula un polinucleótido que codifica un activador transcripcional específico para dicha secuencia reguladora de la transcripción y
- 25 (ii) seleccionar las células que hayan incorporado dicho polinucleótido que codifica un activador transcripcional específico para dicha secuencia reguladora de la transcripción.
52. El método según la reivindicación 51 en donde el activador transcripcional es un activador transcripcional regulable por un ligando.
- 30 53. El método según la reivindicación 52 en donde el ligando es tetraciclina o un análogo de tetraciclina.
- 35 54. El método según la reivindicación 53 en donde el análogo de tetraciclina es doxiciclina.

55. El método según la reivindicación 54 en donde el activador transcripcional regulable por doxiciclina comprende la secuencia SEQ ID NO: 16.

56. El método según cualquiera de las reivindicaciones 50 a 55 en donde el polinucleótido de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 35 comprende adicionalmente un primer gen de selección y/o el polinucleótido que codifica un activador transcripcional específico para dicho promotor regulable comprende adicionalmente un segundo gen de selección, y en donde la etapa de selección de las células que han incorporado dicho polinucleótido de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 35 que comprende un primer gen de selección y/o dicho polinucleótido que codifica un activador transcripcional de forma estable se lleva a cabo en condiciones selectivas para las células que expresen dicho primer y/o dicho segundo gen de selección.

57. El método según la reivindicación 56 en donde el primer y el segundo gen de selección son diferentes.

58. El método según la reivindicación 57 en donde el primer gen de selección se selecciona del gen que confiere resistencia a neomicina y del gen que confiere resistencia a puromicina, y el segundo gen de selección es el gen que confiere resistencia a higromicina.

59. Un método para expresar un gen de interés que comprende poner una célula de acuerdo con las reivindicaciones 37 a 49 en condiciones adecuadas para la activación de la transcripción de la secuencia complementaria al replicón alfaviral, en donde dicha célula comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido 1 a 35, en donde dicho polinucleótido comprende adicionalmente la secuencia del gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico.

60. El método según la reivindicación 59 en donde la secuencia reguladora de la transcripción que se encuentra unida operativamente a la secuencia complementaria al replicón del alfavirus es una secuencia regulable y en donde dichas condiciones adecuadas para la activación de la transcripción del replicón alfaviral comprenden condiciones adecuadas para la activación de dicha secuencia regulable.

61. El método según la reivindicación 60 en donde el promotor regulable se activa en presencia de un ligando y en donde dichas condiciones adecuadas para la activación de la transcripción del replicón alfaviral comprenden la puesta en contacto de la célula con dicho ligando o un precursor del mismo.

5

62. Un vector que comprende una secuencia de ADN que comprende, ordenados en la dirección 5' a 3',

(vii) una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio,

10 (viii) una secuencia de un gen de interés,

(ix) una secuencia 3' necesaria para la replicación de un alfavirus,

(x) una secuencia de terminación de la transcripción,

(xi) una secuencia de un gen de selección unida operativamente a un promotor y

15 (xii) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio.

63. El vector según la reivindicación 61 que adicionalmente comprende al menos una secuencia de un gen de interés adicional en donde dicha secuencia está separada de la secuencia del primer gen de interés por un IRES, o por una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona, o dicha secuencia está unida operativamente a un promotor subgenómico situado entre la secuencia del gen de interés (ii) y la secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus (iii).

20

25 64. El vector según la reivindicación 62 en donde la secuencia del gen de interés adicional está separada de la secuencia del primer gen de interés por una secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona, y en donde dicha secuencia que codifica un sitio de corte proteolítico post-traducciona es una secuencia que codifica una autoproteasa.

30

65. El vector según la reivindicación 63 en donde la autoproteasa es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa.

66. El vector según cualquiera de las reivindicación 61 a 64 en donde la secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus procede del Semliki Forest Virus.

35

67. El vector según cualquiera de las reivindicaciones 61 a 65 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas.
- 5 68. El vector según cualquiera de las reivindicaciones 61 a 66 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias LoxP.
69. El vector según la reivindicación 67 en donde la primera y la segunda secuencia LoxP se seleccionan del grupo formado por las parejas
- 10 (a) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10,
(b) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12,
(c) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12,
(d) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10,
(e) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9,
- 15 (f) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 11,
(g) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y
(h) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9.
70. El vector según cualquiera de las reivindicaciones 61 a 68 en donde el gen de interés
- 20 codifica una proteína de interés o un precursor de la misma.
71. El vector según la reivindicación 70 en donde la proteína de interés adicionalmente comprende una secuencia etiqueta.
- 25 72. El vector según cualquiera de las reivindicaciones 62 a 71 en donde la secuencia de terminación de la transcripción comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.
73. El vector según cualquiera de las reivindicaciones 62 a 72 en donde el gen de selección carece de señal de poliadenilación.
- 30 74. Un método *in vitro* para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés que comprende las etapas de:
- (i) introducir en una célula según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 49 un vector de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 62 a 73, en donde:
- 35 (f) dicha célula comprende una secuencia heteróloga en posición 3' respecto al promotor subgenómico del replicón, en donde dicha

secuencia heteróloga es una secuencia de un gen de interés unida operativamente al promotor subgenómico, o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido,

(g) la primera secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la primera secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector,

(h) la segunda secuencia de reconocimiento del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es compatible con la segunda secuencia de reconocimiento heteroespecífica del vector

(i) la célula expresa una recombinasa específica de dichas primeras y segundas secuencias de reconocimiento y,

(j) la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus presente en el vector coincide con la secuencia necesaria para la replicación del alfavirus que forma parte del replicón alfaviral,

(ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir la sustitución mediante recombinación específica del gen de interés que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus por el gen de interés que forma parte del vector de acuerdo a las reivindicaciones 61 a 71 y

(iii) seleccionar las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés.

75. El método según la reivindicación 74 en donde la etapa de selección de las células en las que se ha producido la sustitución del primer gen de interés por el segundo gen de interés se lleva a cabo mediante selección por medio del gen de selección que forma parte del vector, en donde dicho gen de selección es distinto al que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus.

76. El método según las reivindicaciones 74 o 75 en donde si el gen de selección que forma parte del vector carece de la señal de poliadenilación, entonces la célula comprende una señal de poliadenilación en posición 3' respecto al segundo sitio de reconocimiento de la recombinasa, dando lugar a la reconstitución de un sitio de poliadenilación en proximidad al gen de selección tras la recombinación.

77. El método según cualquiera de las reivindicaciones 74 a 76 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias heteroespecíficas.

5

78. El método según cualquiera de las reivindicaciones 74 a 77 en donde las secuencias de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio son secuencias LoxP y la recombinasa específica de sitio es la recombinasa Cre.

10 79. El método según la reivindicación 78 en donde

- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 9, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 10 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 11, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 12;

15

- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 9, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 12 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 11, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del es la secuencia SEQ ID NO: 10 ;

20

- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 10, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 9 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 12, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 11 y

25

30

- si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la

35

5

secuencia SEQ ID NO: 10, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 11 y si la primera secuencia de reconocimiento que forma parte del polinucleótido que comprende la secuencia complementaria de un replicón de un alfavirus es la secuencia SEQ ID NO: 12, entonces la segunda secuencia de reconocimiento que forma parte del vector es la secuencia SEQ ID NO: 9.

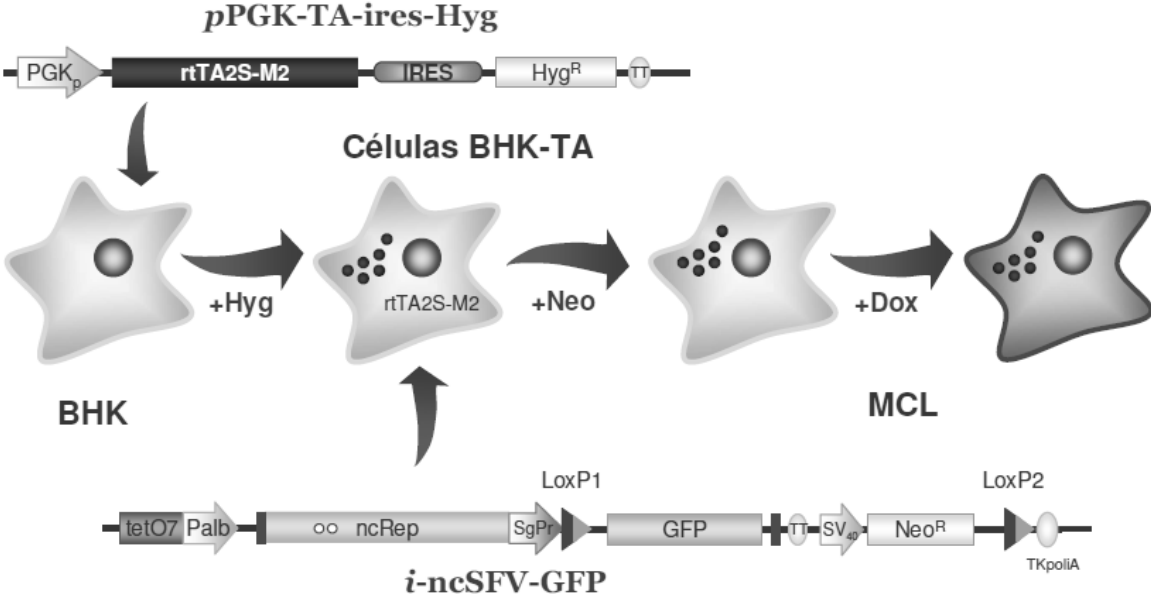


FIG. 1

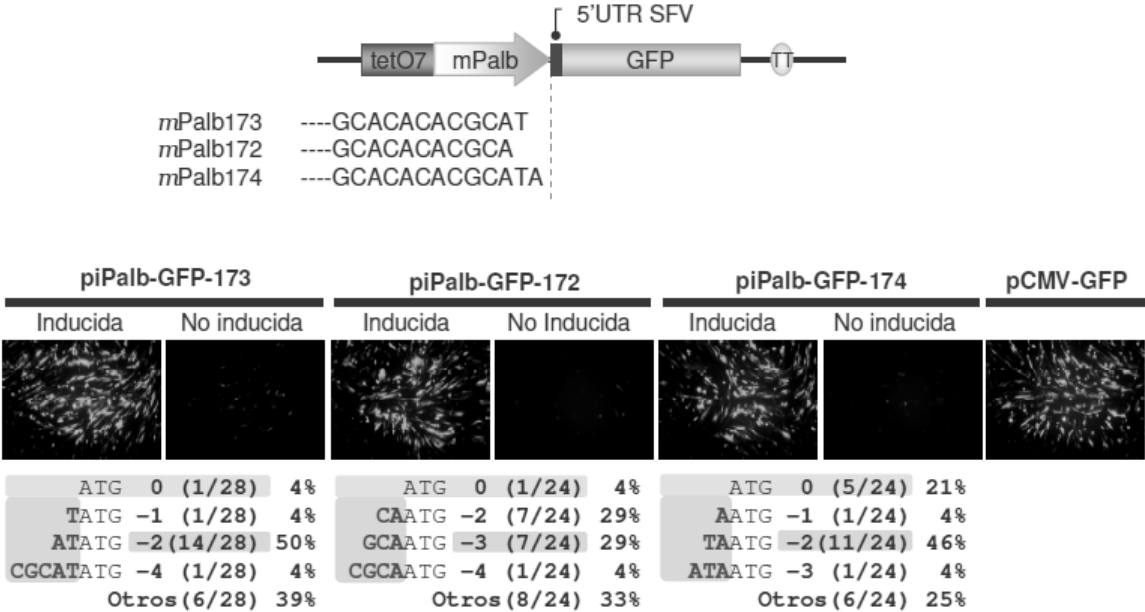
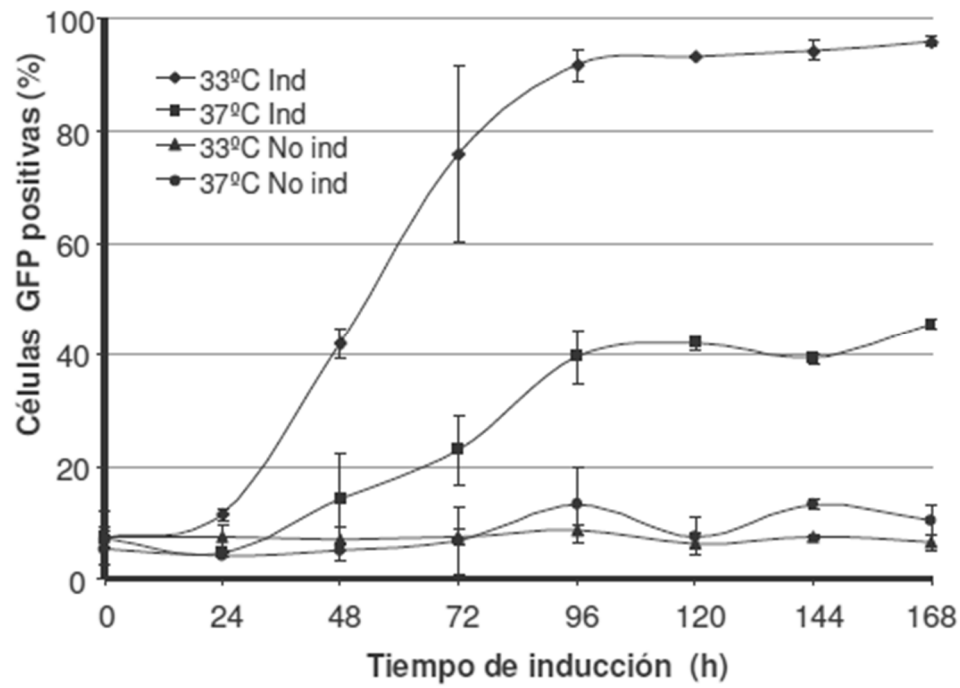


