

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.11.28	(73) Titular(es): PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. AVENIDA. PIO XII, 22 OFICINA 1 31008 PAMPLONA - NAVARRA ES
(30) Prioridade(s): 2006.11.28 ES 200603036 2007.04.03 ES 200700882	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.09.09	(72) Inventor(es): JESÚS PRIETO VALTUEÑA ES CRISTIAN SMERDOU PICAZO ES ERKUDEN CASALES ZOCO ES JUAN ROBERTO RODRÍGUEZ MADDOZ ES NEREA RAZQUIN ERRO ES
(45) Data e BPI da concessão: 2010.08.25 230/2010	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VECTOR VIRAL E SUAS APLICAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM VECTOR VIRAL QUE COMPREENDE UMA RÉPLICA DO VÍRUS DA FLORESTA DE SEMLIKI (SFV), NA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICA A SUBUNIDADE NSP2 DA REPLICASE SFV. O MENCIONADO VECTOR VIRAL PODE SER UTILIZADO PARA A GERAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES ESTÁVEIS QUE PODEM EXPRESSAR CONSTITUTIVAMENTE PRODUTOS HETERÓLOGOS DE INTERESSE.

DESCRIÇÃO

VECTOR VIRAL E SUAS APLICAÇÕES

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está compreendida no campo de engenharia genética. A presente invenção refere-se especificamente a vectores virais que sofreram mutação e às suas aplicações, particularmente em geração de linhagem de células estáveis *in vitro* e produção de proteínas de forma constitutiva.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Foram desenvolvidos vectores de expressão de alfa vírus a partir de diferentes vírus, que incluem o vírus Sindbis (SIN) (34), o vírus da floresta de Semliki (SFV) (18) e o vírus da encefalite equina venezuelana (VEE) (25). Os vectores de alfa vírus são normalmente baseados em réplicas de RNA nas quais os genes estruturais foram substituídos por um gene heterólogo.

A réplica de alfa vírus contém um ORF que codifica a replicase viral (Rep) na sua extremidade 5', que é traduzida quando o RNA é transfectado em células eucarióticas. A Rep é expressa na forma de poliproteína que é processada em seguida em quatro subunidades (nsps 1 a 4) (30). A Rep não processada pode copiar o vector de RNA numa linhagem de RNA negativa, um processo que tem lugar apenas durante as primeiras três a quatro primeiras horas após a transfecção ou infecção. Uma vez processada, a Rep utilizará o RNA de linhagem negativa como um molde para a

síntese de outras moléculas reprodutoras. A Rep processada pode também reconhecer uma sequência interna no RNA de linhagem negativa ou promotor subgenômico, do qual sintetizará um RNA de linhagem positiva subgenômica correspondente à extremidade 3' da réplica. Este RNA subgenômico será traduzido para produzir a proteína heteróloga em grandes quantidades. O RNA de réplica pode também ser embalado em partículas virais por meio da co-transfecção de células com um ou mais RNAs auxiliares que podem fornecer as proteínas estruturais virais em trans (2, 4, 8, 25, 29) ou utilizando linhagens celulares de embalagem estáveis (24).

A reprodução do vector de alfavírus é citopática na maior parte das células de mamíferos devido a mecanismos que ainda não são completamente compreendidos (3, 9, 13). O efeito citopático induzido por esses vectores é mediado por apoptose independente de p53 e normalmente ocorre de 48 a 72 horas após a transfecção ou infecção (14). Suspeita-se que nsp2, um dos quatro componentes da replicase viral, poderá ter um papel importante na indução da apoptose (11, 12).

Os vectores alfavírus citopáticos vêm sendo utilizados numa série de aplicações, que incluem a produção e caracterização de proteína *in vitro* (33), bem como em estudos sobre a vacinação e em terapia genética de cancro (19, 26). Uma desvantagem importante desse vector viral do tipo selvagem repousa no facto de não poderem ser utilizados em aplicações em que se deseja expressão de transgene de longa duração.

Para solucionar esta desvantagem, diversos grupos

identificaram uma série de mutações na replicase de alfavírus que podem converter esses vectores virais citopáticos em vectores virais não citopáticos, o que permite uma expressão com duração mais longa dos produtos recombinantes expressos pelo vector viral. Estes estudos levaram à geração de vectores não citopáticos derivados de SIN (7, 22), SFV (20-22) e, mais recentemente, de VEE e EEE (vírus da encefalite equina do leste) (23).

A maior parte das mutações não citopáticas detectadas em alfavírus foi localizada na subunidade Rep nsp2. Esta proteína contém um domínio helicase na extremidade amino e um domínio proteolítico na extremidade carboxilo, em que este último está envolvido no processamento de Rep nas suas quatro subunidades (30). Demonstrou-se que as mutações não citopáticas descritas para nsp2 afectam o domínio proteolítico de nsp2 ou as posições próximas dos locais de divisão entre nsp1/2 ou nsp2/3, de forma a alterar o processamento de Rep.

Um mutante não citopático isolado em SIN, que continha uma única alteração de aminoácido (P para L) na posição 726 em nsp2 (vector SIN P726L em nsp2), exibiu hiperprocessamento de Rep (7). Este mutante foi capaz de estabelecer efectivamente a reprodução contínua em células de BHK. A introdução de diferentes alterações de aminoácidos na mesma posição desse mutante demonstrou que existe uma forte correlação positiva entre o nível de reprodução de NRA e a citopatogenicidade do vector. Este vector de SIN não citopático possui ampla utilização *in vitro*, pois ele pode fornecer uma expressão de transgene de longa duração com bons níveis de estabilidade e níveis de expressão que foram de cerca de 4% dos obtidos com o vector

SIN original do tipo selvagem (wt) (1). Apesar do facto de o mencionado vector não ser citopático, entretanto, não possui a capacidade de gerar linhagens celulares estáveis com altos níveis de expressão. De facto, em linhagens celulares geradas com o vector de SIN P726L que conduz o gene LacZ, a expressão do transgene foi perdida em 45% das células transfectadas após cinco passagens e a estabilidade da expressão somente foi atingida por meio de selecção de clones individuais (1), que atrasaram consideravelmente a obtenção de um alto número de células que podem expressar eficientemente o transgene. Mesmo assim, estas linhagens mantiveram baixos níveis de expressão (4% dos níveis obtiveram o vector SIN do tipo selvagem).

Um vector de SFV não citopático que compreende as mutações P718T e R649H (R649H/P718T) na subunidade nsp2, que expressa o gene pac de resistência à puromicina, foi descrito adicionalmente, embora a sua capacidade de geração de linhagens celulares estáveis em alta expressão não tenha sido descrita (Smerdou, C. et al., 2004, Sétimo Simpósio Internacional Sobre Vírus de RNA de Linhagem Positiva, São São Francisco, EUA).

Com relação aos mutantes de SFV não citopáticos descritos por Perri et al (22), que incluem os mutantes SF2A (mutação L10T em nsp2) e SF2C (mutação L713P em nsp2), bem como ED mutante duplo (S259P e R650D em nsp2) descrito por Lundström et al (21), é verdade que eles podem expressar níveis de proteína que são similares ou até maiores que os do vírus do tipo selvagem (PD mutante), mas em todos os casos estes mutantes ainda são citopáticos (vide o Exemplo 8 da presente memória descritiva) e a geração de linhagens celulares estáveis que expressam

proteínas heterólogas com base nos mencionados vectores virais não foi descrita. Os dados relativos ao efeito citopático do vector SFV-PD são adicionalmente sustentados por resultados publicados posteriormente por Lundström et al (20), que demonstram como a expressão de β -gal ou GFP em células de BHK infectadas com um vector de SFV-PD que conduz LacZ ou GFP como um gene marcador atinge o máximo após 48 horas para cair drasticamente em seguida nos três a quatro dias seguintes, o que indica a ocorrência de um efeito citopático nas células (vide Figura 2 da referência mencionada).

Portanto, embora mutantes pontuais no gene que codifica a proteína nsp2 dos alfavírus SIN e SFV tenham sido descritos e embora esses mutantes possuam uma redução da citopatogenicidade, nenhum dos mencionados mutantes exibiu a capacidade de gerar linhagens de células estáveis com altos níveis de expressão.

Portanto, existe ainda a necessidade de desenvolver vectores alfavírus virais não citopáticos alternativos, úteis para a produção de linhagens de células estáveis que podem produzir a proteína heteróloga na presença de selecção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Vectores alfavírus podem expressar altos níveis de proteína recombinante em diferentes tipos de células. Esta expressão, entretanto, é transitória devido à natureza citopática da reprodução viral. Para adaptar estes vectores a estudos de longo prazo, foram isolados mutantes não citopáticos do vírus Sindbis (SIN), do vírus da floresta de

Semliki (SFV) e do vírus da encefalite equina venezuelana (VEE). A maior parte desses mutantes contém alterações em nsp2, uma subunidade da replicase viral.

Para gerar novos factores de SFV não citopáticos, as mutações descritas para a criação de um vector SIN não citopático foram introduzidas numa posição conservada em SFV. Curiosamente, descobriu-se que uma réplica de SFV que contém mutação P718T em nsp2 e carrega gene LacZ como um gene heterólogo (SFV-LacZ) gerou variantes não citopáticas que formam colónias que expressam β -galactosidase (β -gal) sem lhes aplicar a selecção, apesar de aparentemente terem sido incapazes de se reproduzir na maior parte das células. Formulou-se a hipótese de as variantes não citopáticas serem devidas a mutações adaptativas secundárias. Para isolar estas variantes, o gene puromicina N-acetiltransferase (pac) (gene de selecção) foi introduzido no mutante SFV-P718T e foram seleccionados os clones de células BHK que foram resistentes à puromicina. Uma réplica não citopática que contém uma segunda mutação no sinal de localização nuclear nsp2, especificamente a mutação R649H, foi resgatada de um dos clones seleccionados. Este mutante duplo, identificado como SFV-S2-9 no presente relatório descritivo, que contém as mutações R649H e P718T em nsp2, reproduziu-se em níveis que foram sessenta vezes menores que os do vector SFV do tipo selvagem, que foi correlacionado à ausência de citopatogenicidade em células transfectadas com o vector SFV que contém a mutação dupla R649H/P718T em nsp2. Observou-se um nível de expressão de β -gal similar em células transfectadas com SFV-S2-9-LacZ e SFV-LacZ 24 horas após a transfecção, que estava na faixa de cerca de 15 pg/célula (Figura 6).

De modo bastante surpreendente, vectores virais não citopáticos baseados no mencionado mutante SFV duplo (SFV-S2-9) que contêm a mutação dupla R649H/P718T em nsp2 foram capazes de gerar linhagens celulares estáveis que podem expressar β -gal pelo menos por dez passagens em cultura (o percentual de células que expressam β -gal, determinado em cada passagem por meio de manchas de X-gal, variou de 70% a 90% de acordo com a passagem, mas foi de mais de 85% na passagem 10, o que indicou uma grande estabilidade da expressão de transgene na presença de selecção, como se pode observar na Figura 7), que é ainda a expressão constitutiva porque aumentou ao longo do tempo em células transfectadas com SFV-S2-9-LacZ, atingindo estabilização em cerca de 30 pg de β -gal/célula 48 horas após a transfecção. Por outras palavras, por meio de transfecção com o vector SFV mutante duplo não citopático (R649H/P718T), atingiu-se quantitativamente uma expressão que foi duas vezes a atingida 24 horas após a transfecção quando as células foram transfectadas com o vector SFV do tipo selvagem.

O mencionado vector SFV mutante duplo não citopático (R649H/P718T) também foi capaz de gerar linhagens de células estáveis que podem expressar constitutivamente proteínas heterólogas de interesse, tais como cardiotrofina-1 de rato (rCT) e o factor de crescimento similar a insulina humano (IGF-I), em níveis semelhantes aos obtidos ao utilizar-se o vector SFV do tipo selvagem.

De facto, o mencionado vector SFV mutante duplo (R649H/P718T) foi capaz de gerar linhagens celulares estáveis que podem expressar constitutivamente rCT em níveis semelhantes aos obtidos com o vector SFV do tipo selvagem, que foram de cerca de 4,3 pg/célula (Exemplo 9).

Embora fosse observada uma alta estabilidade do vector nas linhagens celulares analisadas, nas linhagens que expressam rCT e pac de dois promotores subgenômicos independentes, observou-se uma estabilidade mais baixa que com o gene LacZ, em que a expressão de rCT começa a diminuir a partir da passagem 6 até virtualmente desaparecer na passagem 11 (Figura 16). No entanto, a fusão dos genes rCT e pac utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease 2A de vírus de doença da boca e dos pés (FMDV) como um ligante permitiu, a geração de linhagens de células estáveis nas quais a estabilidade da expressão de rCT permaneceu sem variações por pelo menos dez passagens (Figura 17).

Do mesmo modo, o mencionado vector SFV mutante duplo (R649H/P718T) também foi capaz de gerar linhagens de células estáveis que podem expressar IGF-I em níveis que podem ser comparados com os obtidos com o vector de SFV do tipo selvagem (Figura 19), que foram de cerca de 50 pg/célula (Exemplo 10). As linhagens que expressam IGF-I e pac de dois promotores subgenômicos independentes exibiram níveis de expressão de IGF-I que foram um pouco mais baixos que o vector SFV do tipo selvagem (cerca de duas vezes menos na passagem 1) e exibiram ainda uma estabilidade mais baixa do que com o gene LacZ, em que a expressão começa a diminuir a partir da passagem 5 e diminui cerca de oitenta vezes entre as passagens 1 e 10 (Figura 20). A fusão dos genes pac e IGF-I utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease de FMDV 2A como um ligante permitiu a geração de linhagens estáveis nas quais a expressão de IGF-I na passagem 1 era mais próxima do vector SFV do tipo selvagem e em que a estabilidade da expressão de IGF-I foi mantida com pequenas variações até a passagem

10 (na passagem 10, foi apenas quatro vezes menor que a observada na passagem 1) (Figura 20).

Além disso, como se pode verificar no Exemplo 8, a presente invenção rompe um preconceito estabelecido no estado da técnica por demonstrar que vectores SFV que sofreram mutação presentes no estado da técnica e definidos como não citopáticos mantêm as características de citopatogenicidade.

Tal como expresso na presente invenção, a expressão "linhagem de células estáveis" refere-se a linhagens celulares nas quais o percentual de células que expressam um produto heterólogo (tal como um peptídeo ou uma proteína heteróloga etc.) na passagem 10 é de mais de 85%, em que o mencionado percentual é capaz de ser mantido ou excedido em passagens sucessivas ou subsequentes.

A expressão "expressão constitutiva", da forma utilizada no presente, designa a capacidade adicional que, surpreendentemente, as linhagens de células estáveis mencionadas acima possuem para expressar o produto heterólogo num nível quantitativamente alto (mais de 50% com relação ao atingido 24 horas após a tradução, quando as células são traduzidas com o vector do tipo selvagem).

Do mesmo modo, como é sabido no estado da técnica, uma "réplica de RNA" é uma sequência de nucleotídeos que utiliza unitariamente um RNA complementar como um intermediário que útil como um molde de produção de mais moléculas do RNA original. Com este propósito, geralmente são necessárias sequências específicas nas extremidades de RNA. A réplica contida nos vectores virais fornecida pela

presente invenção compreende a extremidade 5' necessária para reprodução de SFV, em que a sequência codifica a enzima SFV replicase com mutações P718T e R649H na região nsp2, pelo menos um promotor subgenômico de SFV viral, um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção, um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse e a extremidade 3' necessária para reprodução de SFV que contém uma sequência terminal de poliadeninas (Póli A). Numa forma de realização específica, o mencionado polinucleotídeo que compreende o gene de selecção, bem como o mencionado polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse, são colocados a jusante de dois promotores subgenômicos independentes e ligados operacionalmente aos mencionados promotores (ou seja, um dos mencionados polinucleotídeos é colocado a jusante de um promotor subgenômico e a ele ligado operacionalmente e o outro polinucleotídeo é colocado a jusante do outro promotor subgenômico e a ele ligado operacionalmente). Numa outra forma de realização específica, o mencionado polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o mencionado polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse são fundidos entre si, convenientemente por meio de um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão proteolítica pós-tradução, convenientemente um local de divisão autoproteolítica pós-tradução, e são colocados a jusante de um único promotor subgenômico e a ele ligados operacionalmente.

Num aspecto, portanto, a presente invenção refere-se a

um vector viral (vector viral de acordo com a presente invenção) que compreende uma réplica do vírus da floresta de Semliki (SFV), em que a mencionada réplica compreende (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima replicase de SFV com mutações P718T e R649H na subunidade nsp2, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse.

Num outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de um vector viral de acordo com a presente invenção para a geração de linhagens celulares estáveis *in vitro* que podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a uma linhagem celular estável que pode expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse, caracterizada pelo facto de que é uma linhagem celular transfectada com um vector viral de acordo com a presente invenção.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de geração *in vitro* da mencionada linhagem de células estáveis podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse.

Num outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso da mencionada linhagem de células estáveis para a geração *in vitro* de produtos heterólogos de interesse.

Num outro aspecto, a presente invenção refere-se a um

método de produção *in vitro* de um produto heterólogo de interesse que compreende a cultura da mencionada linhagem de células estáveis em condições que permitam a expressão do produto heterólogo de interesse contido no vector viral utilizado para gerar a mencionada linhagem de células estáveis.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Avaliação da citopatogenicidade dos reactores SFV que conduzem mutações derivadas de SIN. Os plasmídeos pSFV-LacZ que contêm as mutações P718T (pSFV-S2-LacZ) e P718F (pSFV-S3-LacZ) em nsp2 foram construídos conforme descrito nos exemplos. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de cada um desses plasmídeos, bem como do pSFV3-LacZ original, e sofreu electroporação em células BHK que foram semeadas em placas com um diâmetro de 35 mm sob baixa confluência e manchadas com X-gal após a cultura pelos tempos indicados. No caso de SFV-S2-LacZ ou SFV-S3-LacZ, foi fornecida uma passagem 1:5 para as células transfectadas com os mencionados vectores após 96 horas em cultura. Uma representação esquemática do RNA de cada vector é exibida acima de cada conjunto de imagens. Cap: círculo na extremidade esquerda dos vectores; nsp: proteínas não estruturais; seta horizontal: promotor subgenômico de SFV; An: póli A.

Figura 2. Células de BHK resistentes a puromicina seleccionadas após a electroporação com diferentes RNAs. As células BHK foram electroporadas com os vectores de RNA SFV indicados ou sem RNA (nenhum RNA), semeadas em placas com um diâmetro de 35 mm e mantidas

em recuperação por 24 horas antes da adição de puromicina a 5 µg/ml. As placas foram manchadas com violeta de metila nos momentos indicados após a transfecção.

Figura 3. Localização intracelular de nsp2 em células transfectadas com RNA de SFV. As células BHK foram electroporadas com os vectores de RNA SFV ou vectores sem RNA (nenhum RNA) e foram analisadas por meio de imunofluorescência 24 horas após a transfecção. Anticorpos monoclonais de ratos que foram específicos para as formas nucleares (α nsp-n) ou citoplasmáticas (α nsp2-c) de nsp2 foram utilizados como anticorpos primários e um soro de coelho policlonal específico para IgGs de ratos conjugados a FITC foi utilizado como um anticorpo secundário. Núcleos manchados com Dapi das mesmas células foram observados com um filtro de UV (Dapi).

Figura 4. Análise do RNA SFV nas células BHK transfectadas. O RNA total foi extraído de uma linhagem de células BHK estáveis obtida após a electroporação da réplica SFV-S2-9-pac e a selecção com puromicina (linha 1) ou de células BHK electroporadas com SFV-S2-9-pac (linhas 2 a 4), SFV-pac (linha 5), SFV-LacZ (linha 6) ou co-electroporadas com réplicas SFV-S2-9-pac e SFV-pac (linha 7) e foi analisado em 24 horas (linhas 2, 5 a 7), 48 horas (linha 3) ou 72 horas (linha 4) após a electroporação. A presença dos RNAs SFV (g) genômicos e (sg) subgenômicos foi analisada por meio de Northern Blot com um oligonucleotídeo marcado com ^{32}P específico para o promotor subgenômico SFV. Os números na parte

inferior dos géis indicam as razões de RNA subgenômico/genômico (sg/g) em cada caso. Na linha 7, referem-se à razão sg/g de SFV-S2-9-pac (pac) ou de SFV-LacZ (LacZ), respectivamente. A parte esquerda do gel foi exposta por 72 horas, enquanto a parte direita foi exposta por uma hora.

Figura 5. Expressão *in vitro* e *in vivo* de proteínas não estruturais. a. O RNA SFV-pac original (tipo selvagem) ou o RNA SFV-pac que contém as mutações indicadas foram traduzidos em lisatos de reticulócitos de coelhos na presença de [³⁵S]-metionina e [³⁵S]-cisteína e foram analisados por meio de SDS-PAGE em géis a 8% e posteriormente autorradiografados. Dois géis que contêm as mesmas amostras foram conduzidos por tempos diferentes para obter uma melhor separação das faixas com alto peso molecular (gel superior, migração mais longa) e detectar os monómeros nsp1 e 3 com um peso molecular menor (gel inferior, migração mais curta). b. Análise da expressão de replicase nas células transfectadas. Os lisatos das células BHK controle, de linhagem de células BHK estáveis obtidas após a electroporação com réplica SFV-S2-9-pac e selecção com puromicina (S2-9) ou de células que sofreram electroporação com o RNA SFV-pac original (tipo selvagem) ou de SFV-RHR-pac (RHR) mutante foram analisados por meio de imuno-manchas utilizando um antissoro de coelho policlonal específico contra nsp2 (gel superior) ou contra nsp3 (gel central). As mesmas amostras com um anticorpo específico contra β -actina foram analisadas como um controle interno.

Figura 6. Análise da expressão de β -gal. Células BHK

foram electroporadas com os RNAs indicados e o nível de expressão de β -gal por célula foi determinado nos momentos indicados após electroporação. O eixo x exhibe o tempo após a transfecção em horas e o eixo y exhibe os picogramas de β -gal por célula.

Figura 7. Estabilidade da expressão de β -gal nas células transfectadas com vector SFV-S2-9-LacZ-pac. As células BHK sofreram electroporação com SFV-S2-9-LacZ-pac RNA e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 μ g/ml. As células seleccionadas passaram a cada dois ou três dias com ou sem puromicina e o percentual de células que expressam β -gal em cada passagem foi determinado por meio de manchas de X-gal. Os dados correspondem à média de três experiências diferentes, sendo exibido o desvio padrão. A figura exhibe um campo típico de células BHK que contém o vector SFV-S2-9-LacZ-pac que passou por dez vezes na presença de puromicina e foi manchado com X-gal. O eixo X exhibe o número de passagens e o eixo y exhibe o percentual de células manchadas de azul.