FIG. 2

A



B

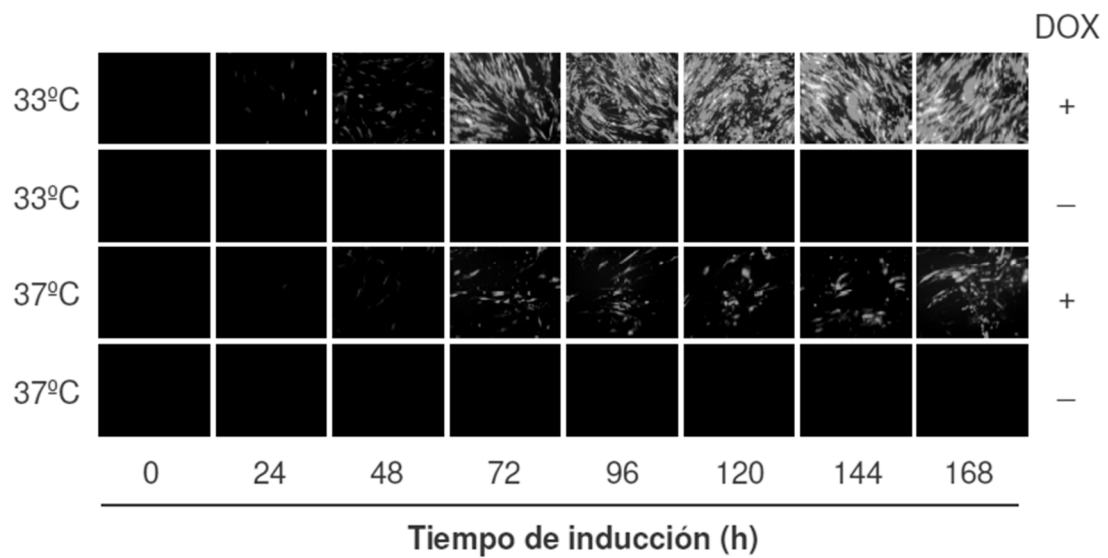
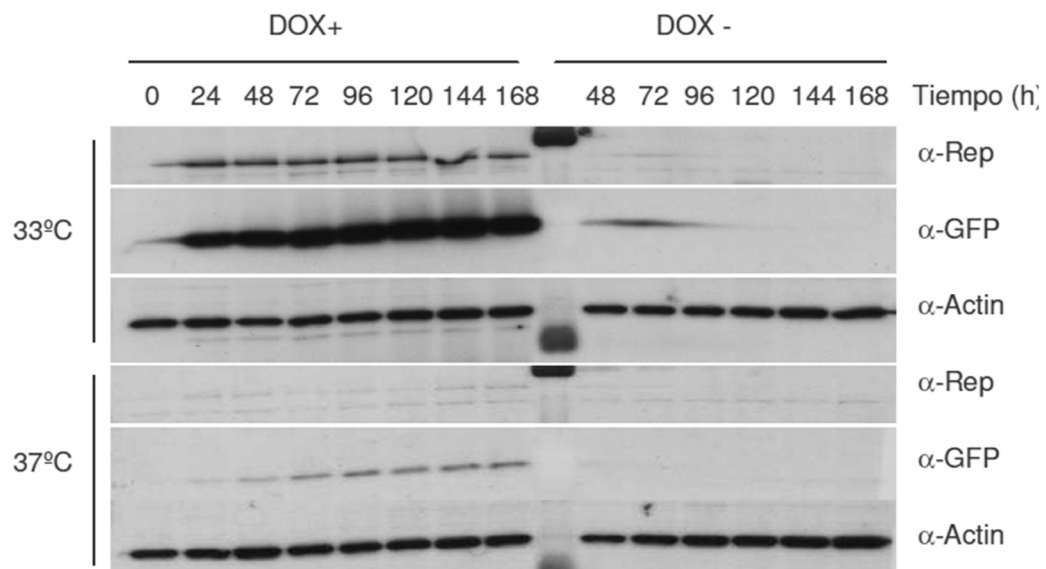


FIG. 3

C



D

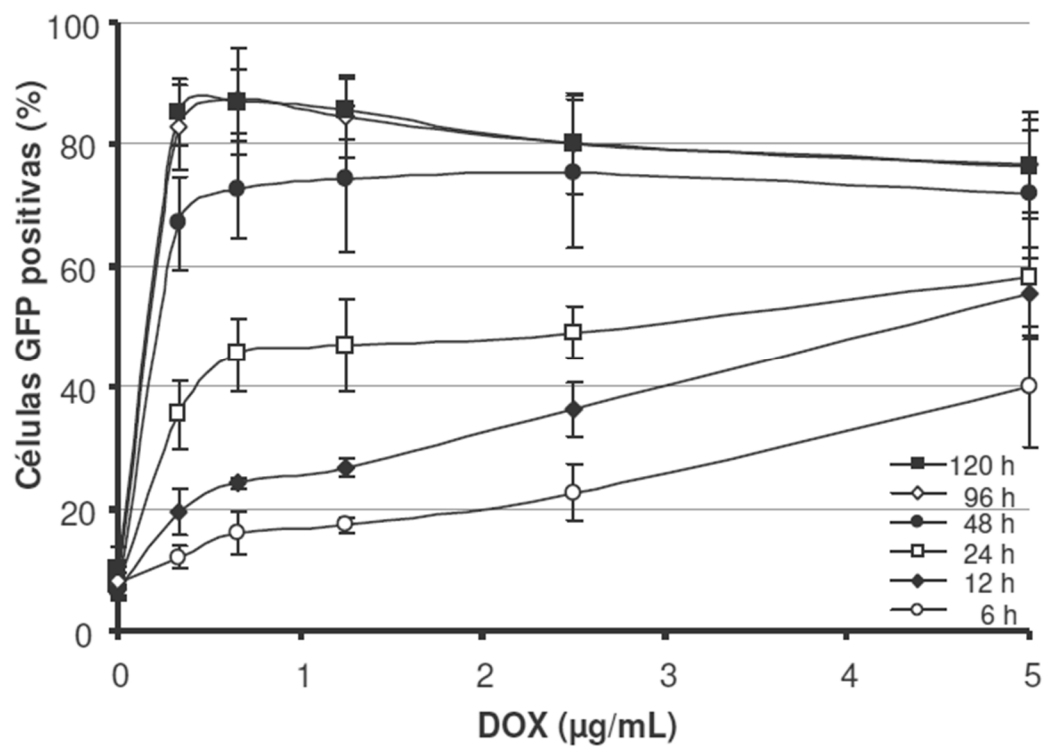


FIG. 3 (CONT.)

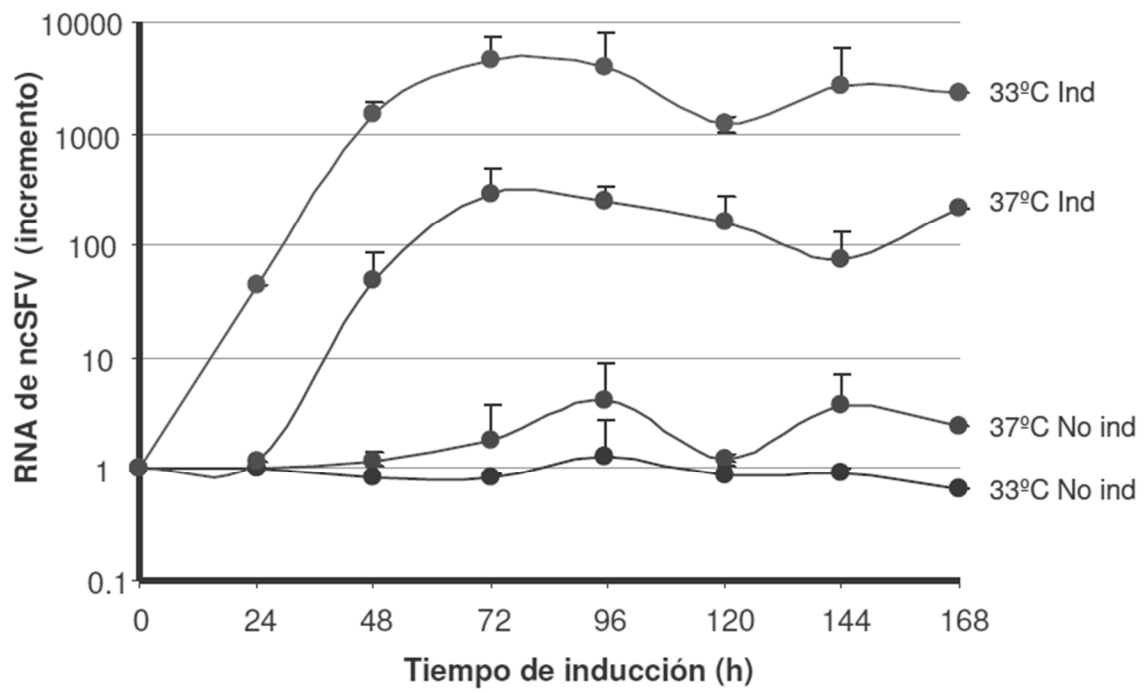


FIG. 4

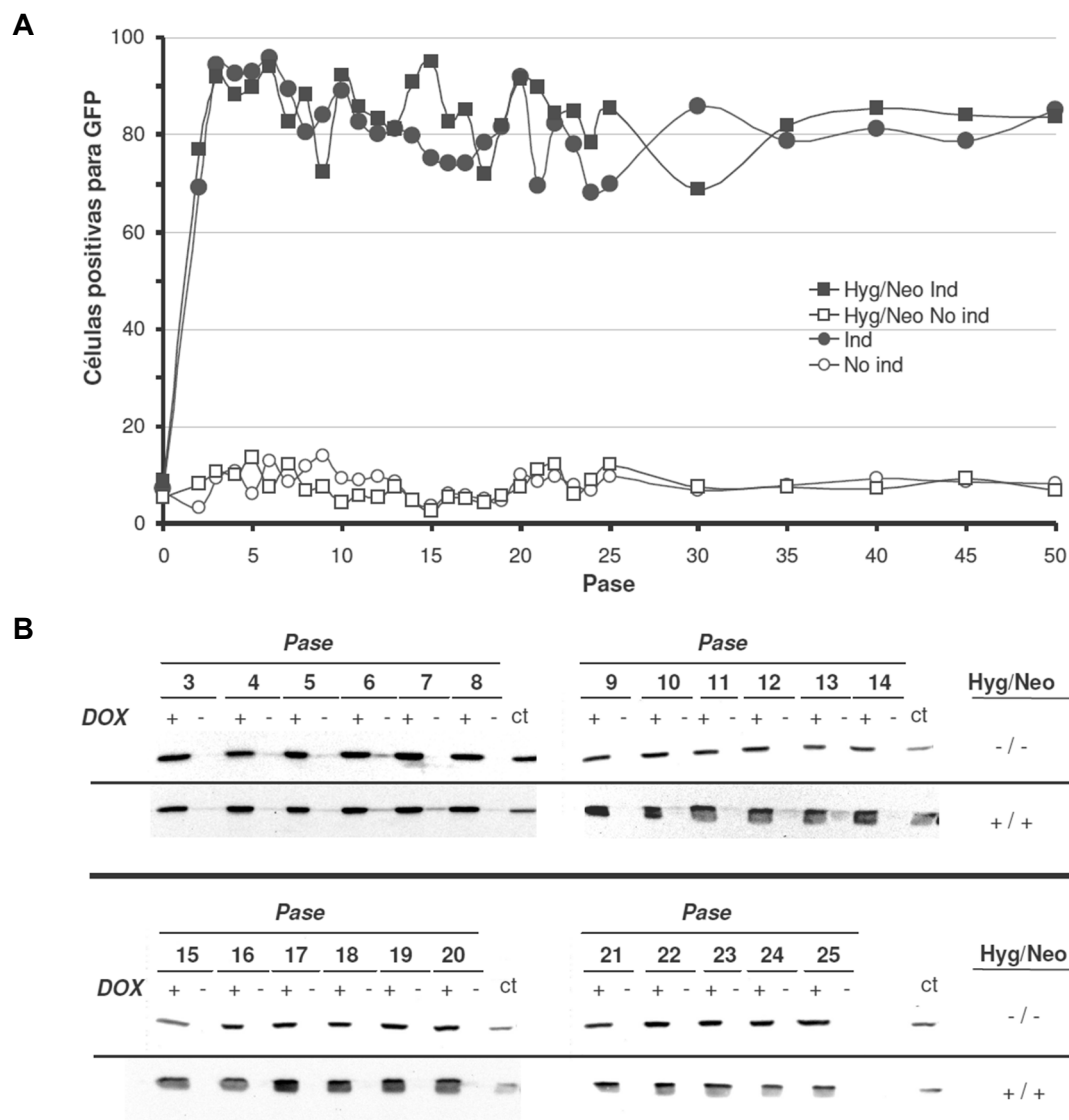


FIG. 5

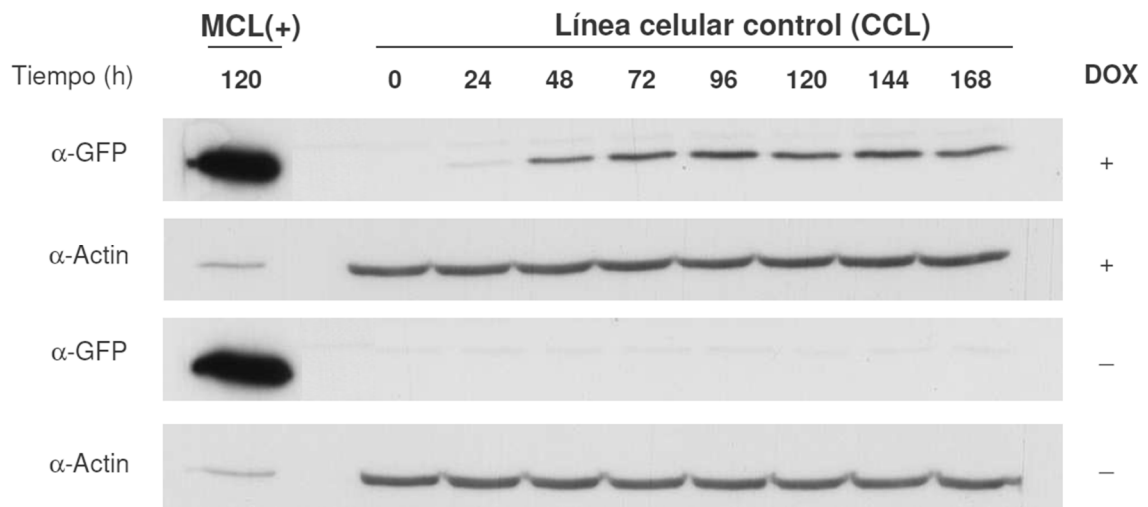


FIG. 6

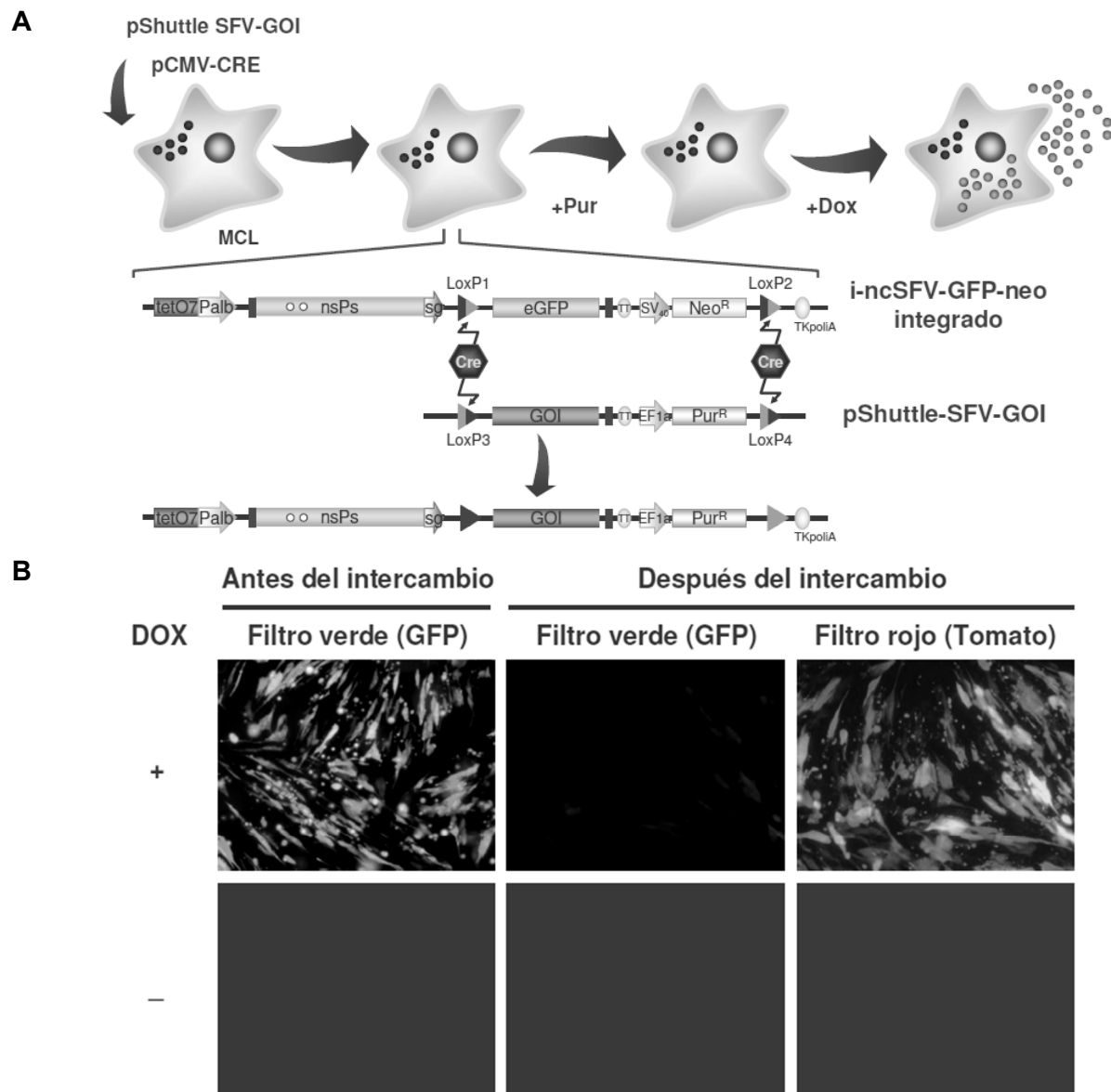


FIG. 7

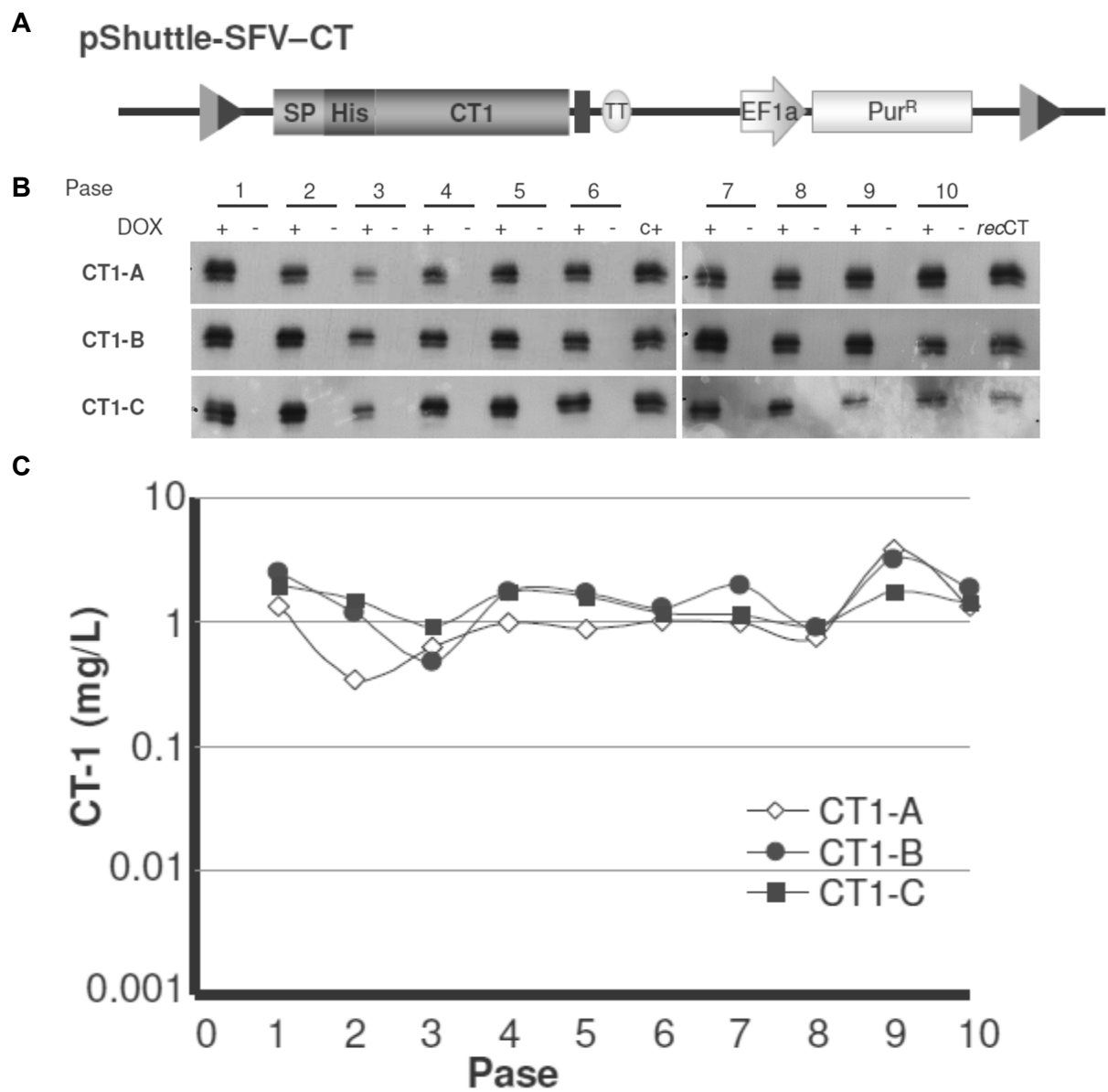


FIG. 8

D

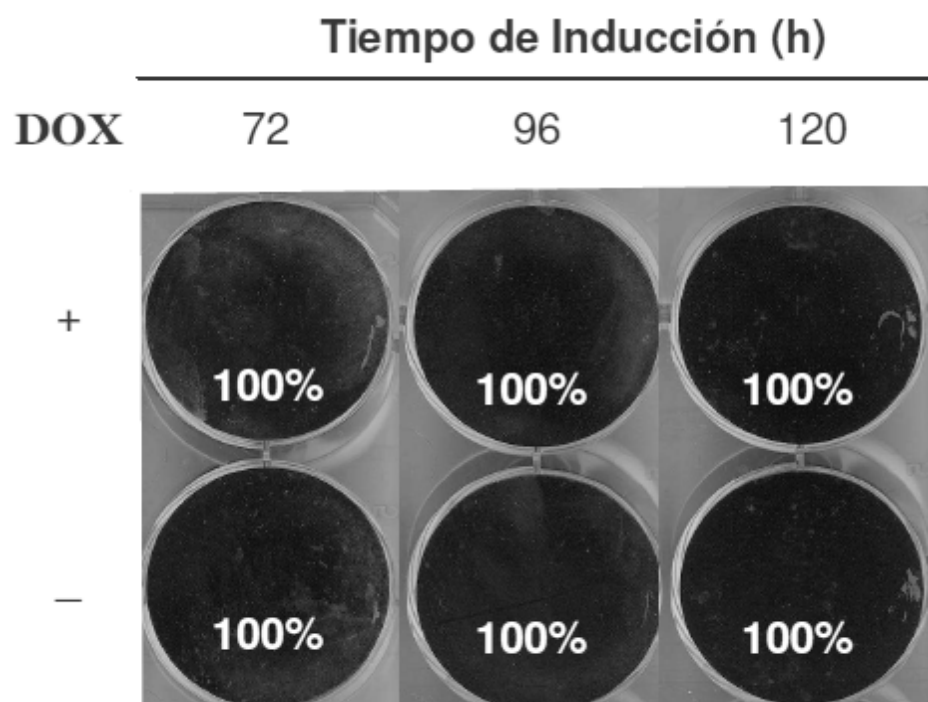


FIG. 8 (CONT.)