Figura 8. Representação esquemática de duas realizações, na forma de RNA, do vector viral para geração de linhagens de células estáveis e produção de proteínas estáveis. A réplica de SFV é ladeada pelas sequências 5' e 3' necessárias para reprodução de SFV, em que a sequência 3' incorpora uma sequência terminal de poliadeninas (Póli A). A replicase com subunidades nsp1 a nsp4 e o promotor subgenômico SFV sobreposto com nsp4 (SG1) são incluídos no interior da réplica. As mutações R649H e P718T típicas do vector replicase são exibidas sobre nsp2. A réplica também incorpora um

gene de selecção (PAC) e um gene de interesse (GOI) que codifica a proteína recombinante que deve ser produzida constitutivamente. Nos Exemplos A e C, a réplica também incorpora um segundo promotor subgenômico (SG2), de tal forma que a expressão de PAC e GOI seja controlada por um promotor de SG diferente, SG1 ou SG2 sem distinção conforme a construção A ou C seleccionada. No Exemplo B, a expressão de PAC e GOI é controlada pelo mesmo promotor de SG1, produzindo uma proteína híbrida que é dividida por proteases num local específico intercalado entre PAC e GOI. cap: estrutura de cap.

Figura 9. Avaliação do efeito citopático de SFV-LacZ. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-LacZ (vector de tipo selvagem) e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia).

Figura 10. Avaliação do efeito citopático de SFV-SF2A-LacZ. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-SF2A-LacZ e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia). As células passaram 1:5 quatro dias após a transfecção.

Figura 11. Avaliação do efeito citopático de SFV-SF2C-LacZ. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-SF2C-LacZ e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas

de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia). As células passaram 1:5 quatro dias após a transfecção.

Figura 12. Avaliação do efeito citopático de SFV-PD-LacZ. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-PD-LacZ e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia).

Figura 13. Avaliação do efeito citopático de SFV-S2-LacZ. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-S2-LacZ e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia). As células passaram 1:5 quatro dias após a transfecção. Este mutante S2 foi capaz de gerar a formação de colónias de células que expressam β -gal.

Figura 14. Avaliação do efeito citopático do vector SFV-S2-9-LacZ que conduz as mutações P718T e R649H. RNA foi transcrito *in vitro* a partir de plasmídeo pSFV-S2-9-LacZ, pSFV-S2-LacZ ou pSFV-LacZ e foi electroporado em células BHK. As células foram distribuídas em placas de 35 mm sob baixa confluência e foram fixadas e manchadas com X-gal nos tempos indicados (d, dia).

Figura 15. Análise da expressão de cardiotrofina-1 de ratos (rCT). a. Diagrama dos dois vectores de SFV não citopáticos que conduzem o gene PAC e o gene rCT. sg

Pr, promotor subgenômico; 2A, sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease 2A do vírus de doença da mão e dos pés (FMDV). b. Análise da expressão de rCT. Células BHK sofreram electroporação com RNA de SFV-S2-9-rCT-pac (rCT-pac), SFV-S2-9-pac2A-rCT (pac-2A-rCT) ou SFV-S2-9-pac (S2-9-pac) como um controle negativo e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 µg/ml. As células seleccionadas foram lisadas e a expressão de rCT foi analisada por meio de imuno-manchas utilizando um anticorpo específico para cardiotrofina (gel superior). Como uma quantidade de controlo, as mesmas amostras foram analisadas com um anticorpo contra actina (gel inferior). wtCT, lisato de células BHK transfectadas com SFV-rCT obtido 24 horas após a transfecção e utilizado como controle positivo. M, marcadores de peso molecular (kDa).

Figura 16. Análise da estabilidade da expressão de rCT em células BHK do vector SFV-S2-9-rCT-pac. As células BHK sofreram electroporação com RNA SFV-S2-9-rCT-pac e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 µg/ml. As células seleccionadas passaram 1:5 a cada dois a três dias até onze passagens consecutivas (p1 a p11), em que a expressão de rCT em lisatos celulares é analisada em cada passagem por meio de imuno-manchas com um anticorpo específico para cardiotrofina (gel superior) e com um anticorpo específico contra actina como um controle de carga (gel inferior). Diversas quantidades de rCT recombinante purificado (recCT) foram utilizadas como um controle de quantidade. É exibido uma experiência representativa de duas experiências conduzidos que geraram um resultado de expressão e estabilidade similar. S2-9-pac, controle

negativo de células electroporadas com vector SFV-S2-9-pac. M, marcadores de peso molecular (kDa).

Figura 17. Análise da estabilidade da expressão de rCT em células BHK do vector SFV-S2-9-pac2A-rCT. As células BHK sofreram electroporação com SFV-S2-9-pac2A-rCT RNA e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 µg/ml. As células seleccionadas passaram 1:5 a cada dois a três dias até dez passagens consecutivas (p1 a p10), em que a expressão de rCT em lisatos celulares é analisada em cada passagem por meio de imuno-manchas com um anticorpo específico para cardiotrofina (gel superior) e com um anticorpo específico contra actina como um controle de carga (gel inferior). Diversas quantidades de rCT recombinante purificado (recCT) foram utilizadas como um controle de quantidade. É exibida uma experiência representativa de quatro experiências conduzidas que geraram um resultado de expressão e estabilidade semelhante. S2-9-pac, controle negativo de células electroporadas com vector SFV-S2-9-pac. M, marcadores de peso molecular (kDa).

Figura 18. Diagrama dos vectores SFV não citopáticos que carregam o gene pac e o gene IGF-I. O vector SFV-S2-9-IGF-pac que carrega o gene PAC e o gene IGF-I sob o controle de promotores subgenômicos (sg Pr) virais independentes, em que o gene IGF-I foi fundido com o aprimorador de tradução de capsídeo SFV (b1) utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease de FMDV 2A (2A) como um ligante. O vector SFV-S2-9-pac2A-IGF conduz o gene PAC fundido com o gene IGF-I utilizando a sequência 2A como um ligante.

Figura 19. Análise da expressão de IGF-I. As células BHK sofreram electroporação com RNA de SFV-S2-9-IGF-pac, SFV-S2-9-pac2A-IGF ou SFV-S2-9-pac (controle negativo) e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 µg/ml. As células seleccionadas passaram uma vez (passagem 1), em que o sobrenadante é recolhido em 24, 48 ou 72 horas após o seu plantio. A expressão de IGF-I foi analisada em cada um dos sobrenadantes por meio de um ELISA específico para IGF-I humano. SFV-IGF-I, sobrenadante de células BHK transfectadas com RNA do vector SFV-IGF-I do tipo selvagem obtido 24 horas após a transfecção e utilizado como controle positivo.

Figura 20. Análise da estabilidade da expressão de IGF-I em células BHK de diferentes vectores. As células BHK sofreram electroporação com RNA de SFV-S2-9-IGF-pac ou SFV-S2-9-pac2A-IGF e foram seleccionadas na presença de puromicina a 5 µg/ml. As células seleccionadas passaram uma vez a cada dois ou três dias até dez passagens consecutivas, em que o sobrenadante é recolhido em cada passagem 24 horas após o seu plantio. A expressão de IGF-I foi analisada nos sobrenadantes de cada uma das passagens por meio de um ELISA específico para IGF-I humano. SFV-IGF-I, sobrenadante de células BHK transfectadas com RNA do vector SFV-IGF-I obtido 24 horas após a transfecção e utilizado como controle positivo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Explicação da Invenção

Os vectores alfavírus possuem diversas vantagens, tais como altos níveis de expressão transgénica, amplo tropismo e fácil manipulação. A citopatogenicidade causada por esses vectores na maior parte das células de vertebrados pode ser vantajosa em algumas aplicações, tais como vacinação e terapia genética de cancro, em que a apoptose de células que sofreram transdução pode gerar a liberação de antígenos que podem ser absorvidos por células imunes, o que favoreceria uma reacção imune contra o antígeno recombinante expresso ou contra antígenos de tumores, respectivamente (19). O uso desses vectores em aplicações nas quais é necessária uma expressão transgénica de longa duração é obstruído pela sua natureza citopática.

A possibilidade de adaptação de vectores de alfavírus para expressão a longo prazo foi pesquisada por diferentes laboratórios, o que gerou o isolamento de variantes não citopáticas de SIN, SFV, VEE e EEE (7, 20-23). Na maior parte dos casos, as mutações não citopáticas foram isoladas utilizando vectores que conduzem um gene heterólogo que codifica uma proteína que confere resistência a um antibiótico, tal como puromicina ou G418. Quando as células transfectadas com este tipo de vector foram incubadas na presença do antibiótico, somente foram seleccionadas as que contêm réplicas mutantes não citopáticas que expressam o gene de resistência.

Embora a maior parte dos mutantes alfavírus que foram descritos carregue mutações em nsp2, estas mutações alteram

diferentes resíduos de proteína em diferentes vírus, apesar da existência de um alto grau de homologia de sequências entre os diferentes alfavírus. Tomando esta sequência de homologia como base, o efeito de uma mutação de SIN bem caracterizada, que afectou o resíduo 726 de nsp2 em SIN, foi pesquisado no contexto de SFV. As mutações P726L e P726T foram descritas como não citopáticas por Frolov et al (7) e Perri et al (22), respectivamente. No primeiro estudo, o resíduo 726 também sofreu mutação em todos os outros aminoácidos possíveis, o que gerou uma série de mutantes de SIN com diferentes graus de citopatogenicidade. Frolov et al puderam estabelecer uma correlação entre o nível de reprodução de RNA e a citopatogenicidade, concluindo que alterações no resíduo 726 de nsp2 que reduzissem os níveis de RNA para menos de 5% dos níveis observados no vector do tipo selvagem produziriam um fenótipo não citopático (7).

Foram seleccionadas duas alterações diferentes, P726T e P726F, que foram capazes de reduzir os níveis de RNA em SIN para 5,1% e para 1,6% dos níveis selvagens, respectivamente, e as mutações correspondentes foram introduzidas na posição 718 de SFV nsp2, sendo gerados os mutantes identificados pelos inventores como S2 e S3, respectivamente. Nenhuma destas alterações foi capaz de produzir um fenótipo não citopático em SFV por si própria. Os estudos conduzidos por meio de transfecção de células BHK com os mutantes de SFV (S2 e S3) nos quais o gene relator de LacZ havia sido incorporado demonstraram que somente um pequeno percentual das células transfectadas pôde manter a reprodução do vector. O mutante S2 (P718T) pareceu mais estável que S3 (P718F) e gerou grandes colónias de células que expressam β -gal na ausência de

selecção. Intuiu-se, portanto, que essas colónias continham réplicas com mutações adaptativas adicionais. Para seleccionar estas colónias e identificar as possíveis mutações secundárias presentes nas réplicas, o gene N-acetiltransferase (pac) foi clonado no mutante SFV S2 e as colónias das células cultivadas na presença de puromicina foram isoladas. Num dos clones analisados, foi encontrada uma segunda mutação na posição 649 de nsp2 (R649H) que, em combinação com a mutação P718T, foi capaz de fornecer um fenótipo não citopático para o vector SFV com base naquele mutante SFV duplo (P718T/R649H). Esse mutante SFV duplo (P718T/R649H) foi denominado mutante S2-9 pelos inventores e aparece indistintamente no presente relatório descritivo como mutante SFV-S2-9 ou simplesmente S2-9.

A mutação R649H afecta o sinal de localização nuclear SFV ⁶⁴⁸RRR que foi descrito como sendo responsável pelo transporte parcial de nsp2 para o núcleo celular (27). A alteração de Arg por Hys na posição 649 constitui uma alteração muito conservadora, o que poderá explicar o facto de que nenhum efeito evidente é observado sobre o transporte de nsp2 para o núcleo, nem no mutante duplo S2-9 (P718T/R649H), nem no mutante simples R649H. Este último mutante (R469H) não exibiu nenhuma redução da citopatogenicidade em comparação com o vector SFV do tipo selvagem, o que indicou que as duas mutações nas posições 649 e 718 eram necessárias para eliminar o efeito citopático. Fazakerley et al descreveram uma alteração mais drástica na posição 649 (R649D), o que gerou a atenuação da neurovirulência de SFV no contexto de um genoma viral completo (6). Neste caso, a mutação R649D interrompeu completamente o transporte de nsp2 para o núcleo, embora não suprimisse o efeito citopático do vírus sobre células

BHK. Todos estes dados sugeriram que a sequência ⁶⁴⁸RRR de nsp2 poderia estar envolvida na citopatogenicidade do SFV.

O mutante S2-9, que contém a mutação dupla P718T/R649H, pôde reproduzir-se em níveis que eram cerca de sessenta vezes mais baixos que os observados para o vector SFV do tipo selvagem, o que poderia explicar a ausência de citopatogenicidade do mencionado mutante S2-9. O nível de RNA subgenômico no mutante S2-9 foi apenas trinta vezes mais baixo que o do vector SFV do tipo selvagem, o que indicou que a razão entre RNA subgenômico e genômico havia aumentado em cerca de duas vezes em mutante não citopático S2-9. Esta razão era ainda maior pouco tempo após a transfecção, o que sugere que a síntese de RNA genômico no vector não citopático poderia atrasar com relação à de RNA subgenômico. A redução da quantidade de RNA e o aumento da razão entre RNA subgenômico e genômico observada para o mutante S2-9 foram muito similares às descritas nos vectores SIN que contêm mutações não citopáticas na posição 726 de nsp2 (7, 22). Estes resultados contradisseram, entretanto, os descritos por Perry et al para mutantes de SFV não citopáticos, em que a quantidade de RNAs mutantes foi maior que a do vírus do tipo selvagem e em que as razões entre RNA subgenômico e genômico também caíram (22), o que sugere que diferentes mecanismos puderam ser envolvidos no estabelecimento de uma reprodução de longa duração nos mutantes de SFV isolados por esse grupo. O nível mais baixo de reprodução de RNA no mutante S2-9 não sse deveu a um efeito em cis das mutações presentes na sequência de RNA, pois uma replicase do tipo selvagem fornecida em trans pelo vector SFV do tipo selvagem permitiu a recuperação dos níveis de RNA genômico e subgenômico do mutante S2-9 para valores próximos do vector

SFV do tipo selvagem. Diversos estudos conduzidos com os mutantes alfavírus demonstraram que mutações não citopáticas em nsp2 podem alterar a actividade proteolítica dessa proteína, que gera um hiperprocessamento de replicase (7) ou um processamento mais lento dessa poliproteína (22). Na presente invenção, não foram observadas diferenças claras do processamento de replicase entre o mutante S2-9 e o vector SFV do tipo selvagem, nem por meio de tradução *in vitro*, nem por meio de análise de imuno-manchas.

Apesar dos baixos níveis de reprodução do mutante S2-9, a quantidade de β -galactosidase (β -gal) produzida pelo vector SFV-S2-9-LaZ (um vector viral com base no mutante SFV S2-9) 24 horas após a transfecção foi muito similar à obtida com um vector SFV do tipo selvagem que expressa o mesmo transgene. O nível de expressão de vector S2-9 aumentou cerca de duas vezes em momentos posteriores após a transfecção, o que é correlacionado ao aumento observado nos níveis de RNA. O nível de expressão de proteína recombinante noutros vectores não citopáticos descritos demonstrou grande variabilidade, variando de apenas 4% da expressão de tipo selvagem no caso do mutante SIN P726L (1) até 1000% no caso de SFV-PD mutante duplo desenvolvido por Lundström et al (21). A natureza não citopática deste vector foi colocada em dúvida, entretanto, quando os mesmos autores demonstraram que a expressão de GFP ou β -gal em células BHK infectadas com um vector SFV-PD que conduz LacZ ou GFP como um gene marcador atinge o máximo após 48 horas para cair drasticamente nos três a quatro dias seguintes (20). Com relação a isso, vale a pena adicionar que o Exemplo 8 do presente relatório descritivo rompe um preconceito no estado da técnica, por demonstrar que o vector SFV-PD desenvolvido por Lundström et al (21) é

citopático. Alguns mutantes adicionais descritos por este grupo que contêm mutações sensíveis ao calor também puderam expressar altos níveis de proteína recombinante, mas somente sob temperatura permissiva (20, 21). A razão pela qual o mutante S2-9 poderá expressar quantidades maiores da proteína recombinante que o vector SFV do tipo selvagem que contêm níveis de RNA muito mais baixos poderá estar relacionada com a forte inibição da síntese de proteínas induzida por este último vector. Duas publicações recentes indicam que a fosforilação de EIF2alfa é o mecanismo por meio do qual os alfavírus induzem uma inibição de tradução na célula hospedeira posteriormente durante a infecção (15, 31). Ao mesmo tempo, esses autores demonstram que o elemento aprimorador da tradução presente na extremidade 5' do gene capsídeo permite uma tradução eficiente da poliproteína estrutural viral na presença de eIF2alfa fosforilado. Demonstrou-se que, quando o aprimorador da tradução de capsídeo for fundido em fase com a extremidade amino de uma proteína recombinante no vector SFV ou SIN, ela aumenta o nível de expressão de proteína recombinante em oito vezes (10, 28). Este efeito não foi observado no contexto do vector viral derivado do mutante SFV S2-9, provavelmente porque a tradução por meio de fosforilação de eIF2alfa não estava sendo inibida nas células transfectadas com aquele vector. A ausência de inibição da síntese de proteínas nas células transfectadas com o vector viral derivado de mutante SFV S2-9 poderia ser responsável pela geração de altos níveis de expressão com níveis de RNA mais baixos que os atingidos com o vector SFV do tipo selvagem.

A eficácia de embalagem do vector viral derivado do mutante SFV S2-9 foi cerca de seis unidades logarítmicas mais baixa que a do vector SFV do tipo selvagem que carrega

o mesmo transgene. Isso poderá dever-se aos baixos níveis de reprodução de RNA ou a uma deficiência na embalagem do mutante SFV duplo (S2-9). As experiências de embalagem nos quais o RNA do mencionado vector viral derivado do mutante SFV duplo S2-9 reproduziu-se em níveis quase normais por meio de co-transfecção de células com um vector SFV do tipo selvagem foram capazes apenas de aumentar em quinze vezes o título das partículas virais S2-9, o que indicou que os baixos níveis de RNA foram apenas parcialmente responsáveis pela baixa eficiência de embalagem desse vector. O vector SFV que contém a mutação R649H foi apenas embalado em níveis similares aos do vector SFV do tipo selvagem, enquanto o vector SFV que contém a mutação P718T (SFV-S2) foi embalado apenas de forma deficiente. Embora o facto de que o vector SFV-S2 não foi capaz de reproduzir-se na maior parte das células transfectadas pudesse ser o factor responsável por essa baixa eficiência de embalagem, tudo indica que esta mutação isoladamente ou em combinação com a mutação R649H afecta a encapsidação de RNA SFV em partículas virais. Os sinais de embalagem de SFV foram mapeados numa região de genoma que compreende os nucleotídeos 2767 a 2824 (32) e que não sobrepõe nenhuma das mutações presentes no mutante S2-9, localizado nas posições 3643 (R649H) e 3849-51 (P718T). Não se pode descartar, entretanto, que essas mutações podem afectar a estrutura secundária de RNA genómico, alterando a capacidade de acesso dos sinais de embalagem. São necessários mais estudos de mutagénese para determinar a função precisa das sequências em embalagem de SFV.

Também se demonstrou que vectores virais derivados de S2-9 mutante podem ser utilizados eficientemente para gerar linhagens celulares estáveis de células BHK que expressam

constitutivamente proteínas recombinantes, sem a necessidade de isolamento de clones. Com este propósito, além das mutações P718T e R649H, o vector deve conter o transgene desejado e um gene de selecção (tal como um gene que codifica uma proteína que confere resistência a um antibiótico etc.) útil para a selecção de células que tenham sofrido transdução eficiente. Utilizando LacZ como o transgene relator e o gene pac como um gene de selecção, foi gerada uma linhagem celular que exibiu estabilidade muito alta, cerca de 85% das células que expressam β -gal após dez passagens na cultura e com níveis de expressão que foram muito similares aos do vector SFV do tipo selvagem. Isso ocorre em contraste com as observações numa linhagem celular similar gerada com um vector SIN não citopático que conduz a mutação P726L em nsp2 e o gene LacZ como um gene relator que expressa β -gal em níveis que são cerca de 25 vezes mais baixos que o vector SIN selvagem (1). Neste último caso, a expressão de LacZ foi perdida em 45% das células após cinco passagens, embora pudesse ser atingida uma estabilidade superior com este sistema caso a linhagem celular fosse derivada de uma população clonada de células que expressam β -gal.

O vector viral derivado de S2-9 mutante pôde gerar linhagens de células estáveis que expressam constitutivamente cardiotrofina-1 de rato (rCT). Neste caso, a expressão de rCT e pac de um vector que contém dois promotores subgenômicos (SFV-S2-9-rCT-pac) levou à geração de linhagens celulares nas quais a expressão permaneceu estável pelas cinco primeiras passagens, sendo gradualmente perdida a partir da passagem 5 (Figura 16). O vector SFV-S2-9-pac2A-rCT no qual o gene pac e o gene codificador de rCT são fundidos em fase utilizando a sequência de

nucleotídeos que codifica autoprotease de FMDV 2A como um ligante levou, entretanto, à geração de uma linhagem de células muito estáveis que mantiveram uma alta expressão de rCT similar à obtida com um vector SFV do tipo selvagem por pelo menos dez passagens em cultura (Figura 17).

Do mesmo modo, o vector viral derivado do mutante S2-9 também pôde gerar linhagens de células estáveis que expressam factor de crescimento similar a insulina I (IGF-I). Neste caso, a expressão de IGF-I e pac de um vector que contém dois promotores subgenômicos (SFV-S2-9-IGF-pac) levou à geração de linhagens celulares nas quais a expressão permaneceu estável pelas primeiras quatro ou cinco passagens, sendo gradualmente perdida a partir da passagem 5 em diante e reduzida em oitenta vezes até atingir a passagem 10 (Figura 20). O vector SFV-S2-9-pac2A-IGF no qual o gene pac e o gene codificador de IGF-I são fundidos em fase utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease de FMDV 2A como um ligante, levou, entretanto, à geração de uma linhagem de células com estabilidade mais alta que mantiveram uma alta expressão de IGF-I similar à obtida com um vector SFV do tipo selvagem com uma redução de apenas cerca de quatro vezes em dez passagens em cultura (Figura 20). Este último vector (SFV-S2-9-pac2A-IGF) exibiu ainda níveis de expressão de IGF-I em passagens anteriores que foram cerca de duas vezes maiores que os observados com o vector SFV-S2-9-IGF-pac.

Portanto, o vector SFV-S2-9-pac pode ser utilizado, para gerar rapidamente linhagens de células de mamíferos estáveis que podem gerar produtos heterólogos de interesse, tais como proteínas recombinantes, em grandes quantidades.

Vector viral de acordo com a presente invenção

Num aspecto, portanto, a presente invenção refere-se a um vector viral com base no vírus da floresta de Semliki (SFV), denominado a seguir vector viral de acordo com a presente invenção, que compreende uma réplica do vírus da floresta de Semliki (SFV), em que a mencionada réplica compreende (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima replicase de SFV com mutações P718T e R649H na subunidade nsp2, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse.

O vector viral de acordo com a presente invenção contém uma réplica de SFV que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica a replicase de SFV que compreende as mutações P718T e R649H na subunidade nsp2. Cada uma dessas mutações afecta um trio de nucleotídeos e cada uma delas está localizada na sequência codificadora da subunidade ou proteína não estrutural nsp2 da replicase viral. A mutação P718T indica que a prolina (P), localizada na posição 718 da sequência de aminoácidos da proteína nsp2 codificada pelo SFV do tipo selvagem, é substituída por uma treonina (T) na proteína nsp2 codificada pelo vector que sofreu mutação (vector viral de acordo com a presente invenção). Da mesma forma, a mutação R649H indica que arginina (R), localizada na posição 649 da sequência de aminoácidos da subunidade nsp2 codificada pelo SFV do tipo selvagem, é substituída por uma histidina (H) na subunidade nsp2 codificada pelo vector que sofreu mutação (vector viral de acordo com a presente invenção). As duas posições 718 e 649 referem-se à posição do aminoácido substituído na

sequência já dividida e processada da subunidade nsp2.

Numa realização específica da presente invenção, a réplica de SFV presente no vector viral de acordo com a presente invenção compreende SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2:

- SEQ ID N° 1 inclui a extremidade 5' necessária para a reprodução de SFV, em que a sequência codifica a replicase de SFV com mutações P718T e R649H em nsp2 e, sobrepondo-se à replicase, um promotor subgenômico de SFV viral; e
- SEQ ID N° 2 inclui a extremidade 3' necessária para reprodução de SFV que contém uma sequência terminal de poliadeninas (Póli A).

Estas duas sequências juntas formam o esqueleto do vector e o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse são intercalados entre elas.

A expressão do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e a expressão do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse pode ser controlada por dois promotores subgenômicos de SFV independentes ou por um único promotor subgenômico que controle a expressão do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e a expressão do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse na forma de uma proteína de fusão.

Portanto, numa realização específica, o vector viral

de acordo com a presente invenção compreende:

a. um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse, cuja expressão é controlada por um primeiro promotor subgenômico de SFV (SG1); e

b. um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção, cuja expressão é controlada por um segundo promotor subgenômico de SFV (SG2).

Os mencionados primeiro e segundo promotores subgenômicos de SFV podem ser idênticos ou diferentes. Numa forma de realização específica, a expressão do gene de selecção e a expressão do produto heterólogo de interesse são controladas por dois promotores subgenômicos de SFV independentes idênticos ou diferentes.

Tal como exibido na Figura 8, o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse e o polinucleotídeo que compreende um gene de selecção estão localizados no interior da réplica de SFV, entre o promotor subgenômico sobreposto na replicase e a extremidade 3' necessária para reprodução de SFV.

Numa forma de realização específica, o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse (GOI, gene de interesse) está localizado a jusante do promotor subgenômico (SG1) sobreposto na replicase e a sua expressão é controlada pelo mencionado SG1. Um outro promotor subgenômico SG2 que controla a expressão do polinucleotídeo que compreende o

gene de selecção, que está localizado a jusante de SG2 é incorporado em seguida e a sua expressão é controlada pelo mencionado promotor SG2 (Figura 8A). Conforme mencionado acima, os promotores subgenômicos SG1 e SG2 podem ser idênticos ou diferentes.

Numa outra forma de realização específica, o vector viral de acordo com a presente invenção também é construído com os mesmos dois promotores subgenômicos (SG1 e SG2), mas trocando as posições do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse (GOI) e o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção, de tal forma que SG1 controle a expressão do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e SG2 controle a expressão do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse (GOI) (Figura 8C). Tal como acima mencionado, os promotores subgenômicos SG1 e SG2 podem ser idênticos ou diferentes.

Numa outra forma de realização específica alternativa, o vector viral de acordo com a presente invenção compreende, a jusante de um promotor subgenômico (tal como SG1), uma construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundido em fase por meio de um ligante de polinucleotídeos; em que o mencionado ligante é convenientemente um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução.

Virtualmente qualquer sequência de nucleotídeos que

codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução e, conseqüentemente, a (auto)protease ou a sequênciade peptídeos ou aminoácidos codificada pela mencionada sequênciade nucleotídeos pode ser utilizada no contexto da presente invenção.

Numa forma de realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende a sequênciade nucleotídeos que codifica uma (auto)protease que actua em cis entre as proteínas resultantes da tradução do gene de selecção e da sequênciade nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse; ou seja, numa realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende uma sequênciade nucleotídeos que, quando traduzida, fornece um local de divisão por meio do qual a poliproteína ou proteína de fusão expressa é processada após a tradução nas proteínas que formam a mencionada proteína de fusão ou poliproteína. Para fins de simplicidade, portanto, a expressão "sequênciade nucleotídeos que codifica uma protease" é ocasionalmente utilizada na presente memória descritiva como um sinónimo da expressão "sequênciade nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução". Por meio de uma ilustração não limitadora, a mencionada sequênciade nucleotídeos que codifica uma (auto)protease que actua em cis entre as proteínas resultantes da tradução do gene de selecção e da sequênciade nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, vem de um vírus, tal como um picornavírus, alfavírus etc. Numa forma de realização específica, o mencionado ligante compreende a sequênciade nucleotídeos que codifica a região de codificação de sequências 2A da poliproteína de vírus da febre aftosa (FMDV) ou autoprotease de FMDV 2A. Numa outra forma de

realização específica, o mencionado ligante compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o domínio de terminal carbóxi do capsídeo SFV com actividade proteolítica. Uma representação esquemática desta forma de realização específica alternativa é exibida na Figura 8B, em que se demonstra que um promotor subgenômico (tal como SG1) controla a expressão da mencionada construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse (GOI), fundido em fase por meio do mencionado ligante. A co-tradução (tradução conjunta) dos dois genes (gene de selecção e GOI) ocorre, desta forma, numa única poliproteína que, após a tradução, é rapidamente dividida por meio de ruptura no local de divisão (auto)proteolítica, produzindo a proteína de selecção e o produto heterólogo de interesse. O uso desses locais de ruptura (auto)proteolíticos pós-tradução foi descrito anteriormente no Pedido de Patente Europeu nº EP 736099 e também por Ryan & Drew (35), particularmente o uso da sequência que codifica a região 2A da poliproteína de FMDV (autoprotease FMDV 2A), cujo teor completo é incluído por meio de referência.

Alternativamente, numa outra forma de realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease que actua em trans; neste caso, a mencionada protease poderá ser expressa pela célula transfectada com o vector viral de acordo com a presente invenção, seja de forma nativa ou recombinante ou, alternativamente, a mencionada protease poderá ser adicionada de forma exógena para liberar o produto

heterólogo de interesse da proteína de fusão que compreende a proteína de selecção e o produto heterólogo de interesse. Virtualmente qualquer sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease que actua em trans e, conseqüentemente, a sequência de aminoácidos codificada pela mencionada sequência pode ser utilizada no contexto da presente invenção. Por meio de uma ilustração não limitadora, a mencionada sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão de uma protease que actua em trans pode ser uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos que pode ser dividida por uma endopeptidase etc. Por meio de uma ilustração não limitadora, a mencionada sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease que actua em trans é uma sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease de vírus, um polivírus, por exemplo, tal como o Vírus de Corrosão do Fumo (ETV) etc. e a mencionada protease pode ser expressa pela célula transfectada com o vector viral de acordo com a presente invenção (de forma nativa ou porque foi transformada de forma apropriada) etc.

Alternativamente, numa outra forma de realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão que pode ser reconhecido por um reagente química, tal como brometo de cianogénio, divisão dos resíduos de metionina etc.

Na mencionada construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção fundido em fase ao polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse

e a extremidade 3' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção pode fundida em fase por meio do mencionado ligante à extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse (GOI). Alternativamente, a extremidade 3' do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse (GOI) pode ser fundida em fase por meio do mencionado ligante à extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção.

Quando expresso por células veículo, o gene de selecção presente no vector viral de acordo com a presente invenção permite a selecção das células que conduzem o vector viral de acordo com a presente invenção dentre as células que não foram transfectadas ou que a perderam. Virtualmente qualquer gene de selecção que permita a selecção das células que conduzem o vector viral de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para implementar a presente invenção. Por meio de uma ilustração não limitadora, o mencionado gene de selecção pode ser um gene cuja expressão confere resistência a um antibiótico, um gene que permita a síntese de um nutriente essencial que é omitido no meio de cultura, um gene que oferece uma vantagem selectiva às células transfectadas etc. Numa realização específica, o mencionado gene de selecção é um gene cuja expressão que confere resistência a um antibiótico, um antibiótico tóxico para células de mamíferos, tal como o gene que confere resistência à higromicina (hph), o gene que confere resistência à neomicina (neoR), o gene que codifica a enzima N-acetiltransferase de puromicina (pac), cuja expressão confere às células que conduzem o vector viral conforme a

presente invenção resistência ao antibiótico puromicina etc. O uso do gene pac permite a selecção das células que conduzem o vector viral conforme a presente invenção daqueles que tenham sido transfectados ou que o perderam, adicionando puromicina ao meio.

O produto heterólogo de interesse pode ser virtualmente qualquer proteína ou peptídeo de interesse, tal como uma proteína relatora ou peptídeo (β -gal etc.); ou um peptídeo, proteína ou um anticorpo (ou um de seus fragmentos funcionais) com aplicações terapêuticas ou de diagnóstico; ou qualquer proteína recombinante ou peptídeo de interesse. Da forma utilizada no presente, o termo "heterólogo" inclui adicionalmente "recombinante", ou seja, não aparece naturalmente. Exemplos não limitativos ilustrativos de produtos heterólogos de interesse incluem peptídeos e proteínas com aplicações terapêuticas, tais como factor de crescimento similar a insulina I (IGF-I), cardiotrofina-1 (CT1), oncostatina M (OSM), interferona alfa (tal como IFNa5), anfirregulina (AR), factor neutrófico derivado de células gliais (GDNF), proteína de células endoteliais C/receptor de proteína C activada (EPCR), anticorpos (ou seus fragmentos funcionais) de interesse ou de aplicação terapêutica ou de diagnóstico etc. O polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse presente no vector viral de acordo com a presente invenção compreende, portanto, a sequência que codifica o produto heterólogo de interesse.

O conjunto de "gene replicase de SFV que sofreu mutação - GOI - gene de selecção" ou, alternativamente, o conjunto "gene replicase SFV que sofreu mutação - gene de

selecção - GOI", ladeado pelas sequências 5' e 3' necessárias para reprodução, forma uma réplica de RNA que pode ser autoamplificada no interior da célula.

O vector viral de acordo com a presente invenção pode ser utilizado em forma de RNA ou também em forma de DNA.

Quando for utilizado em forma de RNA, o vector viral conforme a presente invenção é completado com a adição de uma estrutura de tampa na sua extremidade 5'.

Quando utilizado em forma de DNA, o vector completo incluiria um promotor funcional em eucariotes, um promotor de citomegalovírus (CMV), tal como a sequência de réplica de SFV em qualquer das realizações definidas anteriormente e uma sequência de sinal de término de transcrição, uma sequência de sinal derivada, por exemplo, de SV40. O vector é transcrito, portanto, em RNA no interior das células transfectadas, onde será autoamplificado.

Opcionalmente, se desejado, o vector viral de acordo com a presente invenção pode conter um amplificador de tradução ou transcrição genética, ou seja, um ácido nucleico que pode unir-se a um activador, tal como um factor de transcrição, para aumentar o nível de tradução ou transcrição genética; como se sabe, o mencionado amplificador pode ser adjacente ao gene sobre o qual actua ou distante dele. Da forma utilizada no presente relatório descritivo, o termo "amplificador" inclui os amplificadores de transcrição genética e amplificadores de tradução genética, incluindo as regiões conhecidas como IRES (Local de Entrada de Ribossomos Interno) que, como se sabe, são regiões que favorecem o início de tradução. Se desejado, o

mencionado amplificador pode ser formado num conjunto com um ligante de polinucleotídeo (previamente definido) que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítico pós-tradução. Virtualmente, qualquer amplificador de tradução ou transcrição genética apropriado pode ser utilizado no contexto da presente invenção. Como forma de ilustração, o mencionado amplificador pode ser o amplificador de tradução SFV mínimo "b1" que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica os 34 primeiros aminoácidos do capsídeo de SFV. Numa realização específica, o vector viral de acordo com a presente invenção compreende o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse fundido na sua extremidade 5' a um aprimorador ou, alternativamente, a um conjunto que compreende o mencionado amplificador e um ligante de polinucleotídeos que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução (previamente definido). Numa forma de realização específica, o vector viral conforme a presente invenção compreende a sequência precursora de IGF-I humana (IGF-IB) fundida na sua extremidade 5' com um conjunto que compreende o amplificador de tradução mínimo ("b1") do capsídeo de SFV seguido pela sequência de nucleotídeos que codifica a autoprotease de FMDV 2A (pSFVb12A-IGF-IB, Exemplo 10).

As construções de RNA ou DNA para preparação do vector viral de acordo com a presente invenção podem ser obtidas por meio de métodos de biologia molecular convencional incluídos em manuais gerais de laboratório, tal como em *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Joseph Sambrook, David W. Russel, Eds., 2001, 3ª Ed., Cold Spring Harbor,

Nova Iorque) ou em *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman e K. Struhl, Eds., vol. 2. Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, Nova Iorque, NY, actualizado em Setembro de 2006.

O vector viral de acordo com a presente invenção, derivado do mutante duplo não citopático isolado em SFV S2-9 (P718T/R649H) exhibe níveis de expressão muito similares aos do vector SFV do tipo selvagem.

O vector viral de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para a geração *in vitro* de linhagens celulares estáveis que podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse. O uso do mencionado vector viral de acordo com a presente invenção para a geração *in vitro* de linhagens celulares estáveis que podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse forma um aspecto adicional da presente invenção.

Linhagens de células estáveis conforme a presente invenção

O vector viral de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para a geração de linhagens celulares estáveis *in vitro* que podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse.

Num outro aspecto, portanto, a presente invenção refere-se a uma linhagem de células estáveis que pode expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse, a seguir linhagem de células estáveis conforme a presente invenção, caracterizada por ser uma linhagem celular transfectada com um vector viral conforme a

presente invenção, que compreende uma réplica de SFV, em que a mencionada réplica compreende (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima replicase de SFV com mutações P718T e R649H na subunidade nsp2, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse.

Tal com acima mencionado, segundo a presente invenção, uma linhagem celular é "estável" quando o percentual de células que expressam o produto heterólogo de interesse na passagem 10 é de mais de 85%, em que o mencionado percentual é capaz de ser mantido ou excedido em passagens sucessivas ou subsequentes. De forma semelhante, uma expressão é "constitutiva" quando as linhagens de células estáveis mencionadas acima podem expressar adicionalmente o produto heterólogo num nível quantitativamente alto (mais de 50% com relação à atingida 24 horas após a transdução quando as células sofrem transdução com o vector do tipo selvagem).

Numa realização específica, a linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção é uma linhagem de células estáveis transfectadas com um vector viral conforme a presente invenção cuja réplica de SFV compreende sequências SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2.

Numa outra forma de realização específica, a linhagem de células estáveis conforme a presente invenção é uma linhagem de células estáveis transfectadas com um vector viral conforme a presente invenção que compreende:

- a. um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse, cuja expressão é controlada por um primeiro promotor subgenômico de SFV (SG1); e
- b. um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção, cuja expressão é controlada por um segundo promotor subgenômico de SFV (SG2).

Os mencionados primeiro e segundo promotores subgenômicos de SFV podem ser idênticos ou diferentes.

Numa outra forma de realização específica, a linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção é uma linhagem de células estáveis transfectadas com um vector viral de acordo com a presente invenção, em que o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse está localizado a jusante de um primeiro promotor subgenômico (SG1) sobreposto na replicase e sua expressão é controlada pelo mencionado promotor SG1 e o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção está localizado a jusante de um segundo promotor subgenômico (SG2) que controla a expressão do mencionado polinucleotídeo que compreende o gene de selecção. Os mencionados promotores subgenômicos SG1 e SG2 podem ser idênticos ou diferentes. A posição relativa entre os dois polinucleotídeos pode variar conforme o mencionado acima com relação ao vector viral conforme a presente invenção.

Numa outra forma de realização específica, a linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção é uma linhagem de células estáveis transfectada com um vector

viral conforme a presente invenção que compreende, a jusante de um promotor subgenômico (tal como SG1), uma construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundido em fase por meio de um ligante de polinucleotídeos; em que o mencionado ligante é convenientemente um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução. As características do mencionado ligante já foram mencionadas acima com relação ao vector viral de acordo com a presente invenção. Numa realização específica, o mencionado ligante compreende a sequência de nucleotídeos que codifica uma (auto)protease que actua em cis entre as proteínas resultantes da tradução do gene de selecção e da sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, tal como a sequência de nucleotídeos que codifica a região 2A da poliproteína de vírus da febre aftosa (FMDV) ou autoprotease de FMDV 2A ou a sequência de nucleotídeos que codifica o domínio terminal carboxi do capsídeo de SFV etc. Numa outra realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease que actua em trans, tal como a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão para uma protease viral, tal como a protease de ETV etc., neste caso, a mencionada protease poderá ser expressa pela linhagem celular conforme a presente invenção ou, alternativamente, a mencionada protease poderá ser adicionada de forma exógena. Numa outra forma de realização específica, o mencionado ligante é um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão que pode ser reconhecido

por um reagente químico, tal como brometo de cianogénio, divisão dos resíduos de metionina etc., conforme mencionado acima.

Nesta forma de realização específica da linhagem de células estáveis conforme a presente invenção em que um vector viral de acordo com a presente invenção é utilizado compreende, a jusante de um promotor subgenômico, uma construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundido em fase por meio de um ligante de polinucleotídeo, o promotor subgenômico (tal como SG1) controla a expressão da mencionada construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundido em fase por meio do mencionado ligante, em que a co-tradução dos dois genes (gene de selecção e gene de interesse) que ocorre numa única poliproteína que, após a tradução, é rapidamente dividida por meio de rompimento no local de divisão (auto)proteolítica, que produz a proteína de selecção e o produto heterólogo de interesse. A posição relativa entre os dois polinucleotídeos no interior da construção mencionada acima pode variar conforme acima mencionado em relação ao vector viral conforme a presente invenção, ou seja, na mencionada construção, a extremidade 3' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção pode ser fundida em fase por meio do mencionado ligante à extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse ou vice-versa, em que a extremidade 3' do polinucleotídeo

compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse pode ser fundido em fase por meio do mencionado ligante à extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção. Diversos testes conduzidos pelos inventores demonstraram que este tipo de vectores virais de acordo com a presente invenção que compreende, a jusante de um promotor subgenômico, uma construção que compreende o polinucleotídeo que compreende o gene de selecção e o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundidos em fase por meio de um ligante que compreende uma sequência de DNA, gera linhagens celulares muito estáveis mantendo uma alta expressão do produto heterólogo de interesse similar ao obtido com um vector SFV do tipo selvagem.

As duas características do gene de selecção e do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse foram mencionadas com relação ao vector viral de acordo com a presente invenção.

Numa forma de realização específica, o gene de selecção presente no vector viral de acordo com a presente invenção utilizado para gerar a linhagem de células estáveis conforme a presente invenção é um gene cuja expressão confere resistência a um antibiótico, um gene que permite a síntese de um nutriente essencial que é omitido no meio de cultura, um gene que oferece uma vantagem selectiva às células transfectadas etc., tal como o gene que confere resistência à higromicina (hph), o gene que confere resistência a neomicina (neoR), o gene que codifica a enzima N-acetiltransferase puromicina (pac), cuja

expressão confere às células que conduzem o vector viral de acordo com a presente invenção resistência ao antibiótico de puromicina etc.

Do mesmo modo, numa forma de realização específica, o produto heterólogo de interesse expresso pela linhagem de células estáveis conforme a presente invenção é uma proteína relatora (β -gal etc.); ou uma proteína, peptídeo ou anticorpo (ou seu fragmento) com aplicações terapêuticas ou de diagnóstico; ou qualquer outra proteína recombinante ou peptídeo de interesse; exemplos não limitadores ilustrativos dos mencionados produtos heterólogos de interesse incluem peptídeos e proteínas com aplicações terapêuticas, tais como IGF-I, CT1, OSM, IFN, AR, GDNF, EPCR, anticorpos de interesse ou com aplicação terapêutica ou de diagnóstico etc.

Numa forma de realização específica, a linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção é uma linhagem de células estáveis que expressa constitutivamente cardiotrofina-1 de rato (rCT). Dois tipos de linhagens celulares foram gerados utilizando dois vectores virais diferentes de acordo com a presente invenção. Num caso, a expressão de rCT e pac de um vector viral de acordo com a presente invenção que contém dois promotores subgenômicos (SFV-S2-9-rCT-pac) levou à geração de linhagens celulares nas quais a expressão permaneceu estável pelas cinco primeiras passagens, sendo gradualmente perdida a partir da passagem 5 em diante (Figura 16). Noutros caso, entretanto, quando for utilizado o vector de acordo com a presente invenção identificado como SFV-S2-9-pac2A-rCT, no qual o gene pac e o gene codificador de rCT são fundidos em fase utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica a

autoprotease de FMDV 2A como um ligante, foram obtidas linhagens de células muito estáveis que mantiveram uma alta expressão de rCT similar à obtida com um vector SFV do tipo selvagem por pelo menos dez passagens em cultura (Figura 17).