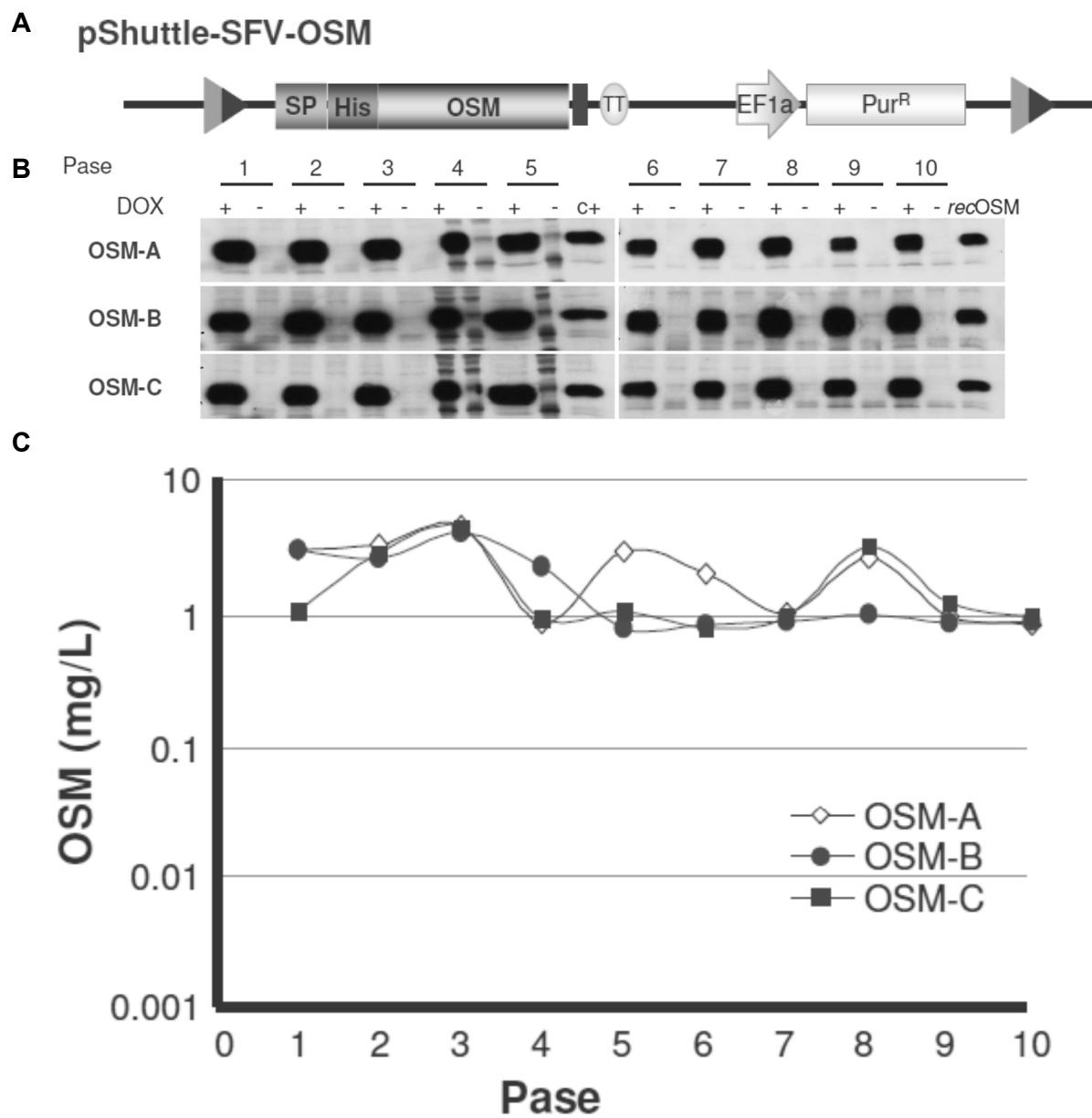


FIG. 9

D

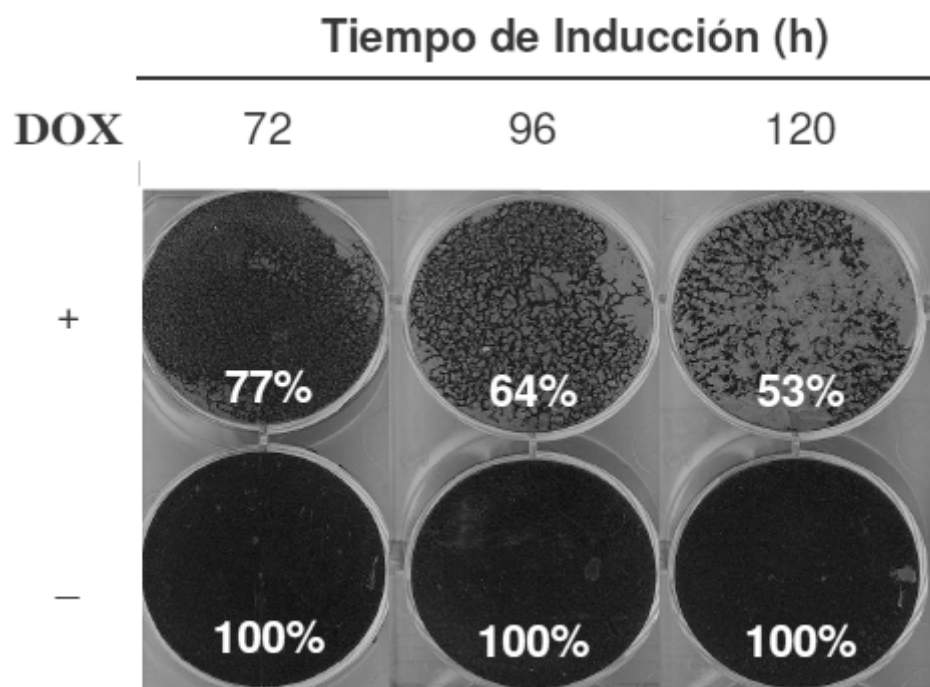


FIG. 9 (CONT.)