Numa outra forma de realização específica, a linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção é uma linhagem de células estáveis que expressa factor de crescimento similar a insulina I (IGF-I). Dois tipos de linhagens celulares foram gerados utilizando dois vectores virais diferentes de acordo com a presente invenção. Num caso, a expressão de IGF-I e pac de um vector viral de acordo com a presente invenção que contém dois promotores subgenômicos (SFV-S2-9-IGF-pac) levou à geração de linhagens celulares nas quais a expressão permaneceu estável pelas primeiras quatro ou cinco passagens, sendo gradualmente perdida a partir da passagem 5 em diante e reduzida em oitenta vezes ao atingir a passagem 10 (Figura 20). Ao utilizar-se o vector viral de acordo com a presente invenção identificado como SFV-S2-9-pac2A-IGF, no qual o gene pac e o gene codificador de IGF-I são fundidos em fase utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease de FMDV 2A como um ligante, entretanto, foram geradas linhagens celulares com estabilidade mais alta que mantiveram uma alta expressão de IGF-I similar à obtida com um vector SFV do tipo selvagem com uma redução de apenas cerca de quatro vezes em dez passagens em cultura (Figura 20). Este último vector (SFV-S2-9-pac2A-IGF) exibiu ainda níveis de expressão de IGF-I em passagens anteriores que foram cerca de duas vezes maiores que os observados com o vector SFV-S2-9-IGF-pac.

As linhagens de células estáveis de acordo com a presente invenção podem ser obtidas por meio dos métodos de biologia molecular convencionais, tais como por meio de transfecção de células apropriadas ou linhagens celulares com o vector viral conforme a presente invenção etc., incluídos em manuais gerais de laboratório, tal como em *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Joseph Sambrook, David W. Russel, Eds., 2001, 3^a Ed., Cold Spring Harbor, Nova Iorque) ou em *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman e K. Struhl, Eds., vol. 2. Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, Nova Iorque, NY, actualizado em Setembro de 2006.

A célula a ser transfectada pode ser virtualmente qualquer célula eucariótica ou linhagem celular que permita a reprodução do vector viral de acordo com a presente invenção. A mencionada célula ou linhagem celular pode ser uma linhagem de mamífero. Numa realização específica, a mencionada célula ou linhagem celular a ser transfectada é uma linhagem celular derivada de fibroblastos de rins de hamster, tal como a linhagem de células BHK-21.

A transfecção das células é conduzida por meio de qualquer processo físico ou químico convencional que permite a introdução do vector viral conforme a presente invenção nas células, tal como por meio de electroporação ou de conjugação do material genético com lípidos catiónicos. Estes processos serão úteis para a transfecção do vector viral de acordo com a presente invenção na forma de RNA ou de DNA. Numa realização específica, a transfecção é conduzida por meio de electroporação (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al, mencionado

acima).

Método de geração de linhagens de células estáveis *in vitro*
de acordo com a presente invenção

Num outro aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de geração *in vitro* de uma linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção, com a capacidade de expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse, a seguir método de geração de linhagens de células estáveis de acordo com a presente invenção, que compreende:

I. transfecção de células com um vector viral de acordo com a presente invenção, que compreende uma réplica do SFV, em que a mencionada réplica compreende (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima SFV replicase com mutações P718T e R649H na subunidade nsp2, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse;

II. selecção das células estáveis geradas na etapa I;
e

III. cultura e manutenção das células estáveis.

Conforme mencionado acima, a célula a ser transfectada pode ser virtualmente qualquer célula eucariótica ou linhagem celular que permita a reprodução do vector viral de acordo com a presente invenção. Como forma de ilustração não limitadora, a mencionada célula ou linhagem celular a

ser transfectada pode ser uma linhagem de mamíferos. Numa forma de realização específica, a mencionada célula ou linhagem celular a ser transfectada é uma linhagem celular derivada de fibroblastos de rins de hamster, tal como a linhagem de células BHK-21.

As características do vector viral de acordo com a presente invenção já foram mencionadas anteriormente. O vector viral de acordo com a presente invenção pode ser utilizado em forma de RNA ou, alternativamente, em forma de DNA. Quando for utilizado em forma de RNA, o vector viral de acordo com a presente invenção é completado com a adição de uma estrutura de tampa na sua extremidade 5'. Quando for utilizado em forma de DNA, o vector completo inclui um promotor funcional em células eucarióticas, um promotor de citomegalovírus (CMV), tal como a sequência de réplica de SFV em qualquer das realizações definidas anteriormente com relação ao vector viral de acordo com a presente invenção e uma sequência de sinal de término de transcrição, tal como uma sequência de sinal derivada de SV40.

As células podem ser transfectadas por meio de qualquer processo físico ou químico convencional que permita a introdução do vector viral de acordo com a presente invenção nas células, tal como por meio de electroporação ou de conjugação do material genético com lípidos catiónicos. Estes processos serão úteis para a transfecção do vector viral de acordo com a presente invenção na forma de RNA ou de DNA. Numa forma de realização específica, a transfecção é conduzida por meio de electroporação (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al, mencionado acima).

Células estáveis serão seleccionadas de uma forma diferente conforme o gene de selecção incorporado ao vector viral de acordo com a presente invenção, por meio do que as células são transfectadas. Conforme explicado acima, a expressão do gene de selecção confere às células transfectadas uma vantagem que permite a sua selecção. Será suficiente submeter as células a condições selectivas para as células transfectadas. Quando o gene *pac* for utilizado como o gene de selecção, a sua expressão transfectada nas células torna-as resistentes a puromicina. Neste caso, será suficiente adicionar puromicina ao meio de cultura para eliminar as células não transfectadas ou as células que perderam o vector viral de acordo com a presente invenção.

As células estáveis são cultivadas e mantidas em condições e meios de cultura convencionais, conforme o tipo de célula transfectada, e sua manutenção sob o estímulo selectivo para células transfectadas (na presença, por exemplo, de puromicina). Quando as células forem BHK-21, elas são cultivadas em condições já descritas (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al, mencionado acima).

Método de produção de produtos heterólogos *in vitro* de interesse

A linhagem de células estável de acordo com a presente invenção pode ser utilizada para a geração *in vitro* de produtos heterólogos de interesse. Como resultado, o uso da mencionada linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção para a geração *in vitro* de produtos heterólogos de interesse forma um aspecto adicional da presente invenção.

Num outro aspecto, portanto, a presente invenção refere-se a um método de produção *in vitro* de produtos heterólogos de interesse que compreende a cultura de uma linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção sob condições que permitam a expressão do produto heterólogo de interesse contido no vector viral de acordo com a presente invenção utilizado para gerar a mencionada linhagem de células estáveis conforme a presente invenção.

Mais especificamente, o método de elaboração *in vitro* de produtos heterólogos de interesse compreende:

I. transfecção de células com um vector viral de acordo com a presente invenção que compreende uma réplica do SFV, em que a mencionada réplica compreende (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima replicase de SFV com mutações P718T e R649H na subunidade *nsp2*, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse;

II. selecção das células estáveis geradas na etapa I (linhagens de células estáveis de acordo com a presente invenção);

III. cultura e manutenção das mencionadas células estáveis (linhagens celulares de acordo com a presente invenção); e, se desejado,

IV. extracção do produto heterólogo de interesse.

As etapas I, II e III correspondem realmente à geração da linhagem de células estáveis de acordo com a presente invenção que expressa constitutivamente o produto heterólogo de interesse. Neste caso, a célula será transfectada com um vector viral de acordo com a presente invenção que inclui um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse que deve ser produzido. Conforme indicado acima, o mencionado polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse é inserido no vector viral de acordo com a presente invenção numa posição tal que a sua expressão é controlada por um promotor subgenômico de SFV.

Conforme mencionado acima, o produto heterólogo de interesse pode ser qualquer proteína ou peptídeo de interesse, tal como uma proteína relatora (β -gal etc.); ou uma proteína, peptídeo ou anticorpo (ou um de seus fragmentos) com aplicações terapêuticas ou de diagnóstico; ou qualquer outra proteína recombinante ou peptídeo de interesse. Exemplos não limitadores ilustrativos de produtos heterólogos de interesse incluem peptídeos e proteínas com aplicações terapêuticas, tais como factor de crescimento similar a insulina I (IGF-I), cardiotrofina-1 (CT1), oncostatina M (OSM), interferona alfa (tal como IFNa5), anfirregulina (AR), factor neutrófico derivado de células gliais (GDNF), proteína de células endoteliais C/receptor de proteína C activada (EPCR), anticorpos de interesse ou com aplicação terapêutica ou de diagnóstico etc.

As etapas de geração da linhagem de células estáveis conforme a presente invenção serão conduzidas conforme

descrito anteriormente no método de geração de linhagens de células estáveis de acordo com a presente invenção.

O produto heterólogo de interesse pode ser ocasionalmente utilizado na forma em que se encontra no meio de cultura, ou seja, sem isolamento nem purificação; no entanto, pode ocasionalmente ser vantajoso extrair (isolar) e opcionalmente purificar o produto heterólogo de interesse. Neste caso, a extracção do produto heterólogo de interesse pode ser conduzida a partir de um lisato celular quando o produto heterólogo de interesse for intracelular (não pode ser secretado para o meio) ou do sobrenadante das células estáveis quando os produtos heterólogos de interesse puderem ser secretados para o meio circunvizinho.

Qualquer processo convencional de extracção e purificação de peptídeos e proteínas que é apropriado para o produto heterólogo específico de interesse que deve ser produzido, dependendo da natureza do mencionado produto, pode ser utilizado para a extracção. Exemplos não limitativos ilustrativos desses processos incluem processos baseados na separação por tamanho e/ou carga eléctrica (precipitação em sulfato de amónio, filtragem de gel, ultracentrifugação, electroforese, electro-concentração etc.), por meio de imunopurificação (coluna de afinidade, imunoprecipitação etc.), separação por meio de união a um ligante específico etc.

O objectivo dos exemplos a seguir é ilustrar a presente invenção sem pretender limitá-la.

EXEMPLOS DA INVENÇÃO

Materiais e Métodos

Construções de plasmídeos

Os plasmídeos pSFV-1 e pSFV3-LacZ, gentilmente fornecidos pelo Dr. P. Lilijeström (Instituto Karolinska, Estocolmo) (18), foram descritos anteriormente. Para construir os plasmídeos pSFV-S2 e pSFV-S3, um fragmento de 3,5 kb que contém a área de nsp2 a sofrer mutagénese foi extraído de pSFV-1 com SacI/XhoI e foi subclonado em plasmídeo pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, Estados Unidos) digerido com as mesmas enzimas, que geraram o plasmídeo Blu-nsp2. As mutações P718T e P718F foram introduzidas em nsp2 neste plasmídeo por meio de PCR cruzado. Os primers externos SF3669-VS (SEQ ID N° 3) e SF4096-RS (SEQ ID N° 4) foram combinados sequencialmente com os pares de oligonucleotídeos projectados para introduzir as mutações correspondentes. Para S2, o par de oligonucleotídeos interno utilizado foi mutS2-VS (SEQ ID N° 5) e mutS2-RS (SEQ ID N° 6) que se sobrepõe em 25 nucleotídeos e em que o CCC de códons que codifica Pro 718 em nsp2 sofreu mutação em ACG que codifica Thr (sublinhado). Para S3, os oligonucleotídeos internos utilizados foram mutS3-RS (SEQ ID N° 7) e mutS3-RS (SEQ ID N° 8) que se sobrepõe em 25 nucleotídeos e em que o CCC de códons que codifica Pro 718 em nsp2 sofreu mutação em TTT que codifica Phe (sublinhado). PCR cruzado foi conduzido com Pfu e produziu fragmentos de DNA de 430 bp que foram digeridos com EagI/NarI e clonados em Blu-nsp2 após digestão parcial com EagI e digestão completa com NarI, que gerou plasmídeos Blu-nsp2-S2 ou Blu-nsp2-S3,

respectivamente. A presença de mutações S2 ou S3 foi confirmada nesses plasmídeos por meio de sequenciamento. Por fim, um fragmento de SacI/XhoI com 3,5 kb que contém nsp2 que sofreu mutação foi extraído de Blu-nsp2-S2 ou de Blu-nsp2-S3 e foi subclonado em pSFV-1 digerido com as mesmas enzimas, que geraram os plasmídeos pSFV-S2 e pSFV-S3, respectivamente. A fim de clonar LacZ nesses plasmídeos, um fragmento de DNA com 3,86 kb que contém esse gene foi extraído com XbaI/XmaI de pSFV3-LacZ e foi clonado em pSFV-S2 ou pSFV-S3 digerido com as mesmas enzimas, que geraram plasmídeos pSFV-S2-LacZ e pSFV-S3-LacZ, respectivamente.

A fim de gerar o plasmídeo pSFV-pac, um fragmento de 0,95 kb de DNA que contém o gene puromicina N-acetiltransferase (pac) foi extraído de plasmídeo pBSpac (5) (gentilmente fornecido pelo Dr. J. Ortin, CNB, Madri, Espanha) por meio de digestão com NotI e HpaI. Após corte obtuso da extremidade NotI com Klenow, este fragmento foi clonado em pSFV-1 digerido com SmaI, que gerou pSFV-pac. O plasmídeo pSFV-S2-pac foi gerado mediante substituição do fragmento de SacI/XhoI de 3,5 kb que contém a maior parte de nsp2 em pSFV-pac com o mesmo fragmento obtido de Blu-nsp2-S2, que contém a mutação S2.

O plasmídeo pSFV-S2-9-LacZ foi gerado mediante substituição do fragmento RsrII/XhoI com 3,2 kb em pSFV3-LacZ com o mesmo fragmento obtido de pSFV-S2-9-pac cobrindo a área da replicase que contém mutações P718T e R649H de nsp2. A fim de gerar o vector duplo pSFV-S2-9-LacZ-pac, um conjunto de 1,9 kb que contém o promotor subgenômico de SFV seguido pelo gene pac foi extraído de pSFV-pac com MscI/SpeI e foi clonado em pSFV-S2-9-LacZ digerido com

SmaI/SpeI.

A fim de gerar pSFV-RHR-pac, a primeira mutação R649H de nsp2 foi introduzida em Blu-nsp2 por meio de PCR. Resumidamente, foi obtido um fragmento de PCR com 1,67 kb com os oligonucleotídeos SF1947-VS (SEQ ID N° 9) e SF3623-S29-RS (SEQ ID N° 10) com Pfu utilizando pSFV-1 como molde. Neste último oligonucleotídeo, o códon CGC foi substituído por CAC, que gera a mutação R649H em nsp2 (sublinhado; observe que o primer contém a sequência reversa). A sequência deste oligonucleotídeo compreende o local NarI de nsp2 próximo da mutação R649H (indicado em itálico). O fragmento de PCR foi digerido com BstEII/NarI, que gerou um fragmento de DNA com 1,36 kb que foi clonado em Blu-nsp2 digerido com as mesmas enzimas, de forma a gerar Blu-nsp2-RHR. Por fim, um fragmento de SacI/XhoI de 3,5 kb contendo nsp2 que sofreu mutação foi extraído de Blu-nsp2-RHR e subclonado em pSFV-pac digerido com as mesmas enzimas, que geraram o plasmídeo pSFV-RHR-pac.

Transcrição e transfecção de RNA

O DNA de plasmídeo purificado foi linearizado por meio de digestão com SpeI e transcrito na presença de um análogo de tampa (New England Biolabs, Estados Unidos) utilizando polimerase de SP6 (Amersham-Pharmacia). Os RNAs sintetizados *in vitro* foram transfectados em células BHK-21 por meio de electroporação conforme descrito anteriormente (17).

Embalagem de réplicas

A embalagem do RNA recombinante de SFV em partículas

virais (vp) foi conduzida por meio da co-electroporação de células BHK-21 com o RNA recombinante e com RNAs SFV auxiliar-S2 e auxiliar-C-S219A conforme descrito (29). As partículas de SFV que conduzem LacZ como um gene indicador foram tituladas por meio de manchas de X-gal das células de BHK-21 com diluições em série do vírus. Para as partículas de SFV que conduzem o gene de pac, a titulação foi conduzida por meio de imunofluorescência indirecta das células BHK-21 infectadas com um antissoro de coelho policlonal específico contra SFV nsp2 como um anticorpo primário (E. Casales, resultados ainda não publicados).

Seleção e passagens das linhas de células resistentes a puromicina

Uma solução de 1 mg/ml de puromicina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) em MEM foi preparada, filtrada, parcelada e armazenada a -20°C . Após transfecção das células de BHK com os RNAs recombinantes de SFV que conduzem o gene pac, as células foram mantidas em recuperação por 24 horas antes da adição de puromicina a 5 $\mu\text{g/ml}$. A fim de seleccionar as células resistentes a puromicina, o meio foi substituído a cada dois a três dias com um novo meio contendo puromicina. Após a selecção, as passagens das células sempre foram conduzidas na presença de puromicina na concentração indicada. No caso de células transfectadas com SFV-S2-pac, locais individuais foram clonados, expandidos e armazenados congelados em azoto líquido. O meio utilizado para cultivar as células foi MEM Glasgow BHK-21 (Invitrogene, Estados Unidos) suplementadas com soro de feto bovino a 5%, meio de fosfato triptose a 10% (Invitrogene, Estados Unidos), 2 mM de glutamina, 20 mM de HEPES, estreptomomicina a 100 $\mu\text{g/ml}$ e penicilina a 100

UI/ml (meio BHK completo).

Mapeamento das mutações adaptativas

O RNA celular total das células resistentes à puromicina obtidas após a transfecção com o RNA SFV-S2-pac foi isolado com o kit RNeasy (Qiagen, Alemanha). 5 µg de RNA de cada clone foram utilizados para sintetizar cDNA com transcriptase reversa de M-MLV (Promega, Madison, Estados Unidos) utilizando um oligonucleotídeo com sentido negativo complementar a nucleotídeos SFV 4977 a 5010 (SEQ ID N° 11) como um primer. Após a transcrição reversa, os cDNAs foram amplificados por meio de trinta ciclos de PCR com Taq Plus Long (Stratagene, La Jolla, Estados Unidos) com o mesmo primer com sentido negativo e um oligonucleotídeo com sentido positivo complementar a nucleotídeos SFV 1040 a 1074 (SEQ ID N° 12). O fragmento de 3971 bp resultante foi digerido com BcII (1106) e Bsu36I (4916) e foi clonado nos locais pSFV-pac correspondentes. O DNA de plasmídeo derivado de cada clone individual foi linearizado e utilizado como um molde para sintetizar RNA *in vitro*, que foi transfectado em seguida em células BHK-21 a fim de determinar a sua capacidade de conferir resistência a puromicina. Quando a sub-região compreendida entre as posições 1106 e 4916 era capaz de permitir a sobrevivência e divisão celular na presença de puromicina, como foi o caso do clone S2-9, ela foi completamente sequenciada a partir de dois clones de plasmídeos independentes.

Análise de RNA

O RNA total foi extraído das células transfectadas ou de certas linhagens celulares utilizando um "mini kit"

RNeasy (Qiagen, Alemanha) e foi analisado por meio de Northern Blot. 3 µg de RNA total foram fracionados por tamanho em gel de agarose a 1,2% com formaldeído, transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-N+, Amersham) e hibridizados com um oligonucleotídeo marcado com ³²P específico para o promotor subgenômico de SFV (SEQ ID N° 13). As quantidades relativas dos RNAs de SFV genômicos e subgenômicos foram determinadas utilizando um PhosphorImager (Cyclone, Packard, Estados Unidos) e software Optiquant (versão 4.0, Packard).

Análise da expressão e processamento de replicase

Para as experiências de tradução *in vitro*, os RNAs de SFV foram transcritos em primeiro lugar *in vitro* conforme descrito anteriormente, purificados com o kit RNeasy (Qiagen, Alemanha), misturados com lisatos de reticulócitos de coelho tratados com nuclease (Promega) na presença de uma mistura de [³⁵S]-metionina e [³⁵S]-cisteína (Amersham, Estados Unidos) e foram incubados por noventa minutos a 30°C conforme as instruções do fabricante. Cada reacção de tradução continha 2,3 µg de RNA transcrito purificado. As reacções de tradução terminaram mediante adição do tampão de carga Laemmli e foram analisadas por meio de SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 8% seguidos por autorradiografia. Os lisatos foram obtidos para as experiências de análise de imuno-manchas das células BHK-21 transfectadas com os vectores SFV por meio de incubação num tampão que contém 1% Igepal (Sigma, Estados Unidos), 50 mM de Tris HCl, pH 7,6, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA e PMSF a 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) e foram clarificados por meio de centrifugação por seis minutos a 6000 rpm num micro-centrifugador refrigerado e quantificados por meio de

análise Bradford. Os lisatos foram analisados por meio de SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 8%, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com antissoros de coelho policlonais específicos contra SFV nsp3 e nsp2 (E. Casales, resultados ainda não publicados) ou actina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) como anticorpos primários, respectivamente. Um antissoro de carneiro específico para imunoglobulinas de coelho conjugado com HRP foi utilizado como anticorpo secundário. As proteínas foram observadas utilizando Reagente de Quimioluminescência Western Lightning Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante. Para os estudos de localização nuclear, imunofluorescência indirecta das células transfectadas foi conduzida utilizando como anticorpo primário um Acm específico contra SFV nsp2 citoplasmático (gentilmente fornecido por W. Bodemer) ou um Acm específico contra o nsp2 SFV nuclear (gentilmente fornecido pelo Dr. L. Kaariainen) (16).

Análise da expressão de β -gal

As células transfectadas foram lisadas conforme descrito acima e a actividade total do β -gal presente no lisato foi medida conforme descrito (17), ou elas foram manchadas nos momentos indicados com X-gal. A quantidade da proteína produzida por cada célula foi obtida dividindo-se a quantidade média de β -gal detectada por placa pela quantidade média das células transfectadas em cada placa.

EXEMPLO 1**Construção e Caracterização de Vectores SFV que Carregam Mutações Não Citopáticas Derivadas de SIN**

Uma possível abordagem de geração de novos vectores alfavírus não citopáticos é a introdução das mutações descritas anteriormente noutros alfavírus, utilizando a homologia de sequências compartilhada pelos diferentes vírus deste género. Segundo esta abordagem, foi avaliado o efeito das mutações não citopáticas descritas no vírus SIN num vector de expressão derivado de SFV. Havia sido demonstrado anteriormente que as mutações que afectaram o resíduo 726 da subunidade nsp2 de SIN Rep reduzem consideravelmente a citopatogenicidade desse vírus, um facto que foi correlacionado com um nível mais baixo de reprodução de RNA nos mutantes (7, 22). Duas mutações que afectaram este resíduo, P726T e P726F, que haviam sido descritas como parcialmente citopáticas e não citopáticas para SIN, respectivamente, foram introduzidas no resíduo homólogo de nsp2 no vector pSFV-1, que gerou os mutantes pSFV-S2 e pSFV-S3, conduzindo mutações P718T ou P718F em nsp2, respectivamente. Para avaliar a citopatogenicidade desses novos vectores, o gene relator LacZ foi clonado em seguida a partir do promotor subgenômico viral, que gerou os vectores pSFV-S2-LacZ e pSFV-S3-LacZ. O RNA foi sintetizado *in vitro* para cada um desses plasmídeos e foi electroporado em células BHK-21, que foram cultivadas e nas quais a expressão de β -gal foi analisada por meio de manchas de X-gal em diferentes momentos após a transfecção (Figura 1). Ao contrário das células electroporadas com o RNA SFV-LacZ controle no qual, 24 horas após a transfecção, mais de 95% das células expressaram β -gal e exibiram um

fenótipo citopático, apenas um pequeno percentual das células transfectadas com os RNAs de SFV-S2-LacZ ou SFV-S3-LacZ expressou β -gal 24 horas após a transfecção, sem exibir uma morfologia citopática. No caso de SFV-S2-LacZ, o número de células positivas aumentou ao longo do tempo, podendo formar grandes colónias de células que expressam β -gal cinco dias após a electroporação. Este efeito foi consideravelmente menor em SFV-S3-LacZ, com o qual nunca foram observadas colónias azuis no dia 5 após manchas de X-gal. Estes dados sugerem que as mutações P718T e P718F poderão bloquear a reprodução viral ou a expressão de transgene, mas elas geram variantes não citopáticas com frequência relativamente alta que poderão ser o resultado de mutações adaptativas secundárias durante a transcrição *in vitro* ou reprodução de SFV.

EXEMPLO 2

Seleção e mapeamento das réplicas derivadas de SFV-S2 que contêm novas mutações adaptativas

Para seleccionar as populações celulares que contêm réplicas de SFV não citopáticas, o gene relator LacZ foi substituído em plasmídeo pSFV-S2-LacZ com o gene que codifica o marcador de selecção dominante N-acetiltransferase de puromicina (pac) que confere resistência a puromicina, que gerou o plasmídeo pSFV-S2-pac. Utilizando este plasmídeo como molde, RNA foi sintetizado *in vitro* e electroporado em células BHK-21. Puromicina a 5 μ g/ml foi adicionada 24 horas após a electroporação, o que levou à selecção de colónias resistentes à droga que foram expandidas em seguida. A fim de identificar as possíveis mutações adaptativas nas

réplicas presentes nas células seleccionadas, o RNA total foi extraído de clones individuais e um fragmento de 3,9 kb da replicase SFV que compreende toda a sequência de nsp2 foi amplificado por meio de RT-PCR com primers específicos. A região nsp2 da replicase foi amplificada porque a maior parte das mutações não citopáticas descritas no alfavírus havia sido mapeada nesta região. O fragmento de cDNA resgatado de cada clone foi subclonado no plasmídeo original pSFV-pac que substitui a sequência de nsp2 do tipo selvagem. Para verificar se haviam sido resgatadas mutações não citopáticas, RNA foi sintetizado *in vitro* de cada um dos novos plasmídeos e utilizado para electroporar células BHK-21. Vinte e quatro horas após a transfecção, adicionou-se puromicina a 5 µg/ml e as células foram manchadas com violeta de metilo em tempos diferentes, a fim de comparar o seu crescimento com o observado nas células transfectadas com o mutante inicial SFV-S2-pac ou com o SFV-pac original. Um dos clones, o SFV-S2-9-pac, exibiu um claro fenótipo não citopático, pois ele conferiu resistência à puromicina à maior parte das células transfectadas (Figura 2). Outros clones testados exibiram um padrão similar ao de SFV-S2 e não foram adicionalmente analisados neste estudo. As células transfectadas com o SFV-pac original exibiram um claro efeito citopático e a maior parte delas morreu antes do dia 4. O sequenciamento do fragmento de nsp2 de pSFV-S2-9-pac demonstrou que, além da mutação original P718T, houve uma segunda mutação adaptativa na posição 649 de nsp2 na qual Arg havia sido substituído por Hys. Esta nova mutação afeta o sinal de localização nuclear ⁶⁴⁸RRR (27) de SFV nsp2 que, em SFV-S2-9, é alterado para ⁶⁴⁸RHR.

EXEMPLO 3**Efeito de mutação R649H sobre a citopatogenicidade e sobre a localização nuclear de nsp2**

Para verificar o efeito da mutação R649H isoladamente sobre a citopatogenicidade de SFV, esta mutação foi introduzida no plasmídeo pSFV-pac, de forma a gerar o plasmídeo pSFV-RHR-pac. O RNA deste plasmídeo foi transcrito e electroporado em células BHK-21, que foram mantidas em recuperação por 24 horas. Em seguida adicionou-se puromicina a 5 µg/ml e o crescimento das células foi analisado em diferentes momentos manchando-se as células com violeta de metilo conforme descrito acima (Figura 2, coluna à direita). SFV-RHR-pac exibiu um padrão muito similar ao observado para o vector original SFV-pac, induzindo um efeito citopático forte e precoce que levou à morte a maior parte das células antes do dia 4. Estes resultados sugerem que a ausência de citopatogenicidade do vector SFV-S2-9 deveu-se à combinação de mutações P718T e R649H. Para verificar o efeito da mutação R649H sobre a localização nuclear de nsp2, as células BHK-21 foram transfectadas com o RNA dos vectores que continham essa mutação (SFV-S2-9-pac) e SFV-RHR-pac) ou com vectores que não os continham (SFV-pac e SFV-S2-pac) e foram analisados por meio de imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos para a forma nuclear ou para a forma citoplasmática de SFV nsp2, respectivamente (Figura 3). Em todos os casos, nsp2 foi detectado no núcleo e no citoplasma das células transfectadas, o que sugere que a mutação RHR não afectou o transporte para o núcleo dessa proteína.

EXEMPLO 4**Reprodução de RNA em células transfectadas com SFV-S2-9-pac**

A fim de determinar o nível de reprodução de RNA do mutante SFV não citopático duplo, células BHK-21 foram electroporadas com RNA SFV-S2-9-pac, RNA total foi extraído em 24, 48 e 72 horas após a electroporação e analisado por meio de Northern Blot com um oligonucleotídeo marcado com ³²P específico para a sequência do promotor subgenômico SFV, que está presente no RNA genômico e em RNA subgenômico (Figura 4, linhas 2 a 4). A quantidade dos RNAs SFV-S2-9-pac genômicos e subgenômicos, bem como a proporção entre eles, foi comparada com a obtida em células transfectadas com RNA SFV-pac 24 horas após a electroporação (Figura 4, linha 5). Os RNAs SFV-S2-9-pac genômicos e subgenômicos aumentaram ao longo do tempo e aparentemente atingiram um pico 48 horas após a electroporação. Níveis de RNA similares foram observados numa linhagem de células BHK resistentes a puromicina obtida com o vector SFV-S2-9-pac (Figura 4, linha 1). Em todos os casos, os RNAs SFV-S2-9 foram produzidos numa quantidade muito menor que a obtida em células transfectadas com o RNA SFV-pac original (observe-se que a linha 5 foi exposta 72 vezes mais que as linhas 1 a 4). As razões entre RNA subgenômico e genômico observadas nas células transfectadas com SFV-S2-9-pac e seleccionadas com puromicina foram cerca de 1,5 vezes maiores que as observadas em células transfectadas com SFV-pac (Figura 4, números na parte inferior). Nas células transfectadas com SFV-S2-9-pac não seleccionadas, entretanto, esta razão foi consideravelmente maior, especialmente 24 horas após a transfecção, mas foram reduzidas ao longo do tempo, o que indicou que a síntese de

RNA genômico no mutante duplo pôde ser retardada com relação à do RNA subgenômico. Duas faixas adicionais de RNA com um tamanho intermediário entre os RNAs genômicos e subgenômicos também foram detectadas nas células transfectadas com SFV-S2-9-pac (Figura 4, linhas 1 a 4). Estas faixas não foram caracterizadas, mas poderão corresponder a RNAs interferentes defeituosos que podem aparecer durante a reprodução do mutante SFV duplo. Por fim, para determinar se os baixos níveis de reprodução do RNA SFV-S2-9-pac puderam ser recuperados com uma replicase do tipo selvagem fornecida em trans, as células BHK-21 foram electroporadas simultaneamente com os RNAs SFV-S2-9-pac e SFV-LacZ (vector selvagem). Após 24 horas, o RNA total foi extraído das células co-electroporadas e analisado por meio de Northern Blot (Figura 4, linha 7). Os RNAs das células electroporadas com o SFV-pac original (Figura 4, linha 5) e SFV-LacZ (Figura 4, linha 6) foram analisados no mesmo gel e utilizados como marcadores de tamanho molecular para cada um dos RNAs genômicos e subgenômicos. Os RNAs SFV-LacZ e SFV-S2-9-pac genômicos e subgenômicos foram facilmente detectados nas células co-electroporadas após a exposição do gel por uma hora, o que indicou que a replicase do tipo selvagem era capaz de recuperar ao menos parcialmente a reprodução do mutante duplo. Embora a quantidade dos dois RNAs subgenômicos fosse muito similar, o RNA SFV-LacZ genômico foi produzido em níveis cerca de duas a três vezes maiores que o do mutante SFV-S2-9-pac.

EXEMPLO 5**Processamento de replicase em mutante SFV-S2-9**

A quantidade menor de RNA detectada nas células transfectadas com a réplica de SFV-S2-9-pac poderia dever-se a uma alteração no processamento de replicase. A SFV replicase é sintetizada na forma de poliproteína nsp1234, que é dividida em seguida nos seus componentes monoméricos maduros por meio da actividade de protease presente no domínio da extremidade carboxilo de nsp2 (30), na qual as mutações P718T e R649H tenham sido mapeadas. A fim de examinar o efeito dessas mutações sobre o processamento de replicase, os RNAs SFV-S2-9-pac, SFV-RHR-pac e SFV-S2-pac sintetizados *in vitro* foram traduzidos por meio de incubação com lisatos de reticulócitos de coelhos na presença de [³⁵S]-metionina e [³⁵S]-cisteína. O padrão de processamento de replicase nesses mutantes foi comparado com o obtido para o RNA SFV-pac original por meio de SDS-PAGE seguido por autorradiografia (Figura 5A). Nenhuma diferença foi observada no processamento de replicase entre os três mutantes analisados e a replicase do tipo selvagem, que geraram uma acumulação semelhante dos monómeros nsp em todos os casos. A fim de determinar se o processamento de replicase foi afectado *in vivo*, os lisatos de uma linhagem de células BHK-21 resistentes a puromicina que conduz vector SFV-S2-9-pac ou de células BHK-21 transfectadas com RNA SFV-pac original ou com RNA SFV-RHR-pac obtido 24 horas após a electroporação foram analisados por meio de imunomanchas com um antissoro de coelhos específico contra nsp2 (Figura 5B, painel superior) ou contra nsp3 (Figura 5B, painel central) como anticorpos primários, respectivamente. Nos dois casos, as amostras derivadas de SFV-pac e de SFV-

RHR-pac exibiram um padrão muito similar, pois expressaram quantidades comparáveis dos monómeros nsp2 e nsp3. A quantidade de nsp2 e nsp3 na linhagem de células BHK-SFV-S2-9-pac resistentes a puromicina foi cerca de 1,5 vezes mais baixa, o que poderia dever-se à reprodução inferior desse vector. Muito embora quantidades apenas insignificantes de produtos com alto peso molecular fossem detectadas nas amostras analisadas, puderam ser observadas faixas diferenciais entre SFV-S2-9 e os dois outros vectores com o antissoro contra nsp2, o que poderia indicar uma pequena alteração do processamento de replicase S2-9 *in vivo*.

EXEMPLO 6

Expressão do transgene e embalagem da réplica de SFV-S2-9

A fim de determinar o nível de expressão do gene heterólogo em mutante SFV-S2-9, o gene relator de Lac-Z após a clonagem do promotor subgenômico de SFV nesse vector gerou o plasmídeo pSFV-S2-9-Lac-Z. RNA foi sintetizado *in vitro* a partir desse plasmídeo e utilizado para electroporar células BHK-21, em que a expressão de β -gal foi analisada em diferentes momentos após a electroporação. As células foram também transfectadas com RNA do vector original SFV-LacZ, mas foram analisadas apenas 24 horas após a electroporação devido ao efeito citopático induzido por esse vector. Observou-se um nível de expressão de β -gal similar nas células transfectadas com SFV-S2-9-LacZ e SFV-LacZ 24 horas após a transfecção, que estava na faixa de cerca de 15 pg/célula (Figura 6). Este nível de expressão aumentou ao longo do tempo nas células transfectadas com SFV-S2-9-LacZ, estabilizando-se em cerca de 30 pg de β -

gal/célula 48 horas após a transfecção. Para determinar a eficiência de embalagem de mutante duplo SFV-S2-9, células BHK-21 com RNA SFV-S2-9-LacZ e os RNAs SFV-auxiliar-S2 e SFV-auxiliar-C-S219A auxiliares foram co-electroporados conforme descrito (29). Os sobrenadantes das células foram recolhidos 24 horas após a electroporação e foram titulados sobre monocamadas de células BHK-21 por meio de manchas com X-gal. O RNA SFV-S2-9-LacZ foi embalado de forma um tanto ineficiente, o que forneceu títulos de 7×10^3 pv/ml, que foram muito mais baixos que os obtidos pelo SFV-LacZ original (5×10^9 pv/ml). A fim de comparar se a presença da replicase do tipo selvagem poderá aumentar a eficiência de embalagem de mutante duplo S2-9, as células BHK-21 com os RNAs de SFV-S2-9-LacZ, SFV-pac e os dois RNAs auxiliares de SFV foram co-electroporados. Neste caso, observou-se que o SFV vector original foi capaz de aumentar moderadamente a produção de partículas de SFV-S2-9-LacZ, que reagiram num título de 1×10^5 pv/ml 24 horas após a electroporação, que foi determinada por meio de manchas de X-gal das células BHK infectadas. A embalagem do RNA SFV-pac original foi reduzida cerca de cinco vezes nas células em que esse vector foi co-electroporado com SFV-S2-9-LacZ ($2,6 \times 10^8$ pv/ml), em comparação com os títulos obtidos quando o SFV-pac foi embalado isoladamente ($1,2 \times 10^9$ pv/ml), o que foi determinado por meio de imunofluorescência indireta das células infectadas utilizando um antissoro de coelho policlonal específico contra SFV nsp2 como um anticorpo primário. A fim de determinar o efeito que cada uma das duas mutações individuais presentes em SFV-S2-9 possui sobre a embalagem, as células BHK-21 com RNAs SFV auxiliares e com os RNAs SFV-RHR-pac ou SFV-S2-pac foram co-electroporadas e as partículas virais foram tituladas conforme descrito acima para SFV-pac. SFV-RHR-pac foi

embalado com altos títulos ($6,5 \times 10^8$ pv/ml), enquanto SFV-S2-pac exibiu uma eficiência de embalagem muito baixa (2×10^4 pv/ml).

EXEMPLO 7

Produção de uma linhagem de células estáveis que expressa LacZ utilizando vector SFV-S2-9

Como se demonstrou neste estudo, o vector SFV-S2-9-pac pode ser utilizado para seleccionar as células que podem manter a réplica na presença de puromicina. Para estudar se foi possível utilizar este tipo de vector para gerar linhagens de células estáveis que expressam outros transgenes, o gene relator de LacZ foi introduzido em pSFV-S2-9-pac, que gerou o plasmídeo pSFV-S2-9-LacZ-pac em que os genes pac e LacZ estão localizados a jusante de promotores subgenômicos independentes. O RNA deste plasmídeo foi sintetizado *in vitro* e electroporado nas células BHK-21. Vinte e quatro horas após a electroporação, adicionou-se puromicina a 5 µg/ml e, quando as células seleccionadas atingiram a confluência, foram conduzidas dez passagens na presença do antibiótico por um período de trinta dias. O percentual de células que expressam β-gal, determinado em cada passagem por meio de manchas de X-gal, variou de 70% a 90% conforme a passagem, mas foi de mais de 85% na passagem 10, o que indicou uma alta estabilidade da expressão de transgene na presença de selecção (Figura 7). Quando as células seleccionadas passaram sem puromicina, o percentual das células que expressam β-gal caiu muito rapidamente, sendo de menos de 5% após três passagens. O nível de expressão de β-gal nas células seleccionadas com puromicina foi determinado após seis e oito passagens,

atingindo 13 e 18 pg/célula, respectivamente. Estes valores são muito similares aos obtidos nas células transfectadas com o vector original SFV-LacZ 24 horas após a transfecção, o que indicou que as linhagens celulares geradas com o vector SFV-S2-9 poderão ser utilizadas para expressar grandes quantidades de proteínas recombinantes.

EXEMPLO 8

Avaliação de outros mutantes de SFV não citopáticos definidos anteriormente

As mutações que haviam sido definidas anteriormente como não citopáticas para SFV foram introduzidas no gene de subunidade nsp2 da replicase de SFV, em plasmídeo pSFV-1, que contém a sequência de vector. Estas mutações incluíram:

- L10T (alteração de TTG para ACC): mutante SF2A (22).
- L713P (alteração de CTA para CCT): mutante SF2C (22).

Além disso, o plasmídeo pSFV-PD que contém a sequência de vector SFV com mutações S259P e R650D em nsp2 foi gentilmente fornecido pelo Dr. K. Lundström (21).

Os plasmídeos pSFV-SF2A, pSFV-SF2C e pSFV-PD foram gerados (ou obtidos) desta forma, nos quais o gene LacZ foi clonado sob o controle do promotor subgenômico viral, e foram obtidos os plasmídeos: pSFV-SF2A-LacZ, pSFV-SF2C-LacZ e pSFV-PD-LacZ, respectivamente.

Estes plasmídeos foram utilizados para sintetizar RNA *in vitro*, que foi electroporado em células BHK-21. Após a electroporação, as células foram distribuídas em diferentes placas que foram fixadas e manchadas com X-gal em diferentes momentos após a transfecção. A mancha de X-gal causa uma coloração azul nas células que estão a expressar β -gal do gene LacZ, o que permite detectar-se o número de células que conduzem o vector e que tenham sobrevivido em diferentes momentos, bem como a análise da sua morfologia, o que é um indicador de citopatogenicidade. Nesta experiência, células electroporadas com RNA SFV-LacZ, que é citopático para as células de BHK, foram utilizadas como um controle negativo. De forma similar, RNA SFV-S2-LacZ, que conduz a mutação P718T em nsp2 e gera um fenótipo não citopático num certo percentual das células, foi utilizado como um controle positivo.

Como se pode observar nas Figuras 10 e 12, os mutantes SFV-SF2A e SFV-PD exibem um fenótipo que foi muito similar ao do vector SFV selvagem, induzindo um forte efeito citopático nas células transfectadas, que foi traduzido no surgimento de uma série de corpos apoptóticos a partir do dia 3 e uma ausência quase total de expressão após longos períodos (sete dias). Os dados relativos à natureza citopática do vector SFV-PD são adicionalmente sustentados por resultados publicados posteriormente pelo próprio K. Lundström, em que se demonstra como a expressão de β -gal ou GFP em células BHK infectadas com um vector de SFV-PD que conduz LacZ ou GFP como um gene marcador atinge o máximo após 48 horas para cair drasticamente em seguida nos três a quatro dias seguintes (20, vide Figura 2 desta referência). SFV-SF2C mutante exibiu um fenótipo um pouco menos citopático, mas muitos corpos apoptóticos aparecem no dia 3

e, embora aparentemente existam altos níveis de expressão no dia 4, isso desaparece quase completamente no dia 7, o que indica que este mutante provavelmente permite expressões um pouco mais prolongadas que o vector selvagem, mas sem deixar de ser citopático. O vector SFV-S2 é o único vector que não causa o surgimento de corpos apoptóticos e que permite a manutenção da expressão por pelo menos sete dias, gerando o surgimento de colónias. O vector SFV-S2-9 que carrega as mutações P718T e R649H foi seleccionado a partir de uma das colónias obtidas com SFV-S2 quando o gene LacZ foi substituído pelo gene pac no mencionado vector. A Figura 14 inclui fotos de células transfectadas com vector RNA SFV-S2-9-LacZ e manchada em diferentes momentos com X-gal. O vector S2-9 não produziu efeito citopático nas células transfectadas, que também puderam dividir-se.

EXEMPLO 9

Obtenção de linhagens de células estáveis produtoras de cardiotrofina 1 utilizando o vector SFV-S2-9

Foram gerados plasmídeos por meio da introdução do gene cardiotrofina de rato (rCT) em pSFV-S2-9-pac em dois ambientes diferentes e utilizados para gerar linhagens celulares que expressam rCT. Tanto a expressão de rCT quanto a estabilidade da expressão de rCT foram analisadas com o propósito de identificar linhagens de células estáveis que expressam rCT.

9.1 Construção do plasmídeo

Para o propósito de geração de linhagens celulares que expressam cardiotrofina, foram gerados plasmídeos com base

em SFV-S2-9-pac por meio da introdução do gene cardiotrofina de rato (rCT) conforme duas realizações diferentes:

- plasmídeo pSFV-S2-9-rCT-pac, em que os genes pac e rCT são colocados a jusante de promotores subgenômicos independentes (Figura 15A); e
- plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-rCT, contruído conforme a estrutura geral descrita na Figura 8B, que contém o gene pac e o gene rCT fundidos a jusante de um único promotor subgenômico (Figura 15A); nesta realização, a sequência de autoprotease FMDV 2A (SEQ ID N° 14) (35) foi introduzida entre os dois genes para permitir a liberação da cardiotrofina da proteína de fusão (Figura 15A).

Para construir o plasmídeo pSFV-S2-9-rCT-pac, o vector de clonagem pSFV-S2-9-mcs-pac, que contém a replicase SFV-S2-9, um primeiro promotor subgenômico seguido por um local de clonagem múltipla e um segundo promotor subgenômico seguido pelo gene pac foram gerados anteriormente.

Resumidamente, os oligonucleotídeos SEQ ID N° 15 e SEQ ID N° 16 foram hibridizados, gerando um fragmento de DNA sintético com extremidades 5' protuberantes compatíveis com BamHI e cuja sequência contém um local de clonagem múltipla com alvos para enzimas AvrII, ApaI, NruI e BstBI, três códons de término de tradução nas três possíveis etapas de leitura e a sequência promotora subgenômica SFV. Este fragmento foi clonado no local BamH I de pSFV-S2-9-pac, sendo gerado o plasmídeo pSFV-S2-9-mcs-pac.

Numa segunda etapa, um fragmento de PCR com 645 bp que contém o gene de cardiotrofina de rato foi sintetizado a partir do plasmídeo pRSET-rCT (36), utilizando os oligonucleotídeos SEQ ID N° 17 e SEQ ID N° 18 em hibridização com o início e o fim do gene rCT, respectivamente, e contendo locais BamH I nas extremidades para facilitar a clonagem. O fragmento de PCR foi digerido com BamH I e foi clonado no local BamH I de pSFV-S2-9-mcs-pac, sendo obtido o plasmídeo pSFV-S2-9-rCT-pac. De forma similar, o mesmo fragmento de PCR foi clonado em pSFV-1 digerido com BamH I, sendo gerado o plasmídeo pSFV-rCT.