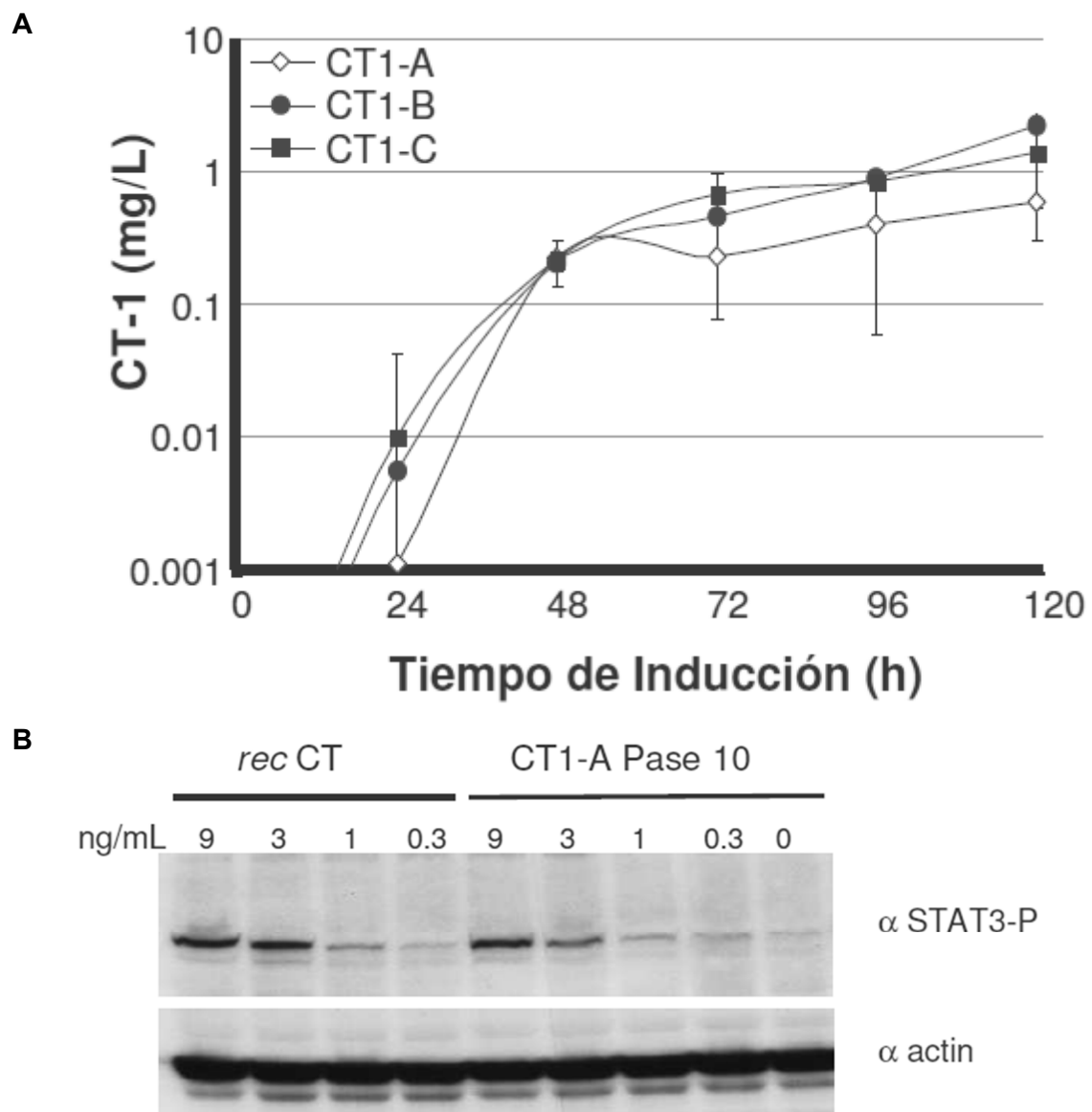


FIG. 10

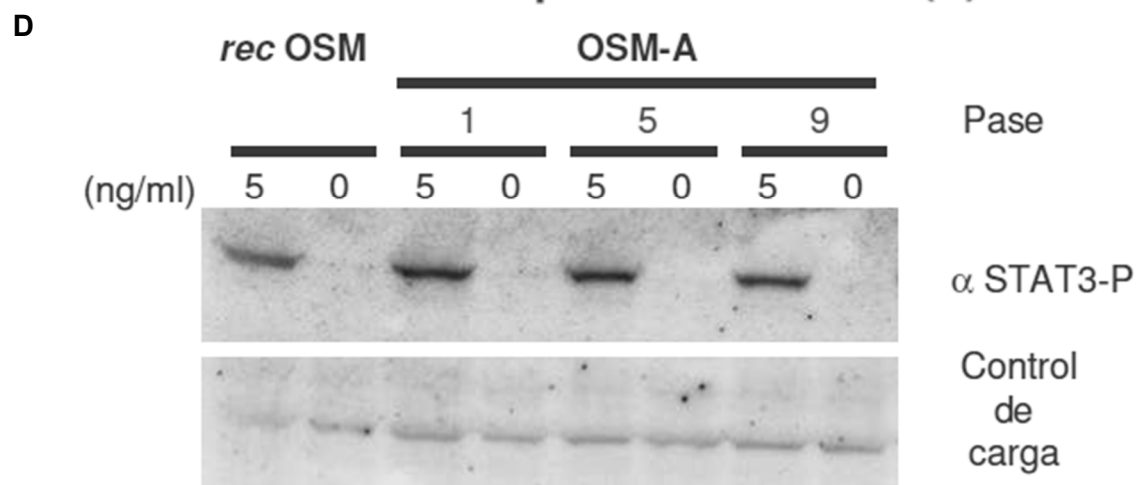
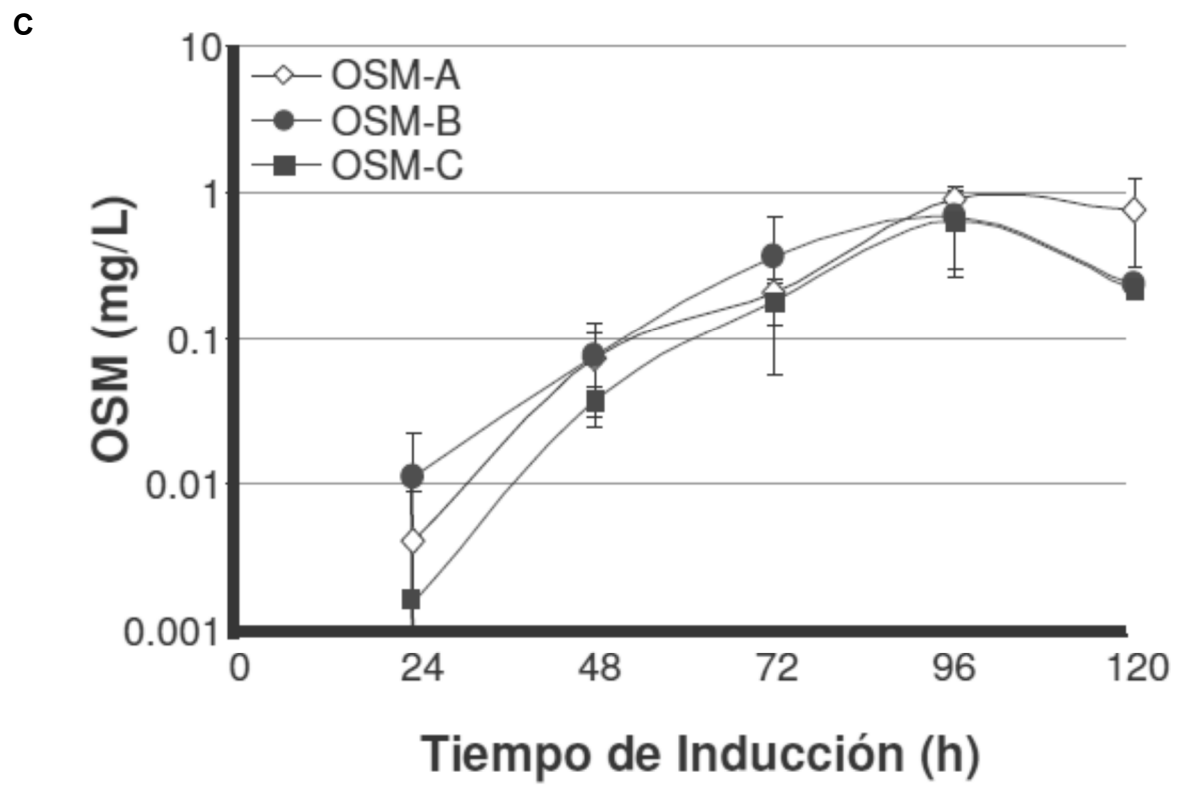


FIG. 10 (CONT.)

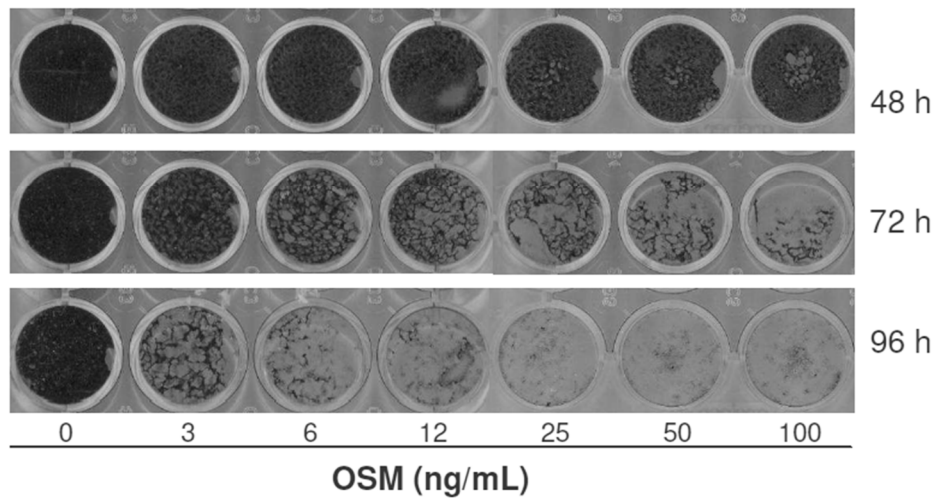
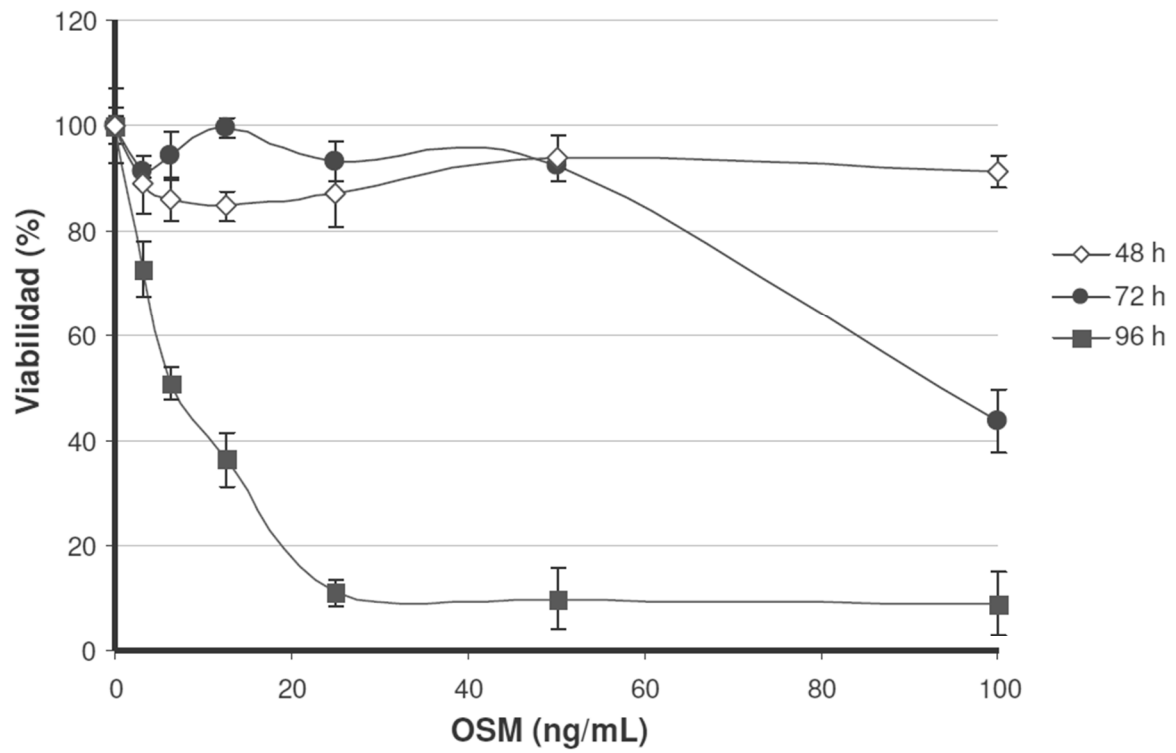