Para construir o plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-rCT, o vector de clonagem pSFV-S2-9-pac2A, que contém a sequência de vector SFV-S2-9-pac na qual o gene pac é fundido em fase na sua extremidade 3' com a sequência de nucleotídeos que codifica a autoprotease FMDV 2A (35), que contém na extremidade dessa sequência o local de clonagem SmaI/XmaI, foi gerado anteriormente. Resumidamente, utilizando o plasmídeo pSFV-S2-9-pac como molde, foi conduzido um cruzamento de PCR com os oligonucleotídeos externos: SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20 e os oligonucleotídeos internos: SEQ ID N° 21 e SEQ ID N° 22, gerando um fragmento de DNA com 842 bp que foi digerido com BamH I e Xma I e clonado em pSFV-S2-9-pac digerido com as mesmas enzimas, de forma a obter o plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A. O PCR cruzado foi conduzido para o propósito duplo de introduzir a sequência 2A-XmaI na extremidade 3' do gene pac, eliminando-se simultaneamente um local XmaI presente no interior daquele gene.

Por fim, para gerar o plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-rCT, um fragmento de PCR com 645 bp que contém o gene

cardiotrofina de rato do plasmídeo pRSET-rCT (36), utilizando os oligonucleotídeos SEQ ID N° 23 e SEQ ID N° 24 em hibridização com o início e o fim do gene rCT, respectivamente, e contendo locais Xma I nas extremidades para facilitar a clonagem. O fragmento de PCR foi digerido com Xma I e foi clonado no local Xma I de pSFV-S2-9-pac2A, obtendo o plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-rCT.

9.2 Obtenção de linhagens de células estáveis produzindo cardiotrofina e análise da expressão de cardiotrofina

O RNA de cada plasmídeo sintetizado *in vitro* (capítulo 9.1) foi electroporado em células BHK-21. Vinte e quatro horas após a electroporação, adicionou-se puromicina a 5 µg/ml e, quando as células seleccionadas atingiram confluência, a expressão de cardiotrofina foi analisada nos lisatos celulares por meio de imuno-manchas com um anticorpo específico para cardiotrofina (Figura 15B).

Para as experiências de análise por meio de imuno-manchas, os lisatos das células BHK-21 transfectadas com os vectores SFV foram obtidos por meio de incubação num tampão que contém 1% Igepal (Sigma, Estados Unidos), 50 mM de Tris HCl, pH 7,6, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA e PMSF a 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) e foram clarificados por meio de centrifugação por seis minutos a 6000 rpm num micro-centrifugador refrigerado e quantificados por meio de análise Bradford. Os lisatos foram analisados por meio de SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12%, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com um antissoro policlonal contra cardiotrofina murina CT-1 (R&D Systems) ou actina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) como anticorpos primários, respectivamente. Utilizou-se um

antissoro de cabra ou carneiro específico para imunoglobulinas de rato ou coelho, respectivamente, conjugado com HRP como anticorpo secundário. As proteínas foram observadas utilizando Reagente de Quimioluminescência Western Lightning Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante. Para quantificar os níveis de rCT, diferentes quantidades dos lisatos das células que expressam rCT foram analisadas por meio de imuno-manchas e comparadas com quantidades conhecidas de cardiotrofina recombinante, utilizando o programa Imagequant TL (Amersham) com este propósito.

Os níveis de expressão de cardiotrofina nas linhagens geradas com cada um dos vetores foram similares aos obtidos em células electroporadas com RNA vector com a replicase SFV-rCT selvagem (Figura 15B). A expressão de rCT nas linhagens seleccionadas foi de cerca de 4,3 pg/célula. Nas linhagens geradas com o vector SFV-S2-9-pac2A-rCT, observou-se que a maior parte do rCT havia sido liberada da proteína de fusão, embora houvesse uma fracção não digerida que também foi detectada por meio de imuno-manchas.

Para analisar a estabilidade desses vetores nas células transfectadas, foram conduzidas dez passagens sucessivas das células que os contêm na presença de puomicina por um período de cerca de vinte dias e a expressão de rCT em cada passagem em lisatos celulares foi determinada por meio de imuno-manchas. No caso de linhagens celulares geradas com o vector SFV-S2-9-rCT-pac, observou-se que a expressão foi mantida até a passagem 5, a partir da qual começou a cair drasticamente até virtualmente desaparecer na passagem 11 (Figura 16). Esta perda de estabilidade, entretanto, não ocorreu nas linhagens que

contêm o vector SFV-S2-9-pac2A-rCT, no qual a expressão permaneceu constante por pelo menos dez passagens (Figura 17), o que indica a fusão em fase do transgene (gene rCT) em que o gene pac que utiliza a sequência de nucleotídeos que codifica a autoprotease FMDV 2A permite aumento considerável da estabilidade da expressão de proteína heteróloga nas linhagens geradas a partir do vector SFV-S2-9.

EXEMPLO 10

Obtenção de linhagens de células estáveis produtoras de factor de crescimento similar a insulina humano (IGF-I) utilizando o vector SFV-S2-9

Foram gerados plasmídeos por meio da introdução do gene de crescimento similar a insulina humano (IGF-I) em pSFV-S2-9-pac em dois ambientes diferentes e foram utilizados para gerar linhagens celulares que expressam IGF-I. Tanto a expressão de IGF-I quanto a estabilidade da expressão de IGF-I foram analisadas com o propósito de identificar linhagens de células estáveis que expressam IGF-I.

10.1 Construção do plasmídeo

Para o propósito de geração de linhagens celulares que expressam IGF-I, foram gerados plasmídeos com base em SFV-S2-9-pac por meio da introdução do gene IGF-I conforme duas realizações diferentes:

- plasmídeo pSFV-S2-9-IGF-pac, no qual os genes pac e IGF-I são colocados a jusante de promotores

subgenômicos independentes (Figura 18); nesse plasmídeo, o gene IGF-I foi fundido com o amplificador de tradução de capsídeos SFV utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease FMDV 2A como um ligante, pois esta estratégia permitiu o aumento considerável dos níveis de expressão de proteína heteróloga no vector SFV selvagem (37); e

- plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-IGF, construído conforme a estrutura geral descrita na Figura 8B, que contém o gene pac e o gene IGF-I fundidos a jusante de um único promotor subgenômico (Figura 18); nesta forma de realização, a sequência de nucleotídeos que codifica autoprotease FMDV 2A (SEQ ID N° 14) (35) foi introduzida entre os dois genes para permitir a liberação da cardiotrofina da proteína de fusão (Figura 18).

Para construir o plasmídeo pSFV-S2-9-IGF-pac, o plasmídeo pSFVb12A-IGF-IB (38) foi digerido com BglIII+Klenow e SpeI, obtendo um fragmento de 2,3 kb que foi ligado ao fragmento de 11,1 kb obtido a partir de pSFV-S2-9-pac digerido com BsmI+T4pol e SpeI. O plasmídeo pSFVb12A-IGF-IB contém a sequência precursora de IGF-I humana (IGF-IB) fundida na sua extremidade 5' com um conjunto que compreende a sequência que codifica os 34 primeiros aminoácidos do capsídeo SFV (amplificador de tradução mínimo ou "b1") seguido pela sequência de nucleotídeos que codifica a autoprotease de FMDV 2A. IGF-IB precursor codifica uma preparação com 195 aminoácidos que inclui os domínios II, B, C, A, D, D, E, Ea, Eb e 6 do gene IGF-I. Esta proteína prévia é processada até a forma madura de IGF-I que é secretada, perdendo os domínios aminoterminais

II e os domínios carboxiterminais E, Ea, Eb e 6 (39).

Para construir o plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-IGF, o plasmídeo pSFVb12A-IGF-I (38) foi digerido com XmaI, obtendo um fragmento com 0,59 kb que contém sequência IGF-IB que foi ligada com pSFV-S2-9-pac2A (cujas características e forma de obtenção são descritas no Exemplo 9.1, com relação à construção do plasmídeo pSFV-S2-9-pac2A-rCT) digerido anteriormente com XmaI. Os clones foram seleccionados em seguida, nos quais o fragmento de 0,59 kb havia sido introduzido na orientação correcta.

10.2 Obtenção de linhagens de células estáveis produtoras de IGF-I e análise da expressão de IGF-I

O RNA de cada plasmídeo foi sintetizado *in vitro* (capítulo 10.1) e electroporado nas células BHK-21. Vinte e quatro horas após a electroporação, adicionou-se puromicina a 5 µg/ml e, quando as células seleccionadas atingiram a confluência, a expressão de IGF-I foi analisada nos sobrenadantes celulares recolhidos em momentos diferentes por meio de ELISA específico para IGF-I humano (Figura 19).

A expressão de IGF-I foi analisada em sobrenadantes celulares utilizando um kit ELISA específico para a medição de IGF-I humano livre (IGF-I livre, ref. DSL-10-9400, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, Estados Unidos). Para cada uma das passagens analisadas, foram semeadas 5×10^5 células por cavidade, houve uma espera de quatro horas para que as células se aderissem e o meio foi alterado adicionando-se 1 ml de meio Glasgow-MEM com soro de feto bovino a 5% (37) e puromicina a 5 µg/ml. O sobrenadante foi recolhido após 24, 48 ou 72 horas,

centrifugado a 6000 rpm por cinco minutos num micro-centrifugador refrigerado para eliminar resíduos celulares e congelado a -80°C até a análise. Para o propósito de controle da quantidade de células presentes em cada amostra, células BHK foram recolhidas das mesmas cavidades em que os sobrenadantes haviam sido recolhidos e lisadas por meio de incubação num tampão que contém 1% Igepal (Sigma, Estados Unidos), 50 mM Tris HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA e 1 $\mu\text{g/ml}$ PMSF (Sigma, St. Louis, Estados Unidos), foram clarificados por meio de centrifugação a 6000 rpm num micro-centrifugador refrigerado e quantificados por meio de análise Bradford. Os valores da quantidade de proteína obtida por Bradford foram muito similares em todas as amostras analisadas.

Os resultados obtidos com relação à expressão de IGF-I nos sobrenadantes celulares recolhidos demonstraram que, depois de horas, os níveis de expressão de IGF-I no sobrenadante das linhagens geradas com cada um dos vectores não citopáticos foram apenas 1,5 a 2 vezes mais baixos que os obtidos em células electroporadas com RNA do vector selvagem SFV-IGF-I (Figura 19). Esta expressão foi um pouco maior na linhagem obtida com o vector SFV-S2-9-pac2A-IGF (34,5 pg/célula) com relação à expressão na linhagem seleccionada com SFV-S2-9-IGF-pac (21,3 pg/célula). A análise da expressão de IGF-I em sobrenadantes tomada em tempos mais longos demonstrou que IGF-I pode ser acumulado até no máximo 67 e 34 pg/célula em vectores SFV-S2-9-pac2A-IGF e SFV-S2-9-IGF-pac, respectivamente. Estes resultados demonstram que IGF-I está sendo secretado para o meio extracelular, que está indicando um processamento correcto de poliproteína.

Para analisar a estabilidade desses vectores nas células transfectadas, foram conduzidas dez passagens sucessivas das células que os contêm na presença de puromicina por um período de cerca de vinte dias e a expressão de IGF-I em sobrenadantes celulares recolhidos em 24 horas após cada uma das passagens foi determinada por meio de ELISA específico para IGF-I humano. No caso das linhagens geradas com vector SFV-S2-9-IGF-pac, observou-se que a expressão foi mantida até a passagem 4, a partir da qual começou a cair drasticamente, atingindo níveis que eram oitenta vezes menores na passagem 10 (Figura 20). Esta perda de estabilidade não ocorreu tão notadamente nas linhagens que contêm o vector SFV-S2-9-pac2A-IGF, no qual a expressão permaneceu quase constante, caindo quatro vezes entre as passagens 1 e 10 (Figura 20). Este resultado confirma que a fusão em fase do transgene com o gene pac utilizando a sequência de nucleotídeos que codifica a autoprotease FMDV 2A permite aumento considerável da estabilidade da expressão de proteína heteróloga nas linhagens geradas com o vector SFV-S2-9.

LITERATURA

1. Agapov, E. V., I. Frolov, B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, S. Schlesinger e C. M. Rice. 1998. *Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 12989-94.
2. Berglund, P., M. Sjoberg, H. Garoff, G. J. Atkins, B. J. Sheahan e P. Liljeström. 1993. *Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. Biotechnology (NY)* 11: 916-20.

3. Berglund, P., C. Smerdou, M. N. Fleeton, I. Tubulekas e P. Liljeström. 1998. *Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines*. *Nat. Biotechnol.* 16: 562-5.
4. Bredenbeek, P. J., I. Frolov, C. M. Rice e S. Schlesinger. 1993. *Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs*. *J. Virol.* 67: 6439-46.
5. de la Luna, S. I. Soria, D. Pulido, J. Ortin e A. Jimenez. 1998. *Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker*. *Gene* 62: 121-6.
6. Fazakerley, J. K., A. Boyd, M. L., Mikkola e L. Kaariainen. 2002. *A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsp2 protein affects the neurovirulence of Semliki forest virus*. *J. Virol.* 76: 392-6.
7. Frolov, I., E. Agapov, T. A. Hoffman, Jr., B. M. Pragai, M. Lipka, S. Schlesinger e C. M. Rice. 1999. *Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells*. *J. Virol.* 73: 3854-65.
8. Frolov, I., E. Frolova e S. Schlesinger. 1997. *Sindbis virus replicons and Sindbis virus: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA*. *J. Virol.* 71: 2819-29.
9. Frolov, I. e S. Schlesinger. 1994. *Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK*

cells. *J. Virol.* 68: 1721-7.

10. Frolov, I. e S. Schlesinger. 1994. *Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon.* *J. Virol.* 68: 8111-7.

11. Frolova, E. I., R. Z. Fayzulin, S. H. Cook, D. E. Griffin, C. M. Rice e I. Frolov. 2002. *Roles of nonstructural protein nsP2 and alfa/beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection.* *J. Virol.* 76: 11254-64.

12. Garmashova, N., R. Gorchakov, E. Frolova e I. Frolov. 2006. *Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription.* *J. Virol.* 80: 5686-96.

13. Glasgow, G. M., M. M. McGee, B. J. Sheahan e G. J. Atkins. 1997. *Death mechanisms in cultured cells infected by Semliki Forest virus.* *J. Gen. Virol.* 78: (Pt: 7): 1559-63.

14. Glasgow, G. M., M. M. McGee, C. J. Tarbatt, D. A. Mooney, B. J. Sheahan e G. J. Atkins. 1998. *The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis.* *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 10): 2405-10.

15. McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson e P. Liljeström. 2005. *Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation.* *Mol. Biol. Cell.* 16: 3753-63.

16. Kujala, P. M. Rikkinen, T. Ahola. M. Kelve, M. Saarna e L. Kaariainen. 1997. *Monoclonal antibodies specific for*

Semliki Forest virus replicase protein nsP2. J. Gen. Virol. 78 (Pt: 2): 343-51.

17. Liljeström, P. e H. Garoff. 1994. *Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors*, pág. 16.20.11-16.20.16. Em: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman e K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 2. Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, Nova Iorque, NY.

18. Liljeström, P. e H. Garoff. 1991. *A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. Biotechnology (NY)* 9: 1356-61.

19. Lundström, K. 2003. *Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. Expert Rev. Vaccines* 2: 447-59.

20. Lundström, K., A. Abenavoli, A. Malgaroli e M. U. Ehrenguber. 2003. *Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. Mol. Ther.* 7: 202-9.

21. Lundström, K., D. Rotmann, D. Hermann, E. M. Schneider e M. U. Ehrenguber. 2001. *Novel mutant Semliki Forest virus vectors: gene expression and localization studies in neuronal cells. Histochem. Cell. Biol.* 115: 83-91.

22. Perri, S., D. A. Driver, J. P. Gardner, S. Scherrill, B. A. Belli, T. W. Dubensky, Jr. e J. M. Polo. 2000. *Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki*

Forest virus that establish persistent replication in host cells. J. Virol. 74: 9802-7.

23. Petrakova, O., E. Volkova, R. Gorchakov, S. Paessler, R. M. Kinney e I. Frolov. 2005. *Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in mammalian cells. J. Virol. 79: 7597-608.*

24. Polo, J. M., B. A. Belli, D. A. Driver, I. Frolov, S. Sherrill, M. J. Hariharan, K. Townsend, S. Perry, S. J. Mento, D. J. Jolly, S. M. Chang, S. Schlesinger e T. W. Dubensky, Jr. 1999. *Stable alphavirus packaging cells lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 4598-603.*

25. Pushko, P., M. Parker, G. V. Ludwig, N. L. Davis, R. E. Johnston e J. F. Smith. 1997. *Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro an immunization against heterologous pathogens in vivo. Virology 239: 398-401.*

26. Rayner, J. O., S. A. Dryga e K. I. Kamrud. 2002. *Alphavirus vectors and vaccination. Rev. Med. Virol. 12: 279-96.*

27. Rikkonen, M. 1996. *Functional significance of the nuclear-targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. Virology 218: 352-61.*

28. Sjoberg, E. M., M. Suomalainen e H. Garoff. 1994. *A significantly improved Semliki Forest virus expression*

system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. Biotechnology (NY) 12: 1127-31.

29. Smerdou, C. e P. Liljeström. 1999. *Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. J. Virol. 73: 1092-8.*

30. Strauss, J. H. e E. G. Strauss. 1994. *The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiol. Rev. 58: 491-562.*

31. Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco e M. Esteban. 2006. *Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. Genes Dev. 20: 87-100.*

32. White, C. L., M. Thomson e N. J. Dimmock. 1998. *Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. J. Virol. 72: 4320-6.*

33. Wurm, F. e A. Bernard. 1999. *Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 156-9.*

34. Xiong, C., R. Levis, P. Shen, S. Schlesinger, C. M. Rice e H. V. Huang. 1989. *Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. Science 243: 1188-91.*

35. Ryan, M. D. e J. Drew. *Foot-and-mouth disease virus 2A*

oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. EMBO J. 1994.13:928-33.

36. Iñiguez M., C. Berasain, E. Martinez-Anso, M. Bustos, P. Fortes, D. Pennica, M. A. Ávila e J. Prieto. 2006 *Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. J. Exp. Med. 203:2809-15.*

37. Rodriguez-Madoz J. R., Prieto J. e Smerdou C. 2005. *Semliki Forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas. Molecular Therapy. 12, 153-163.*

38. Palencia, B. 2005 (junho). *Bioproducción de IGF-I.* Tese de Doutorado. Universidade de Navarra.

39. Lund P. K. 1994. *Insulin-like growth factor I: molecular biology and relevance to tissue-specific expression and action. Recent Prog. Horm. Res. 49:125-48.*

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.

<120> VECTOR VIRAL E SUAS APLICAÇÕES

<130> P3499PC00

<140> ES P200603036

<141> 2006-11-28

<140> ES P200700882

<141> 2007-04-07

<160> 24

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 7382

<212> DNA

<213> Vírus da floresta de Semliki

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(86)

<223> Extremidade 5' UTR não traduzida que inclui as
sequências necessárias para reprodução

<220>

<221> misc_feature

<222> (87)..(89)

<223> Trio de início de tradução de replicase

<220>

<221> misc_feature

<222> (3642)..(3644)

<223> Trio correspondente à mutação R649H

<220>

<221> misc_feature

<222> (3849)..(3851)

<223> Trio correspondente à mutação P718T

<220>

<221> misc_feature

<222> (7351)..(7374)

<223> Promotor subgenômico viral sobreposto

<220>

<221> misc_feature

<222> (7380)..(7382)