FIG. 11

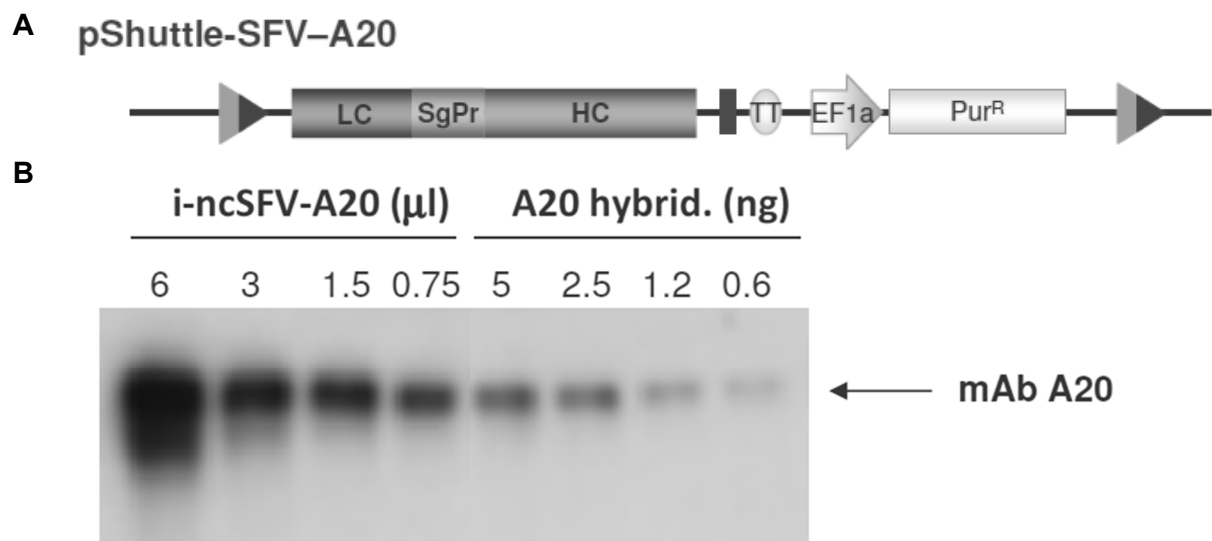


FIG. 12

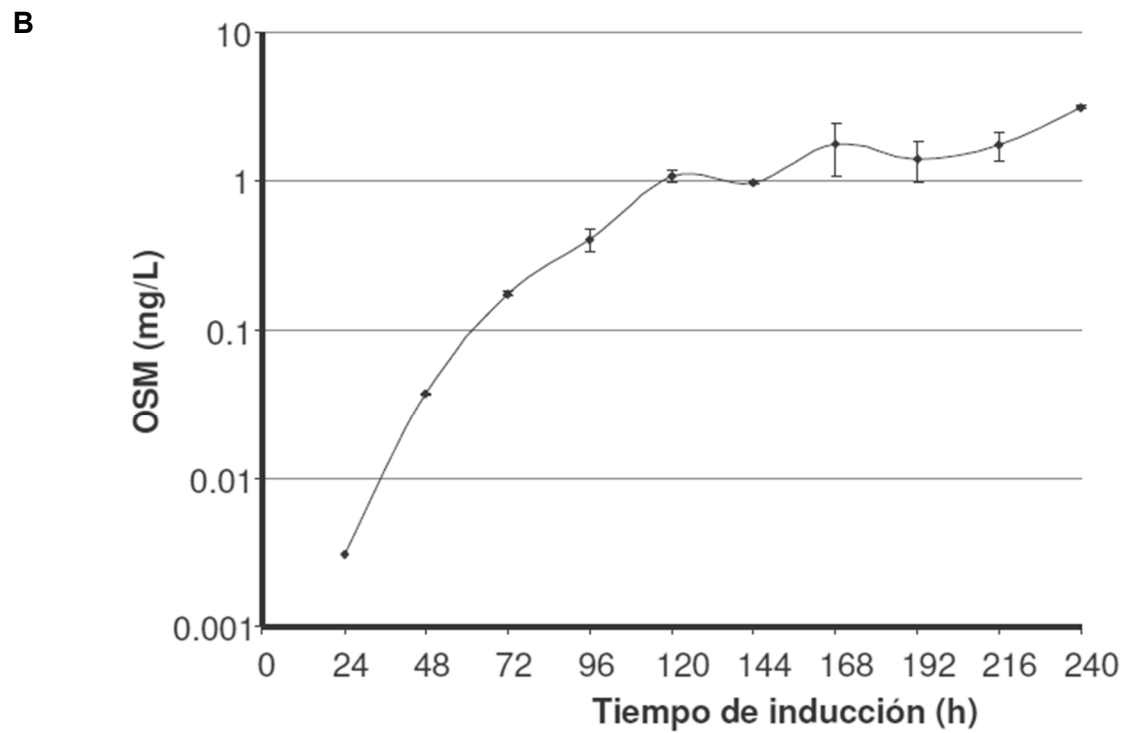
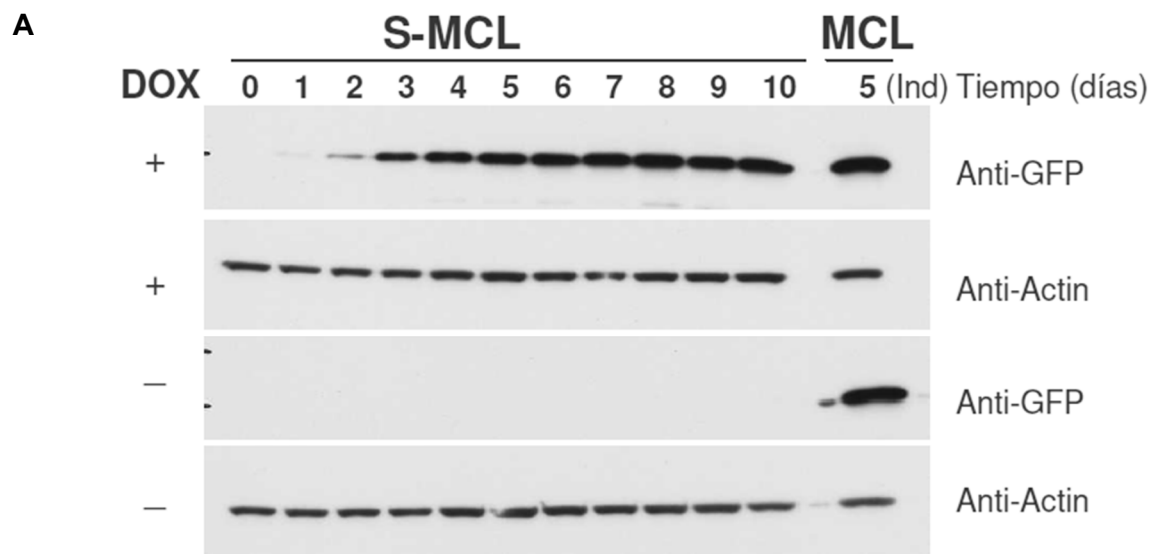


FIG. 13

ES 2 523 016 B1

SEQUENCE LISTING

<110> 3P BIOPHARMACEUTICALS

<120> VECTORES ALFAVIRALES Y LÍNEAS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

<130> P8332ES00

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 86

<212> DNA

<213> Semliki Forest virus

<400> 1

gatggcggat gtgtgacata cacgacgcc aaagattttg ttccagctcc tgccacctcc 60

gctacgcgag agattaacca cccacg 86

<210> 2

<211> 7296

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> secuencia que codifica la poliproteína no estructural del SFV con las mutaciones P718T y R649H

<400> 2

atggccgcc aagtgcattg tgatattgag gctgacagcc cattcatcaa gtctttgcag 60

aaggcatttc cgtcgttcga ggtggagtca ttgcagggtca caccaaata ccatgcaaat 120

gccagagcat ttctgcacct ggctacaaaa ttgatcgagc aggagactga caaagacaca 180

ctcatcttgg atatcggcag tgcgccttcc aggagaaatga tgtctacgca caaataccac 240

tgcgtatgcc ctatgcgcag cgcagaagac cccgaaaggc tcgatagcta cgcaaagaaa 300

ctggcagcgg cctccgggaa ggtgctggat agagagatcg caggaaaaat caccgacctg 360

cagaccgtca tggctacgcc agacgctgaa tctcctacct ttgcctgca tacagacgtc 420

acgtgtcgta cggcagccga agtggccgta taccaggacg tgtatgctgt acatgcacca 480

acatcgctgt accatcaggc gatgaaaggc gtcagaacgg cgtattggat tgggtttgac 540

accaccccggt ttatgtttga cgcgctagca ggcgctatc caacctacgc cacaactgg 600

gccgacgagc aggtgttaca ggccaggaac ataggactgt gtgcagcatc cttgactgag 660

ggaagactcg gcaaactgtc cattctccgc aagaagcaat tgaaaccttg cgacacagtc 720

atgttctcgg taggatctac attgtacact gagagcagaa agctactgag gagctggcac 780

ttaccctccg tattccacct gaaaggtaaa caatccttta cctgtaggtg cgataccatc 840

ES 2 523 016 B1

gtatcatgtg aaggggtacgt agttaagaaa atcactatgt gccccggcct gtacggtaaa	900
acggtaggggt acgccgtgac gtatcacgcg gagggattcc tagtgtgcaa gaccacagac	960
actgtcaaag gagaaaagagt ctcatccct gtatgcacct acgtcccctc aaccatctgt	1020
gatcaaatga ctggcatact agcgaccgac gtcacaccgg aggacgcaca gaagttgtta	1080
gtgggattga atcagaggat agttgtgaac ggaagaacac agcgaaacac taacacgatg	1140
aagaactatc tgcttccgat tgtggccgtc gcatttagca agtgggagag ggaatacaag	1200
gcagaccttg atgatgaaaa acctctgggt gtccgagaga ggtcacttac ttgctgctgc	1260
ttgtgggcat ttaaaacgag gaagatgcac accatgtaca agaaaccaga caccagaca	1320
atagtgaagg tgccttcaga gtttaactcg ttcgtcatcc cgagcctatg gtctacaggc	1380
ctcgcaatcc cagtcagatc acgcattaag atgcttttgg ccaagaagac caagcgagag	1440
ttaataacctg ttctcgacgc gtcgtcagcc agggatgctg aacaagagga gaaggagag	1500
ttggaggccg agctgactag agaagcctta ccacccctcg tccccatcg gccggcggag	1560
acgggagtcg tcgacgtcga cgttgaagaa ctagagtatc acgcaggtgc aggggtcgtg	1620
gaaacacctc gcagcgcgtt gaaagtcacc gcacagccga acgacgtact actaggaaat	1680
tacgtagttc tgtccccgca gaccgtgctc aagagctcca agttggcccc cgtgcaccct	1740
ctagcagagc aggtgaaaaa aataacacat aacgggaggg ccggcgggta ccaggtcgac	1800
ggatatgacg gcagggtcct actaccatgt ggatcggccca ttccggtccc tgagtttcaa	1860
gctttgagcg agagcgccac tatggtgtac aacgaaagg agttcgtcaa caggaaacta	1920
taccatattg ccgttcacgg accgtcgctg aacaccgacg aggagaacta cgagaaagtc	1980
agagctgaaa gaactgacgc cgagtacgtg ttcgacgtag ataaaaaatg ctgctcaag	2040
agagaggaag cgtcgggttt ggtgttggtg ggagagctaa ccaaccccc gttccatgaa	2100
ttcgctacg aagggctgaa gatcaggccg tcggcaccat ataagactac agtagtagga	2160
gtctttgggg ttccgggatc aggcaagtct gctattatta agagcctcgt gaccaaacac	2220
gatctgggtca ccagcggcaa gaaggagaac tgccaggaaa tagttaacga cgtgaagaag	2280
caccgcggga aggggacaag tagggaaaac agtgactcca tcctgctaaa cgggtgtcgt	2340
cgtgccgtgg acatcctata tgtggacgag gctttcgctt gccattccgg tactctgctg	2400
gccctaattg ctcttggtta acctcggagc aaagtgggtg tatgctgaga cccaagcaa	2460
tgcggtattct tcaatatgat gcagcttaag gtgaacttca accacaacat ctgcactgaa	2520
gtatgtcata aaagtatatc cagacgttgc acgcgtccag tcacggccat cgtgtctacg	2580
ttgcactacg gaggcaagat gcgcacgacc aaccctgca acaaaccat aatcatagac	2640

ES 2 523 016 B1

accacaggac	agaccaagcc	caagccagga	gacatcgtgt	taacatgctt	ccgaggctgg	2700
gcaaagcagc	tgcagttgga	ctaccgtgga	cacgaagtca	tgacagcagc	agcatctcag	2760
ggcctcaccc	gcaaaggggt	atacgccgta	aggcagaagg	tgaatgaaaa	tcccttgtat	2820
gccccctgct	cggagcacgt	gaatgtactg	ctgacgcgca	ctgaggatag	gctggtgtgg	2880
aaaacgctgg	ccggcgatcc	ctggattaag	gtcctatcaa	acattccaca	gggtaacttt	2940
acggccacat	tggaagaatg	gcaagaagaa	cacgacaaaa	taatgaaggt	gattgaagga	3000
ccggctgcgc	ctgtggacgc	gttccagaac	aaagcgaacg	tgtgttgggc	gaaaagcctg	3060
gtgcctgtcc	tggacactgc	cggaatcaga	ttgacagcag	aggagtggag	caccataatt	3120
acagcattta	aggaggacag	agcttactct	ccagtgggtg	ccttgaatga	aatttgcacc	3180
aagtactatg	gagttgacct	ggacagtggc	ctgttttctg	ccccgaaggt	gtccctgtat	3240
tacgagaaca	accactggga	taacagacct	ggtggaagga	tgtatggatt	caatgccgca	3300
acagctgcca	ggctggaagc	tagacatacc	ttcctgaagg	ggcagtggca	tacgggcaag	3360
caggcagtta	tcgcagaaaag	aaaaatccaa	ccgctttctg	tgctggacaa	tgtaattcct	3420
atcaaccgca	ggctgccgca	cgccctggtg	gctgagtaca	agacggttaa	aggcagtagg	3480
gttgagtggc	tggtaataa	agtaagaggg	taccacgtcc	tgctggtgag	tgagtacaac	3540
ctggctttgc	ctcgacacag	ggtcacttgg	ttgtcaccgc	tgaatgtcac	aggcgccgat	3600
aggtgctacg	acctaagttt	aggactgccg	gctgacgccg	gcaggttcga	cttggctctt	3660
gtgaacattc	acacggaatt	cagaatccac	cactaccagc	agtgtgtcga	ccacgccatg	3720
aagctgcaga	tgcttggggg	agatgcgcta	cgactgctaa	aaacgggcgg	catcttgatg	3780
agagcttacg	gatacgccga	taaaatcagc	gaagccgttg	tttcctcctt	aagcagaaaag	3840
ttctcgtctg	caagagtgtt	gcgcccggat	tgtgtcacca	gcaatacaga	agtgttcttg	3900
ctgttctcca	actttgacaa	cggaaagaga	ccctctacgc	tacaccagat	gaataccaag	3960
ctgagtgccg	tgtatgccgg	agaagccatg	cacacggccg	ggtgtgcacc	atcctacaga	4020
gttaagagag	cagacatagc	cacgtgcaca	gaagcggctg	tggttaacgc	agctaacgcc	4080
cgtggaactg	taggggatgg	cgtatgcagg	gccgtggcga	agaaatggcc	gtcagccttt	4140
aagggagcag	caacaccagt	gggcacaatt	aaaacagtca	tgtgcggctc	gtaccccgtc	4200
atccacgctg	tagcgcctaa	tttctctgcc	acgactgaag	cggaagggga	ccgcgaattg	4260
gccgctgtct	accgggcagt	ggccgcccga	gtaaacagac	tgtcactgag	cagcgtagcc	4320
atcccgtctg	tgtccacagg	agtgttcagc	ggcgggaagag	ataggctgca	gcaatccctc	4380
aaccatctat	tcacagcaat	ggacgccacg	gacgctgacg	tgaccatcta	ctgcagagac	4440
aaaagttggg	agaagaaaat	ccaggaagcc	attgacatga	ggacggctgt	ggagttgctc	4500

ES 2 523 016 B1

aatgatgacg tggagctgac cacagacttg gtgagagtgc acccgacag cagcctggtg	4560
ggtcgtaagg gctacagtac cactgacggg tcgctgtact cgtactttga aggtacgaaa	4620
ttcaaccagg ctgctattga tatggcagag atactgacgt tgtggcccag actgcaagag	4680
gcaaacgaac agatatgcct atacgcgctg ggcgaaacaa tggacaacat cagatccaaa	4740
tgtccggtga acgattccga ttcataca cctcccagga cagtgccctg cctgtgccgc	4800
tacgcaatga cagcagaacg gatcgcccgc cttagggtcac accaagttaa aagcatggtg	4860
gtttgctcat cttttccct cccgaaatac catgtagatg ggggtgcagaa ggtaaagtgc	4920
gagaaggttc tcctgttcga cccgacggta ccttcagtgg ttagtccgcg gaagtatgcc	4980
gcatctacga cggaccactc agatcggtcg ttacgagggt ttgacttgga ctggaccacc	5040
gactcgtctt ccactgccag cgataccatg tcgctacca gtttgagtc gtgtgacatc	5100
gactcgatct acgagccaat ggctcccata gtagtgacgg ctgacgtaca ccctgaaccc	5160
gcaggcatcg cggacctggc ggcagatgtg caccctgaac ccgcagacca tgtggacctc	5220
gagaaccoga ttctccacc gcgcccgaag agagctgcat accttgctc ccgcgcggcg	5280
gagcgaccgg tgccggcgcc gagaaagccg acgcctgccc caaggactgc gtttaggaac	5340
aagctgcctt tgacgttcgg cgactttgac gagcacgagg tcgatgcgtt ggctccggg	5400
attactttcg gagacttcga cgacgtcctg cgactaggcc gcgcgggtgc atatatatttc	5460
tcctcggaca ctggcagcgg acatttaca caaaaatccg ttaggcagca caatctccag	5520
tgcgcacaaac tggatgcggt ccaggaggag aaaatgtacc cgccaaaatt ggatactgag	5580
agggagaagc tgttgctgct gaaaatgcag atgcacccat cggaggctaa taagagtcga	5640
taccagtctc gcaaagtgga gaacatgaaa gccacggtgg tggacaggct cacatcgggg	5700
gccagattgt acacgggagc ggacgtaggc cgcataccaa catacgcggt tcggtacccc	5760
cgccccgtgt actcccctac cgtgatcgaa agattctcaa gcccgatgt agcaatcgca	5820
gcgtgcaacg aatacctatc cagaaattac ccaacagtgg cgtcgtacca gataacagat	5880
gaatacgacg catacttgga catggttgac gggtcggata gttgcttgga cagagcgaca	5940
ttctgcccgg cgaagctccg gtgctacccg aaacatcatg cgtaccacca gccgactgta	6000
cgcagtgcg tcccgtcacc ctttcagaac aactacaga acgtgctagc ggccgccacc	6060
aagagaaact gcaacgtcac gcaaattgca gaactacca ccatggactc ggcatgttc	6120
aacgtggagt gcttcaagcg ctatgcctgc tccggagaat attgggaaga atatgctaaa	6180
caacctatcc ggataaccac tgagaacatc actacctatg tgaccaaatt gaaaggcccg	6240
aaagctgctg ccttgttcgc taagaccac aacttggttc cgctgcagga gggtcccatg	6300

ES 2 523 016 B1

gacagattca cggtcgacat gaaacgagat gtcaaagtca ctccaggac gaaacacaca	6360
gaggaaagac ccaaagtcca ggtaattcaa gcagcggagc cattggcgac cgcttacctg	6420
tgcggcatcc acagggaatt agtaaggaga ctaaagtctg tgttacgcc taacgtgcac	6480
acattgtttg atatgtcggc cgaagacttt gacgcgatca tcgcctctca cttccacca	6540
ggagaccccg ttctagagac ggacattgca tcattcgaca aaagccagga cgactccttg	6600
gctcttacag gtttaatatgat cctcgaagat ctaggggtg atcagtagct gctggacttg	6660
atcgaggcag cctttgggga aatatccagc tgtcacctac caactggcac gcgcttcaag	6720
ttcgagagta tgatgaaatc gggcatgttt ctgactttgt ttattaacac tgttttgaac	6780
atcaccatag caagcagggt actggagcag agactcactg actccgcctg tgcggccttc	6840
atcggcgacg acaacatcgt tcacggagt atctccgaca agctgatggc ggagaggtgc	6900
gcgtcgtggg tcaacatgga ggtgaagatc attgacgctg tcatgggcga aaaaccccca	6960
tatTTTTgtg ggggattcat agTTTTtgac agcgtcacac agaccgcctg ccgtgtttca	7020
gaccactta agcgcctgtt caagttgggt aagccgctaa cagctgaaga caagcaggac	7080
gaagacaggc gacgagcact gagtgcagc gtttagcaagt ggttccggac aggcttgggg	7140
gccgaactgg aggtggcact aacatctagg tatgaggtag agggctgcaa aagtatcctc	7200
atagccatgg ccaccttggc gagggacatt aaggcgttta agaaattgag aggacctgtt	7260
atacacctct acggcggtcc tagattggtg cgtaa	7296

<210> 3
 <211> 840
 <212> DNA
 <213> Semliki Forest virus

<400> 3 attacatccc tacgcaaacg ttttacggcc gccggtggcg cccgcgccc gcggcccgtc	60
cttggccgtt gcaggccact ccggtggctc ccgtcgtccc cgacttccag gccagcaga	120
tgcagcaact catcagcgcc gtaaagtgcg tgacaatgag acagaacgca attgctcctg	180
ctaggcctcc caaaccaaag aagaagaaga caaccaaacc aaagccgaaa acgcagccca	240
agaagatcaa cggaaaaaacg cagcagcaaa agaagaaaga caagcaagcc gacaagaaga	300
agaagaaacc cggaaaaaaga gaaagaatgt gcatgaagat tgaaaatgac tgtatcttcg	360
tatgcggcta gccacagtaa cgtagtgttt ccagacatgt cgggcaccgc actatcatgg	420
gtgcagaaaa tctcgggtgg tctgggggcc ttcgcaatcg gcgctatcct ggtgctggtt	480
gtggtcactt gcattgggct ccgcagataa gttagggtag gcaatggcat tgatatagca	540
agaaaattga aaacagaaaa agttagggtg agcaatggca tataaccata actgtataac	600

ES 2 523 016 B1

ttgtaacaaa gcgcaacaag acctgcgcaa ttggccccgt ggtccgcctc acggaaactc	660
ggggcaactc atattgacac attaattggc aataattgga agcttacata agcttaattc	720
gacgaataat tggatttttta ttttattttg caattggttt ttaatatattc caaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	840

<210> 4
 <211> 503
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia reguladora de la transcripción p07Palb

<400> 4 tcgagttttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct	60
atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag	120
tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca	180
ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagttttac cactccctat cagtgataga	240
gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagc	300
tcggtacaca gctccagatg gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca actttttggc	360
aaagatggta tgattttgta atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta	420
atgatctaca gttattgggtt aaagaagtat attagagcga gtcttttctgc acacacgatc	480
accttttcta tcaacccac tat	503

<210> 5
 <211> 467
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variante de la secuencia reguladora de la transcripción p07Palb

<400> 5 tcgagttttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct	60
atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag	120
tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca	180
ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagttttac cactccctat cagtgataga	240
gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagc	300
tcggtacaca gctccagatg gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca actttttggc	360
aaagatggta tgattttgta atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta	420
atgatctaca gttattgggtt aaagaagtat attagagcga gtcttttc	467

ES 2 523 016 B1

<210> 6
 <211> 479
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variante de la secuencia reguladora de la transcripción p07Palb

<400> 6
 tcgagttttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct 60
 atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag 120
 tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca 180
 ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagttttac cactccctat cagtgataga 240
 gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagc 300
 tcggtacaca gctccagatg gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca actttttggc 360
 aaagatggta tgattttgta atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta 420
 atgatctaca gttattgggtt aaagaagtat attagagcga gtctttctgc acacacgat 479

<210> 7
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variante de la secuencia reguladora de la transcripción p07Palb

<400> 7
 tcgagttttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct 60
 atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag 120
 tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca 180
 ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagttttac cactccctat cagtgataga 240
 gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagc 300
 tcggtacaca gctccagatg gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca actttttggc 360
 aaagatggta tgattttgta atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta 420
 atgatctaca gttattgggtt aaagaagtat attagagcga gtctttctgc acacacgatc 480

<210> 8
 <211> 481
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variante de la secuencia reguladora de la transcripción p07Palb

ES 2 523 016 B1

<400> 8
 tcgagttttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct 60
 atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag 120
 tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagttttacca 180
 ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagttttac cactccctat cagtgataga 240
 gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagc 300
 tcggtacaca gctccagatg gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca actttttggc 360
 aaagatggta tgattttgta atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta 420
 atgatctaca gttattgggt aaagaagtat attagagcga gtctttctgc acacacgatc 480
 a 481

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia LoxP1

<400> 9
 taccgttcgt ataaagtatc ctatacgaag ttat 34

<210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia LoxP2

<400> 10
 taccgttcgt ataagtgtga ctatacgaag ttat 34

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

<220>
 <223> Secuencia LoxP3

<400> 11
 ataacttcgt ataaagtatc ctatacgaac ggta 34

<210> 12
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 523 016 B1

<220>
 <223> Secuencia LoxP4

<400> 12
 ataacttcgt ataatgtgta ctatacgaac ggta 34

<210> 13
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Simian virus 40

<400> 13
 cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatgga gatccaattt ttaagtgtat 60
 aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattcacagt cccaaggctc 120
 atttcaggcc cctcagtcct cacagtctgt tcatgatcat aatcagccat accacatttg 180
 tagagggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 240
 tgaatgcaat tggtgttggt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 300
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt 360
 ccaaactcat caatgtatct t 381

<210> 14
 <211> 317
 <212> DNA
 <213> Simian virus 40

<400> 14
 ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60
 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120
 tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccac cgcgccctaa 180
 ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240
 aggccgaggc cgctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 300
 gcctaggctt ttgcaaa 317

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> herpes simplex virus 7

<400> 15
 Pro Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 1 5 10

<210> 16
 <211> 747

ES 2 523 016 B1

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia que codifica el activador transcripcional rtTA2sM2

<400> 16
 atgtctagac tggacaagag caaagtcata aacggcgctc tggaattact caatggagtc 60
 ggtatcgaag gcctgacgac aaggaaactc gctcaaaagc tgggagttga gcagcctacc 120
 ctgtactggc acgtgaagaa caagcggggc ctgctcgatg ccctgccaat cgagatgctg 180
 gacaggcatc atacccactt ctgccccctg gaaggcgagt catggcaaga ctttctgcgg 240
 aacaacgcca agtcattccg ctgtgctctc ctctcacatc gcgacggggc taaagtgcac 300
 ctcggcaccc gccaacaga gaaacagtac gaaaccctgg aaaatcagct cgcgttcctg 360
 tgtcagcaag gcttctccct ggagaacgca ctgtacgctc tgtccgccgt gggccacttt 420
 aactggggct gcgtattgga ggaacaggag catcaagtag caaaagagga aagagagaca 480
 cctaccaccg attctatgcc ccacttctg agacaagcaa ttgagctggt cgaccggcag 540
 ggagccgaac ctgccttcct tttcggcctg gaactaatca tatgtggcct ggagaaacag 600
 ctaaagtgcg aaagcggcg gccggccgac gcccttgacg attttgactt agacatgctc 660
 ccagccgatg cccttgacga ctttgacctt gatatgctgc ctgctgacgc tcttgacgat 720
 tttgaccttg acatgctccc cgggtaa 747

<210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el gen que confiere resistencia a higromicina

<400> 17
 cccgggatga aaaagcctga actca 25

<210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen que confiere resistencia a higromicina

<400> 18
 gcggccgcct attcctttgc cctcggac 28

<210> 19

ES 2 523 016 B1

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el vector pSFV-1

 <400> 19
 atggcggatg tgtgacatac acg 23

 <210> 20
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector pSFV-1

 <400> 20
 gctcctcgcc cttgctcacc atcgtgggtg gttaatctct cgcgtag 47

 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el vector pCMV-GFP

 <400> 21
 atggtgagca agggcgagga 20

 <210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector pCMV-GFP

 <400> 22
 actagtctta agatacattg atgagtttgg 30

 <210> 23
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el vector
 AAV8-Tetbidir-Alb-CMVm-luc

 <400> 23
 atgcatcgcg atagcggtag cgagctctta cgctcgagt 39

 <210> 24

ES 2 523 016 B1

<211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector
 AAV8-Tetbidir-Alb-CMVm-luc

 <400> 24
 ggtggcagga gctggaacaa aatcttttgg cgctcgtgtat gtcacacatc cgccat 56

 <210> 25
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector
 AAV8-Tetbidir-Alb-CMVm-luc