<223> Trio de término de tradução de replicase

<400> 1

gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagattttg ttccagctcc
gccacctcc 60

gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgccaagt gcatgttgat
attgaggctg 120

acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcgaggtg
gagtcattgc 180

aggtcacacc aaatgaccat gcaaagcca gagcattttc gcacctggct
accaaattga 240

tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttggatat cggcagtgcg
ccttccagga 300

gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgccctat gcgcagcgca
gaagaccccg 360
aaaggctcga tagctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaaggtg
ctggatagag 420

agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac
gctgaatctc 480

ctaccttttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg
gccgtatacc 540

aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg
aaagggtgtca 600

gaacggcgta ttggattggg tttgacacca ccccgtttat gtttgacgcg
ctagcaggcg 660

cgtatccaac ctacgccaca aactgggccg acgagcaggt gttacaggcc
aggaacatag 720

gactgtgtgc agcatccttg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt
ctccgcaaga 780

agcaattgaa accttgcgac acagtcatgt tctcggtagg atctacattg
tactactgaga 840

gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa
ggtaaacaat 900

cctttacctg taggtgcat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt
aagaaaatca 960

ctatgtgcc cggcctgtac ggtaaacgg tagggtagc cgtgacgtat
cacgcggagg 1020

gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaggaga aagagtctca
ttccctgtat 1080

gcacctacgt cccctcaacc atctgtgatc aatgactgg catactagcg
accgacgtca 1140

caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt
gtgaacggaa 1200

gaacacagcg aaacactaac acgatgaaga actatctgct tccgattgtg
gccgtcgcat 1260

ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag accttgatga tgaaaaacct
ctgggtgtcc 1320

gagagaggtc acttacttgc tgctgcttgt gggcatttaa aacgaggaag
atgcacacca 1380

tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaaggtgcc ttcagagttt
aactcgttcg 1440

tcatcccgag cctatggtct acaggcctcg caatcccagt cagatcacgc
attaagatgc 1500

ttttggccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgtcg
tcagccaggg 1560

atgctgaaca agaggagaag gagaggttgg aggccgagct gactagagaa
gccttaccac 1620

ccctcgtccc catcgcgccg gcggagacgg gagtcgtcga cgtcgcggtt
gaagaactag 1680

agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgcag cgcggtgaaa
gtcaccgcac 1740

agccgaacga cgtactacta ggaaattacg tagttctgtc cccgcagacc
gtgctcaaga 1800

gtccaagtt ggccccctg caccctctag cagagcaggt gaaaataata
acacataacg 1860

ggagggccgg cggttaccag gtcgacggat atgacggcag ggtcctacta
ccatgtggat 1920

cggccattcc ggtccctgag tttcaagctt tgagcgagag cgccactatg
gtgtacaacg 1980

aaagggagtt cgtcaacagg aaactatacc atattgccgt tcacggaccg
tcgctgaaca 2040

ccgacgagga gaactacgag aaagtacagag ctgaaagaac tgacgccgag
tacgtgttcg 2100

acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg
ttggtgggag 2160

agctaacc aaacccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc
aggccgtcgg 2220

caccatataa gactacagta gtaggagtct ttggggttcc gggatcaggc
aagtctgcta 2280

ttattaagag cctcgtgacc aaacacgatc tggtcaccag cggcaagaag
gagaactgcc 2340

aggaaatagt taacgacgtg aagaagcacc gcgggaaggg gacaagtagg
gaaaacagtg 2400

actccatcct gctaaacggg tgtcgctcgtg ccgtggacat cctatatgtg
gacgaggctt 2460

tcgcttgcca ttccggtact ctgctggccc taattgctct tgttaaacct
cggagcaaag 2520

tgggtgttatg cggagacccc aagcaatgcg gattcttcaa tatgatgcag
cttaaggtga 2580

acttcaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tatatccaga
cgttgcacgc 2640

gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttgc actacggagg caagatgcgc
acgaccaacc 2700

cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag
ccaggagaca 2760

tcgtgttaac atgcttccga ggctgggcaa agcagctgca gttggactac
cgtggacacg 2820

aagtcatgac agcagcagca tctcagggcc tcacccgcaa aggggtatac
gccgtaaggc 2880

agaagtgtaa tgaaaatccc ttgtatgcc ctgcgtcggg gcacgtgaat
gtactgctga 2940

cgcgcactga ggataggctg gtgtggaaaa cgctggccgg cgatccctgg
attaaggtcc 3000

tatcaaacat tccacagggc aactttacgg ccacattgga agaatggcaa
gaagaacacg 3060

acaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgcgcctgt ggacgcgttc
cagaacaaag 3120

cgaacgtgtg ttgggcgaaa agcctgggtc ctgtcctgga cactgccgga
atcagattga 3180

cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct
tactctccag 3240

tggtggcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac
agtggcctgt 3300

tttctgcccc gaaggtgtcc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac
agacctgggtg 3360

gaaggatgta tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga
cataccttcc 3420

tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagttatcgc agaaagaaaa
atccaaccgc 3480

tttctgtgct ggacaatgta attcctatca accgcaggct gccgcacgcc
ctggtggctg 3540

agtacaagac ggttaaaggc agtagggttg agtggctggt caataaagta
agaggtacc 3600
acgtcctgct ggtgagtgag tacaacctgg ctttgectcg acacagggtc
acttggttgt 3660

caccgctgaa tgtcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga
ctgccggctg 3720

acgccggcag gttcgacttg gtctttgtga acattcacac ggaattcaga
atccaccact 3780

accagcagtg tgtcgaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat
gcgctacgac 3840

tgctaaaaac gggcggcatc ttgatgagag cttacggata cgccgataaa
atcagcgaag 3900

ccgttgtttc ctccctaagc agaaagttct cgtctgcaag agtggtgcgc
ccggattgtg 3960

tcaccagcaa tacagaagtg ttcttgctgt tctccaactt tgacaacgga
aagagaccct 4020

ctacgctaca ccagatgaat accaagctga gtgccgtgta tgccggagaa
gccatgcaca 4080

cggccgggtg tgcaccatcc tacagagtta agagagcaga catagccacg
tgcacagaag 4140

cggctgtggt taacgcagct aacgcccgtg gaactgtagg ggatggcgta
tgcagggccg 4200
tggcgaagaa atggccgtca gcctttaagg gagcagcaac accagtgggc
acaattaa 4260

cagtcatgtg cggctcgtac cccgtcatcc acgctgtagc gctaatttc
tctgccacga 4320

ctgaagcgga aggggaccgc gaattggccg ctgtctaccg ggcagtggcc
gccgaagtaa 4380

acagactgtc actgagcagc gtagccatcc cgctgctgtc cacaggagtg
ttcagcggcg 4440

gaagagatag gctgcagcaa tccctcaacc atctattcac agcaatggac
gccacggacg 4500

ctgacgtgac catctaactgc agagacaaaa gttgggagaa gaaaatccag
gaagccattg 4560

acatgaggac ggctgtggag ttgctcaatg atgacgtgga gctgaccaca
gacttgggtga 4620

gagtgcaccc ggacagcagc ctggtgggtc gtaagggcta cagtaccact
gacgggtcgc 4680

tgtactcgta ctttgaaggt acgaaattca accaggctgc tattgatatg
gcagagatac 4740

tgacgttgtg gccagactg caagaggcaa acgaacagat atgcctatac
gcgctgggcg 4800
aaacaatgga caacatcaga tccaaatgtc cggatgaacga ttccgattca
tcaacacctc 4860

ccaggacagt gccctgcctg tgccgctacg caatgacagc agaacggatc
gcccgctta 4920

ggtcacacca agttaaagc atggtgggtt gctcatcttt tcccctcccg
aaataccatg 4980

tagatggggg gcagaaggta aagtgcgaga aggttctcct gttcgacccg
acggtacctt 5040

cagtggttag tccgcggaag tatgccgcat ctacgacgga ccaactcagat
cggtcgttac 5100

gagggtttga cttggactgg accaccgact cgtcttccac tgccagcgat
accatgtcgc 5160

taccagttt gcagtcgtgt gacatcgact cgatctacga gccaatggct
cccatagtag 5220

tgacggctga cgtacaccct gaacccgcag gcatcgcgga cctggcggca
gatgtgcacc 5280

ctgaacccgc agaccatgtg gacctcgaga acccgattcc tccaccgcgc
ccgaagagag 5340

ctgcatacct tgcctcccgc gcggcggagc gaccggtgcc ggcgccgaga
aagccgacgc 5400

ctgcccgaag gactgcgttt aggaacaagc tgcctttgac gttcggcgcac
tttgacgagc 5460

acgaggtcga tgcgttggcc tccgggatta ctttcggaga cttcgacgac
gtcctgacgc 5520

taggccgcgc ggggtgcatat attttctcct cggacactgg cagcggacat
ttacaacaaa 5580

aatccgtag gcagcacaat ctccagtgcg cacaactgga tgcggtccag
gaggagaaaa 5640

tgtaccgcc aaaattggat actgagaggg agaagctggt gctgctgaaa
atgcagatgc 5700

accatcga ggctaataag agtcgatacc agtctcgcaa agtggagaac
atgaaagcca 5760

cggtggtgga caggctcaca tcgggggcca gattgtacac gggagcggac
gtaggccgca 5820

taccaacata cgcggttcgg tacccccgcc ccgtgtactc ccctaccgtg
atcgaaagat 5880

tctcaagccc cgatgtagca atcgcagcgt gcaacgaata cctatccaga
aattacccaa 5940

cagtggcgtc gtaccagata acagatgaat acgacgcata cttggacatg
gttgacgggt 6000

cggatagtgt cttggacaga gcgacattct gcccggcgaa gctccgggtgc
taccgaaac 6060

atcatgcgta ccaccagccg actgtacgca gtgccgtccc gtcacccttt
cagaacacac 6120

tacagaacgt gctagcggcc gccaccaaga gaaactgcaa cgtcacgcaa
atgcgagaac 6180

taccacat ggactcggca gtgttcaacg tggagtgttt caagcgtat
gcctgctccg 6240

gagaatattg ggaagaatat gctaaacaac ctatccggat aaccactgag
aacatcacta 6300

cctatgtgac caaattgaaa ggcccgaag ctgctgcctt gttcgctaag
accacaact 6360

tggttccgct gcaggagggt cccatggaca gattcacggt cgacatgaaa
cgagatgtca 6420

aagtcactcc agggacgaaa cacacagagg aaagacccaa agtccaggta
attcaagcag 6480

cggagccatt ggcgaccgct tacctgtgcg gcatccacag ggaattagta
aggagactaa 6540

atgctgtggtt acgccctaac gtgcacacat tgtttgatat gtcggccgaa
gactttgacg 6600

cgatcatcgc ctctcacttc caccaggag acccggttct agagacggac
attgcatcat 6660

tgcacaaaag ccaggacgac tccttggtc ttacaggttt aatgatcctc
gaagatctag 6720

gggtggatca gtacctgctg gacttgatcg aggcagcctt tggggaata
tccagctgtc 6780

acctaccaac tggcacgcgc ttcaagtctg gagctatgat gaaatcgggc
atgtttctga 6840

ctttgtttat taacactggt ttgaacatca ccatagcaag cagggtactg
gagcagagac 6900

tactgactc cgctgtgcg gccttcatcg gcgacgaaa catcgttcac
ggagtgatct 6960

ccgacaagct gatggcggag aggtgcgcgt cgtgggtcaa catggaggtg
aagatcattg 7020

acgctgtcat gggcgaaaaa ccccatatt tttgtggggg attcatagtt
tttgacagcg 7080

tcacacagac cgctgccgt gtttcagacc cacttaagcg cctgttcaag
ttgggtaagc 7140

cgctaacagc tgaagacaag caggacgaag acaggcgacg agcactgagt
gacgaggtta 7200

gcaagtggtt ccggacaggc ttgggggccc aactggaggt ggcactaaca
tctaggtatg 7260

aggtagaggg ctgcaaaagt atcctcatag ccatggccac cttggcgagg
gacattaagg 7320

cgtttaagaa attgagagga cctggtatac acctctacgg cggctctaga
ttggtgcggt 7380

aa 7382

<210> 2

<211> 841

<212> DNA

<213> Vírus da floresta de Semliki

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1)..(841)

<223> Extremidade 3 SFV não traduzida que inclui as
sequências necessárias para reprodução

<220>

<221> misc_feature

<222> (772)..(841)

<223> Extremidade de poliadeninas (Póli A)

<400> 2

attacatccc tacgcaaacg ttttacggcc gccggtggcg cccgcgcccg
gcgcccgtc 60

cttggccggt gcaggccact ccggtggctc ccgtcgtccc cgacttccag
gccagcaga 120

tgcagcaact catcagcgcc gtaaattgccc tgacaatgag acagaacgca
attgctcctg 180

ctaggcctcc caaaccaaag aagaagaaga caaccaaacc aaagccgaaa
acgcagccca 240

agaagatcaa cggaaaaacg cagcagcaaa agaagaaaga caagcaagcc
gacaagaaga 300

agaagaaacc cggaaaaaga gaaagaatgt gcatgaagat tgaaaatgac
tgtatcttcg 360

tatgctgcta gccacagtaa cgtagtgttt ccagacatgt cgggcaccgc
actatcatgg 420

gtgcagaaaa tctcgggtgg tctgggggcc ttcgcaatcg gcgctatcct
gggctggtt 480

gtggtcactt gcattgggct ccgcagataa gttagggtag gcaatggcat
tgatatagca 540

agaaaattga aaacagaaaa agttagggtta agcaatggca tataaccata
actgtataac 600

ttgtaacaaa gcgcaacaag acctgcgcaa ttggccccgt ggtccgcctc
acggaaactc 660

ggggcaactc atattgacac attaattggc aataattgga agcttacata
agcttaattc 720

gacgaataat tggatTTTTA TTTTATTTG caattgggtt ttaatatttc
caaaaaaaaa 780

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa 840

a 841

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer SF3669-VS

<400> 3

aatgtcacag ggcgccgatag g 21

<210> 4

<211> 21

<213> Artificial

<220>

<223> Primer SF4096-RS

<400> 4

ggtgcacacc cggccgtgtg c 21

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer mutS2-VS

<400> 5
gactgctaaa aacgggcggc agcctcttga tgagagc 37

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

<220>
<223> Primer mutS2-RS

<400> 6
aagaggctgc cgcccgtttt tagcagtcgt agcgcac 38

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

<220>
<223> Primer mutS3-VS

<400> 7
gactgctaaa atttggcggc agcctcttga tgagagc 37

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

<220>
<223> Primer mutS3-RS

<400> 8
aagaggctgc cgccaaattt tagcagtcgt agcgcac 38

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

<220>
<223> Primer SF1947-VS

<400> 9
cgggccctga gtttcaag 18

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

<220>
<223> Primer SF3623-S29-RS

<400> 10
agcacctatc ggcgcctgtg acattcagcg gtgacaacca agtgaccctg
tgtcgaggca 60

aagccagggt g 71

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

<220>

<223> Primer

<400> 11

tctcgcactt taccttctgc accccatcta catg

34

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 12

cacagacact gtcaaaggag aaagagtctc attcc

35

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 13

gaattctgtg tattaacgca c

21

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

<213> Aftovirus

<400> 14

aattttgacc ttcttaagct tgcgggagac gtcgagtcca accctgggcc c 51

<210> 15

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 15

gacctaggg ccctcgcgat tcgaataatt gattaattat acacctctac
ggcggctcta 60

gattggtgcg ttaatacaca gaattctgat tc 92

<210> 16

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 16

gacgaaatca gaattctgtg tattaacgca ccaatctagg accgccgtag
aggtgtataa 60

ttaatcaatt attcgaatcg cgagggccct ag 92

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 17

gggggatcct agcaccatga gccagagggga gggaag 36

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 18

gggggatcca catatgtcag gcaacgcccc ctgg 34

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 19

ttggcgaggg acattaaggc 20

<210> 20

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 20

cactggatat ctacccggg cccagggtg gactcgacgt ctcccgcaag
cttaagaagg 60

tcaaaattgg caccgggctt gcgggtcatg c 91

<210> 21

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 21

ggcgagggtg cgtacggccc gcgggacgtc gtcgcgggtg g 41

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 22

gccacccgcg acgacgtccc gcgggcccgtta cgcaccctcg 40

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 23

cgtatacgtta cccgggatga gccagaggga gggaag 36

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 24

cgtatacgtta cccgggtcag gcaacgcccc ctgg 34

Lisboa, de 19 de Novembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Vector viral que compreende uma réplica do vírus da floresta de Semliki (SFV), caracterizado por a mencionada réplica compreender (i) a sequência de nucleotídeos que codifica a enzima replicase SFV com mutações P718T e R649H na subunidade nsp2, (ii) um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção e (iii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse.

2. Vector viral de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2.

3. Vector viral de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender:

a. um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um produto heterólogo de interesse, cuja expressão é controlada por um primeiro promotor subgenômico de SFV (SG1); e

b. um polinucleotídeo que compreende um gene de selecção, cuja expressão é controlada por um segundo promotor subgenômico de SFV (SG2).

4. Vector viral de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os mencionados primeiro e segundo promotores subgenômicos SFV serem idênticos.

5. Vector viral de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os mencionados primeiro e segundo promotores subgenômicos SFV serem diferentes.

6. Vector viral de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender, a jusante de um promotor subgenômico, uma construção que compreende o polinucleotídeo compreendendo o gene de selecção e o polinucleotídeo compreendendo a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, fundidos em fase.

7. Vector viral de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o mencionado polinucleotídeo que compreende o gene de selecção ser fundido em fase com o polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse, por meio de um ligante polinucleotídeo.

8. Vector viral de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o mencionado ligante ser um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um local de divisão (auto)proteolítica pós-tradução.

9. Vector viral de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o mencionado ligante ser um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica uma (auto)protease que actua em cis entre as proteínas resultantes da tradução do gene de selecção e da sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse.

10. Vector viral de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a mencionada (auto)protease ser a autoprotease 2A do vírus da febre aftosa (FMDV).

11. Vector viral de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a extremidade 3' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção ser fundida em fase com a extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse.

12. Vector viral de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a extremidade 3' do polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica o produto heterólogo de interesse ser fundida em fase com a extremidade 5' do polinucleotídeo que compreende o gene de selecção.

13. Linhagem de células estáveis que pode expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse, caracterizada por ser uma linhagem celular transfectada com um vector viral de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12.

14. Método de geração *in vitro* de uma linhagem de células estáveis de acordo com a reivindicação 13 que pode expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse, caracterizado por compreender:

I. a transfecção de células com um vector viral de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12;

II. a selecção das células estáveis geradas na etapa I; e

III. a cultura e manutenção das células estáveis.

15. Método de produção *in vitro* de um produto heterólogo de interesse, caracterizado por compreender a cultura de uma linhagem de células estáveis de acordo com a reivindicação 13 em condições que permitam a expressão do produto heterólogo de interesse contido no vector viral utilizado para gerar a mencionada linhagem de células estáveis.

Lisboa, de 19 de Novembro de 2010

RESUMO

VECTOR VIRAL E SUAS APLICAÇÕES

A presente invenção refere-se a um vector viral que compreende uma réplica do vírus da floresta de Semliki (SFV), na sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade nsp2 da replicase SFV. O mencionado vector viral pode ser utilizado para a geração de linhagens celulares estáveis que podem expressar constitutivamente produtos heterólogos de interesse.