 <400> 25
 ggtggcagga gctggaacaa aatcttttgg cgctcgtgtat gtcacacatc cgccatgac 60
 gtgtgtgcag aaagactcgc tc 82

 <210> 26
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector
 AAV8-Tetbidir-Alb-CMVm-luc

 <400> 26
 ggtggcagga gctggaacaa aatcttttgg cgctcgtgtat gtcacacatc cgccatatgt 60
 cgtgtgtgca gaaagactcg ctc 83

 <210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el vector pSFV-1

 <400> 27
 agagctcggc cgccctcgcc tctga 25

 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector pSFV-1

ES 2 523 016 B1

<400> 28
 atgcatggcg gtaatacggg ta 22

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el vector pSFV-1

<400> 29
 atggcggtatg tgtgacatac acg 23

<210> 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector pSFV-1

<400> 30
 gggcccgata tccaagatga gtgtgtc 27

<210> 31
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el vector pSFV-1

<400> 31
 actagtataa cttcgtatag tacacattat acgaacggta gtgggcgaag aactccagca 60

tg 62

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el gen de GFP

<400> 32
 ggatccatgg tgagcaaggg cgaggagc 28

<210> 33
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 523 016 B1

<223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen de GFP

<400> 33
cccgggatct taattaatta cttgtacagc tcgtccatgc cga 43

<210> 34
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido sentido para generar el sitio LoxP1

<400> 34
gatctaccgt tcgtataaag tadcctatac gaagttatc 39

<210> 35
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido para generar el sitio LoxP1

<400> 35
gatcgataac ttcgtatagg atactttata cgaacggta 39

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido sentido para generar un fragmento con las
secuencias LoxP1-GFP-SV40PolyA-SV40Prom-neo-LoxP2-TK-PolyA

<400> 36
catatgtacc gttcgtataa agtatcct 28

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido para generar un fragmento con las
secuencias LoxP1-GFP-SV40PolyA-SV40Prom-neo-LoxP2-TK-PolyA

<400> 37
actagtgtcta tggcagggcc tgccgccccg 30

<210> 38
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 523 016 B1

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el promotor EF1a

 <400> 38
 gatatcgtga ggctccggtg cccgtcag 28

 <210> 39
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el promotor EF1a

 <400> 39
 gcggccgctt cacgacacct gaaatggaag aaaaaaactt tgaa 44

 <210> 40
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para generar la secuencia LoxP3 seguida
 de un sitio de clonación múltiple

 <400> 40
 tataacttcg tataaagtat cctatacgaa cggtatctag atctcgcgag ctcagccata 60
 tg 62

 <210> 41
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para generar la secuencia LoxP3
 seguida de un sitio de clonación múltiple

 <400> 41
 tatggctgag ctgcgcgagat ctagataccg ttcgtatagg atactttata cgaagttat 59

 <210> 42
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar la señal de
 poliadenilación de SV40

 <400> 42
 catatgttag ggtaggcaat ggcattga 28

 <210> 43

ES 2 523 016 B1

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar la señal de poliadenilación de SV40

 <400> 43
 cagctgctgg cttaactatg cggcac 27

 <210> 44
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para generar el sitio LoxP4

 <400> 44
 catgggatca taacttcgta taatgtgtac tatacgaacg gccatg 46

 <210> 45
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para generar el sitio LoxP4

 <400> 45
 gatccatggc cggttcgtata gtacacatta tacgaagta tgatcc 46

 <210> 46
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el gen Tomato

 <400> 46
 agatctgcac catggtgagc aagggcgagg a 31

 <210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen Tomato

 <400> 47
 catatgttac ttgtacagct cgtccatg 28

 <210> 48

ES 2 523 016 B1

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el gen humano de
 cardiotrofina-1

 <400> 48
 agatctgcac catgtcggcc ctgctgatcc tgg 33

<210> 49
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen humano de
 cardiotrofina-1

 <400> 49
 catatgtcag gccgagcccc cgggcag 27

<210> 50
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para amplificar el gen humano de
 oncostatina M

 <400> 50
 ggatcctcgc gaggaccatg tcggccctgc tgatcctggc cctggtcgga gccgccgtcg 60
 cccaccacca ccaccaccac gcggctatag gcagctgctc g 101

<210> 51
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen humano de
 oncostatina M

 <400> 51
 ggatccatat gctatctccg gctccggttc gggc 34

<210> 52
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para detectar ARN de SFV que codifican
 GFP

ES 2 523 016 B1

<400> 52 cctaggggga cattaaggcg ttttaag	26
<210> 53 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleótido antisentido para detectar ARN de SFV que codifican GFP	
<400> 53 gtcctccttg aagtcgatgc	20
<210> 54 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el gen humano de cardiotrofina 1	
<400> 54 cgacatggtg cagatctaga	20
<210> 55 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleótido antisentido para detectar la la secuencia de TK-PolyA	
<400> 55 ccgtgtttca gttagcctcc ccc	23
<210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleótido sentido para detectar el intercambio de neomicina y purimicina	
<400> 56 tgctcctgcc gagaaagtat	20
<210> 57 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	

ES 2 523 016 B1

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para detectar el intercambio de neomicina y purimicina

 <400> 57
 aagcttccgc cacgaccggt gccg 24

 <210> 58
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para detectar la replicasa

 <400> 58
 ctgttctcga cgcgtcgtc 19

 <210> 59
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para detectar la replicasa

 <400> 59
 gaggtgtttc cacgaccc 18

 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido para detectar actina

 <400> 60
 gggatgtttg ctccaaccaa 20

 <210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para detectar actina

 <400> 61
 gcgcttttga ctcaaggatt taa 23

 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 523 016 B1

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el ADNc en el análisis del sitio de iniciación de la transcripción a partir del promotor mínimo de albúmina

<400> 62
 tgcttgctcg ccatgatata 20

<210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el ADNc en el análisis del sitio de iniciación de la transcripción a partir del promotor mínimo de albúmina

<400> 63
 gaacttcagg gtcagcttgc 20

<210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para amplificar el ADNc en el análisis del sitio de iniciación de la transcripción a partir del promotor mínimo de albúmina

<400> 64
 aacttggtggc cgtttacgtc 20

<210> 65
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido sentido para insertar un promotor subgenómico entre los genes de las cadena pesada y ligera del anticuerpo A20

<400> 65
 agatctcacc atgaagttgc ctgttaggct g 31

<210> 66
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido para insertar un promotor subgenómico entre los genes de las cadena pesada y ligera del anticuerpo A20

<400> 66

ES 2 523 016 B1

ccaatctagg accgccgtag aggtttaaca ctcattcctg ttgaagct 48

<210> 67
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Olignucleótido sentido para insertar un promotor subgenómico entre los genes de las cadena pesada y ligera del anticuerpo A20

<400> 67
 acctctacgg cggtcctaga ttggtgcgtt aatacacaga attctgattg caccatggca 60
 tggaacttca tcatgggc 78

<210> 68
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Olignucleótido antisentido para insertar un promotor subgenómico entre los genes de las cadena pesada y ligera del anticuerpo A20

<400> 68
 catatgctat ttacccggag tccgggag 28

<210> 69
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia LoxP salvaje

<400> 69
 ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat 34

<210> 70
 <211> 271
 <212> DNA
 <213> herpes simplex virus 7

<400> 70
 gggggaggct aactgaaaca cggaaggaga caataccgga aggaaccgc gctatgacgg 60
 caataaaaag acagaataaa acgcacggtg ttgggtcgtt tgttcataaa cgcggggttc 120
 ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc caatacgccc 180
 gcgtttcttc cttttcccca cccaccccc caagtctggg tgaaggccca gggctcgag 240
 ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgccatag c 271



- (21) N.º solicitud: 201330722
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2013
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: **C12N15/86** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GEISS, B.J. et al., 'Recombination-ready Sindbis replicon expression vectors for transgene expression', VIROLOGY JOURNAL, 2007, Vol. 4, Página 112, ISSN: 1743-422X (Electronic), doi: 10.1186/1743-422X-4-112, Materiales y Métodos, Figura 1.	1,36,37,50,62,74
X	STEEL, J.J. et al., 'Infectious alphavirus production from a simple plasmid transfection+', VIROLOGY JOURNAL, 2011, Vol. 8, Página 356, ISSN: 1743-422X (Electronic), doi: 10.1186/1743-422X-8-356, Métodos, Figura 1.	1,36,37,50,62,74
A	WO 2011064437 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA S.L) 03.06.2011, todo el documento.	1-79
A	WO 2012001196 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA S.L.) 05.01.2012, todo el documento.	1-79
A	QUETGLAS, J.I. et al., 'Alphavirus vectors for cancer therapy', VIRUS RESEARCH, 2010 Nov, Vol. 153, No. 2, Páginas 179-196, ISSN: 0168-1702, doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.027, todo el documento.	1-79
A	RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al., 'Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy', JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, 2006, Vol. 35, No. 3, Páginas 233-243, ISSN: 1386-6532 (Print), todo el documento.	1-79
A	KARLSSON, G.B. et al., 'Delivery and expression of heterologous genes in mammalian cells using self-replicating alphavirus vectors', METHODS MOL. BIOL., 2004, Vol. 246, Páginas 543-557, ISSN: 1064-3745 (Print), todo el documento.	1-79
A	WANG, Y. et al., 'Recombinase technology: applications and possibilities', Plant Cell Reports, 2011, Vol. 30, No. 3, Páginas 267-285, ISSN: 0721-7714, todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.04.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 17-20, 62-79	SI
	Reivindicaciones 1-16, 21-25, 33-61	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 17-20, 62-79	SI
	Reivindicaciones 1-16, 21-25, 33-61	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GEISS, B.J. et al., <i>Viol. J.</i> , (2007), 4: 112.	2007
D02	STEEL, J.J. et al., <i>Viol. J.</i> , (2011), 8:356.	2011
D03	WO 2011064437 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA S.L.)	03.06.2011
D04	WO 2012001196 A2 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA S.L.)	05.01.2012
D05	QUETGLAS, J.I. et al., <i>Virus Res.</i> , (2010), 153(2):179-96.	2010
D06	RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al., <i>J. Clin. Virol.</i> , (2006), 35(3): 233-43.	2006
D07	KARLSSON, G.B. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2004), 246:543-57.	2004
D08	WANG, Y. et al., <i>Plant Cell Rep.</i> , (2011), 30(3): 267-85.	2011

En D01-D07 se divulgan diferentes vectores de expresión alfavirales para la producción de proteínas recombinantes. En D08 se analiza el uso de las recombinasas en ingeniería genómica.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 36, 37, 50.

- 1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un polinucleótido que comprende, ordenados en la dirección 5' a 3', (i) una secuencia reguladora de la transcripción, (ii) una secuencia de ADN complementaria a un replicón de un alfavirus, unida operativamente a la secuencia (i), que comprende una primera secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio situada entre la secuencia del promotor subgenómico y la secuencia 3'-URT no traducida del replicón del alfavirus, (iii) una secuencia de terminación de la transcripción y (iv) una segunda secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica de sitio. Las reivindicaciones 36, 37, 50, 62 y 74 tratan de vectores de expresión (36 y 62), de una célula eucariota (37) y de métodos 'in vitro' para generar una línea celular capaz de expresar un gen de interés (50 y 74) relacionados con el polinucleótido de la reivindicación 1.

En los documentos D01-D02 se describe un sistema basado en la tecnología de recombinación específica de sitio del fago lambda para la construcción rápida y específica de replicones recombinantes del alfavirus Sindbis (SIN), que expresan un gen de interés insertado en la orientación deseada. Los replicones obtenidos comprenden básicamente la siguientes secuencias ordenados en la dirección 5' a 3': (i) un promotor de la transcripción (CMV), (ii) una secuencia de ADN complementaria al replicón de SIN, que incluye dos secuencias *attR* de reconocimiento de la recombinasa del fago lambda que flanquean a la secuencia del gen de interés. La primera *attR* se sitúa entre la secuencia del promotor subgenómico y la secuencia 3'-URT de SIN, y la secuencia *attR* en posición 3' respecto de la secuencia de terminación de la transcripción del gen de interés (GFP). (cf. D01: Materiales y métodos, Figura 1. D02: Métodos, Figura 1).

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones 1, 36, 37, 50 y el de las reivindicaciones dependientes 2-16, 21-25, 33-35, 38-49, 51-61 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base del documento D01-D02.

- 1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de la reivindicación 1-16, 21-25, 33-61 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.