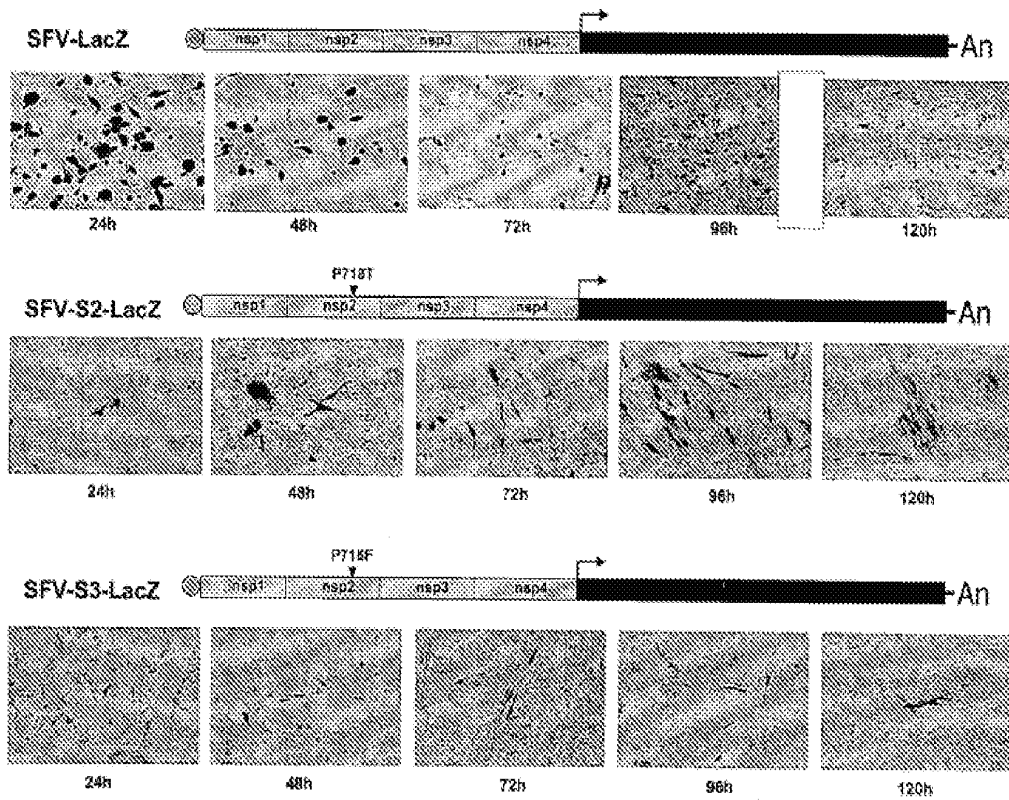


FIG 1

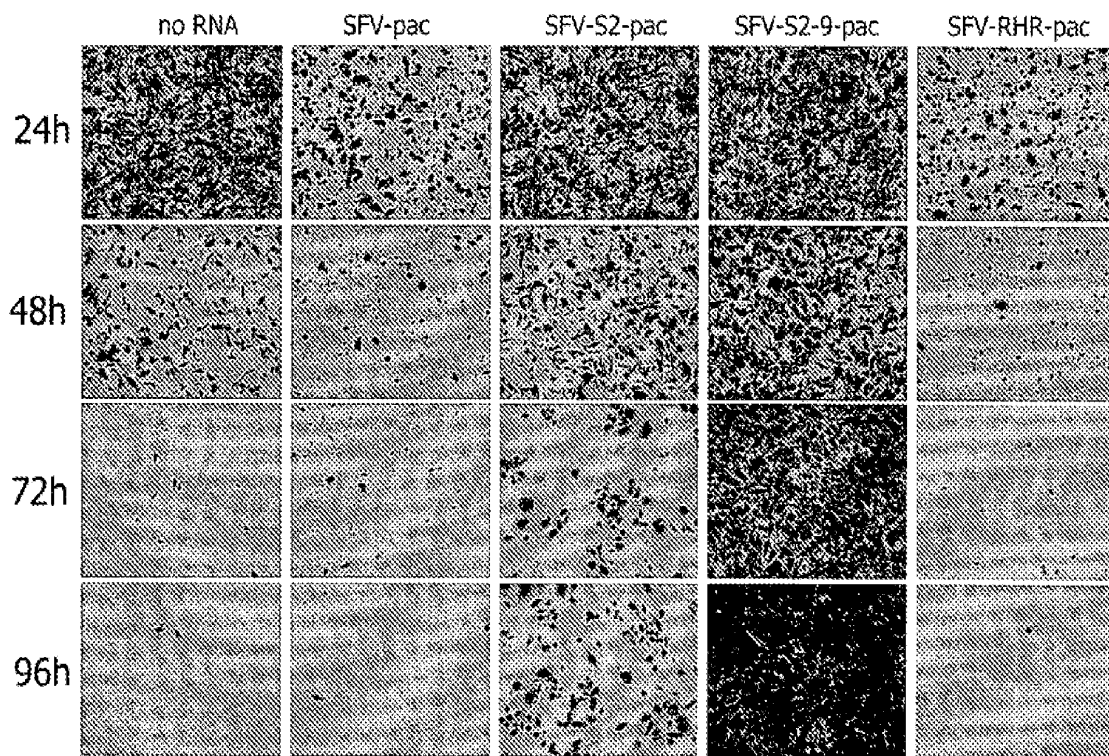


FIG 2

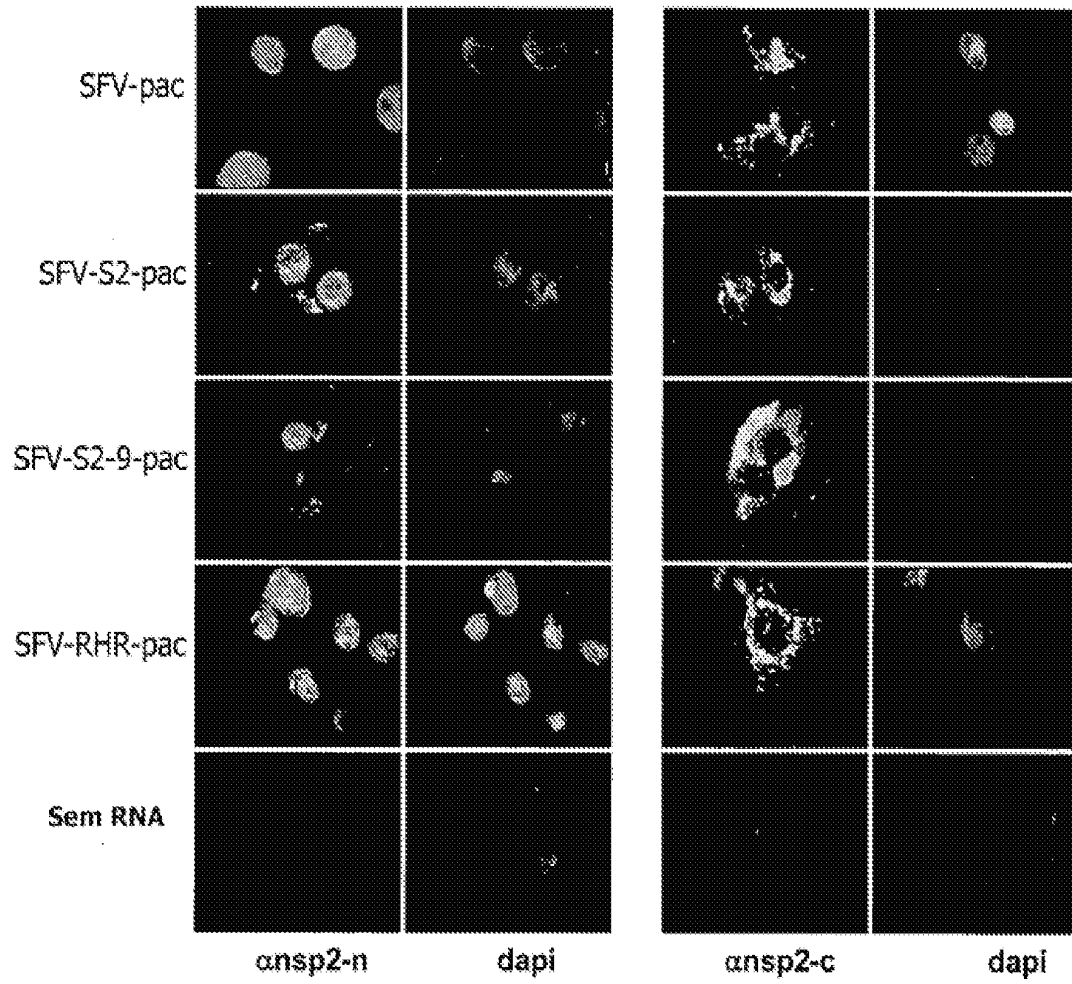


FIG 3

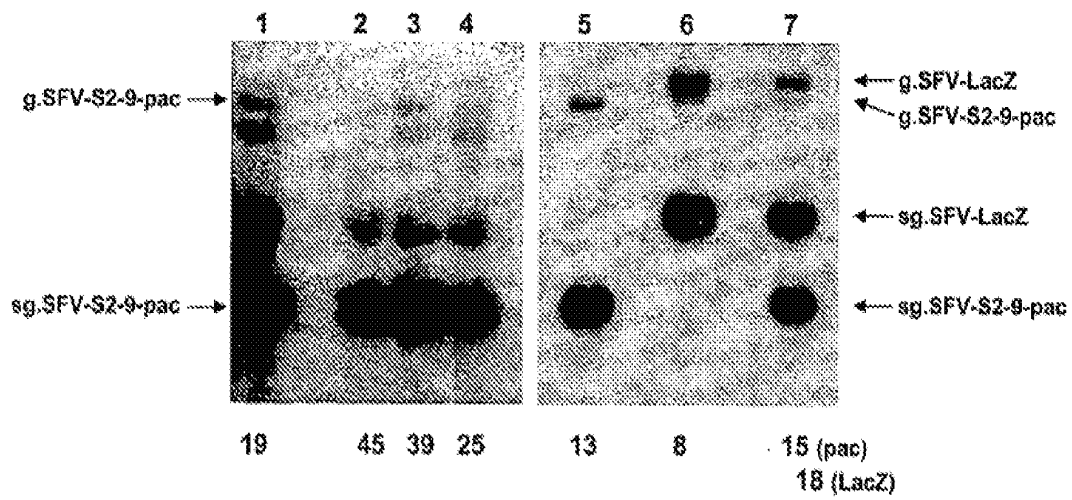


FIG 4

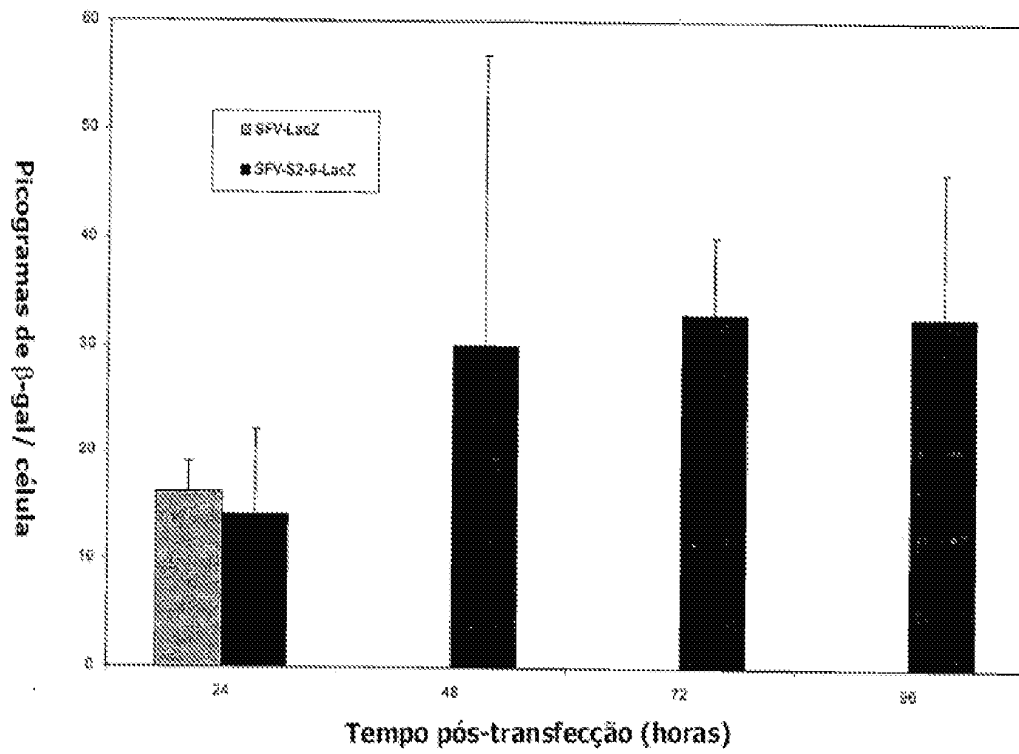


FIG 6

7/18

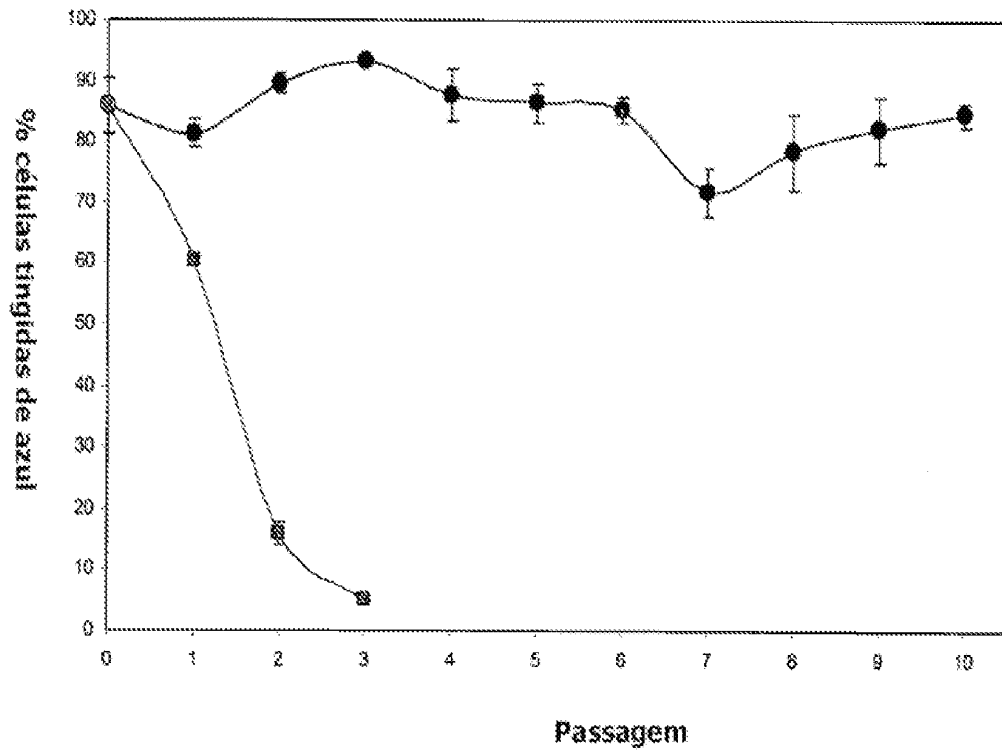


FIG 7

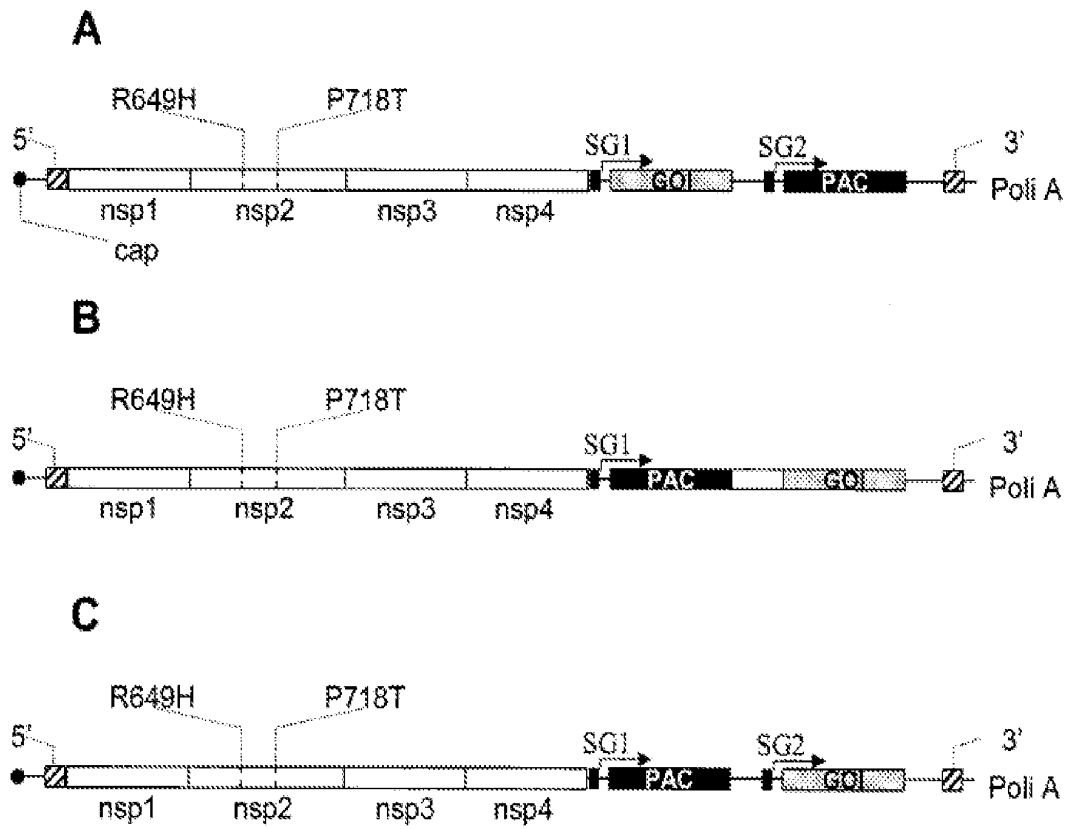


FIG 8

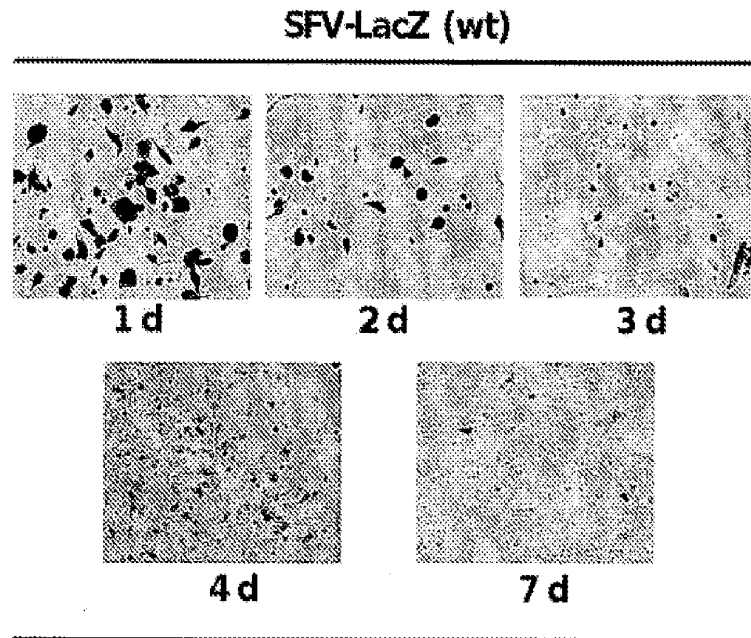


FIG 9

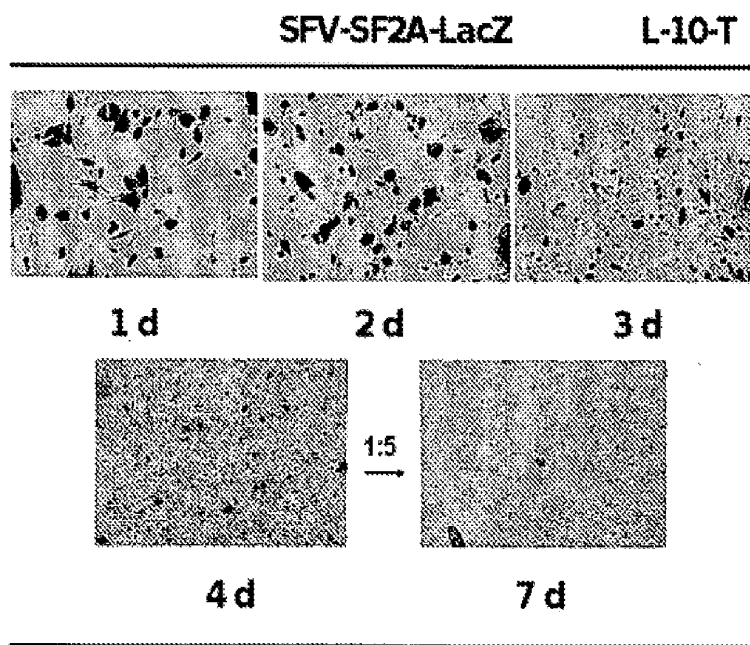


FIG 10

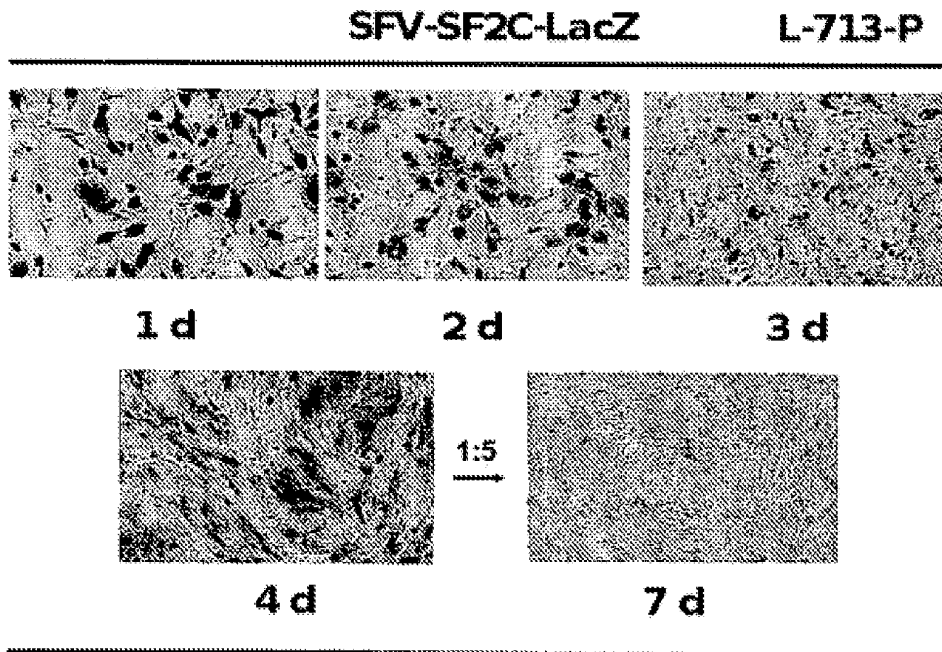


FIG 11

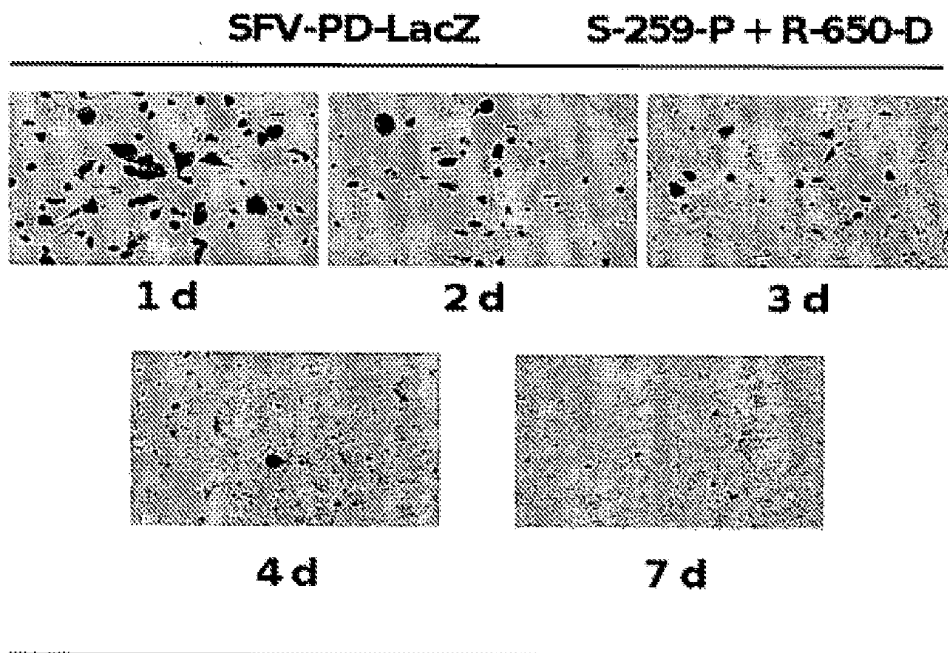
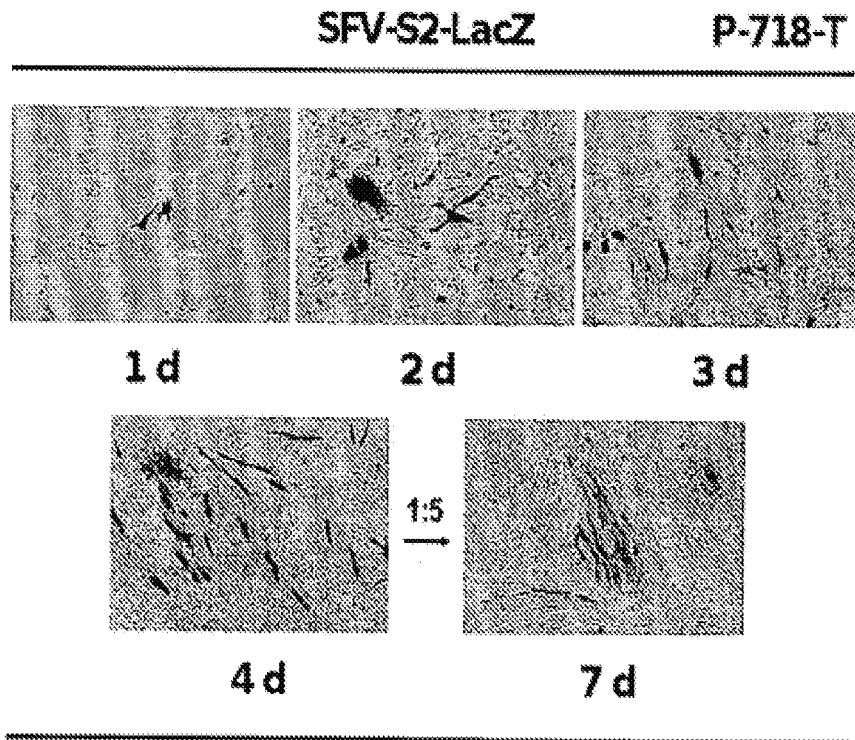


FIG 12



SFV-S2-LAC-Z. COLÓNIAS no dia 7 (passadas 1:5)

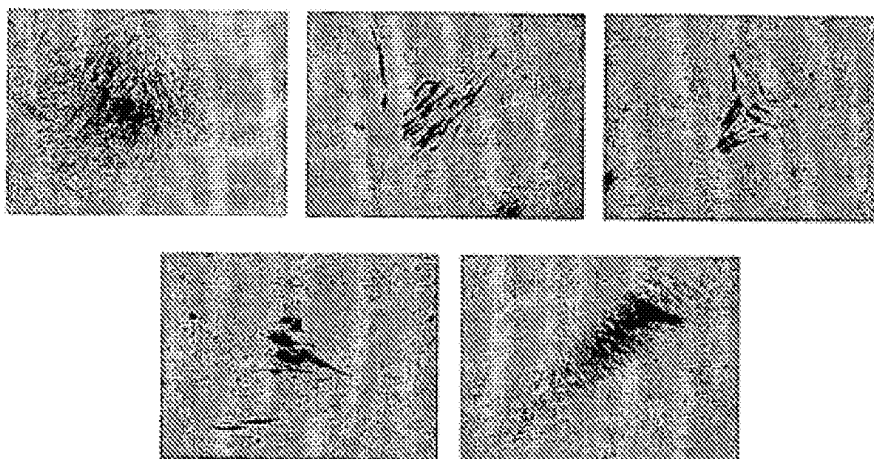


FIG 13

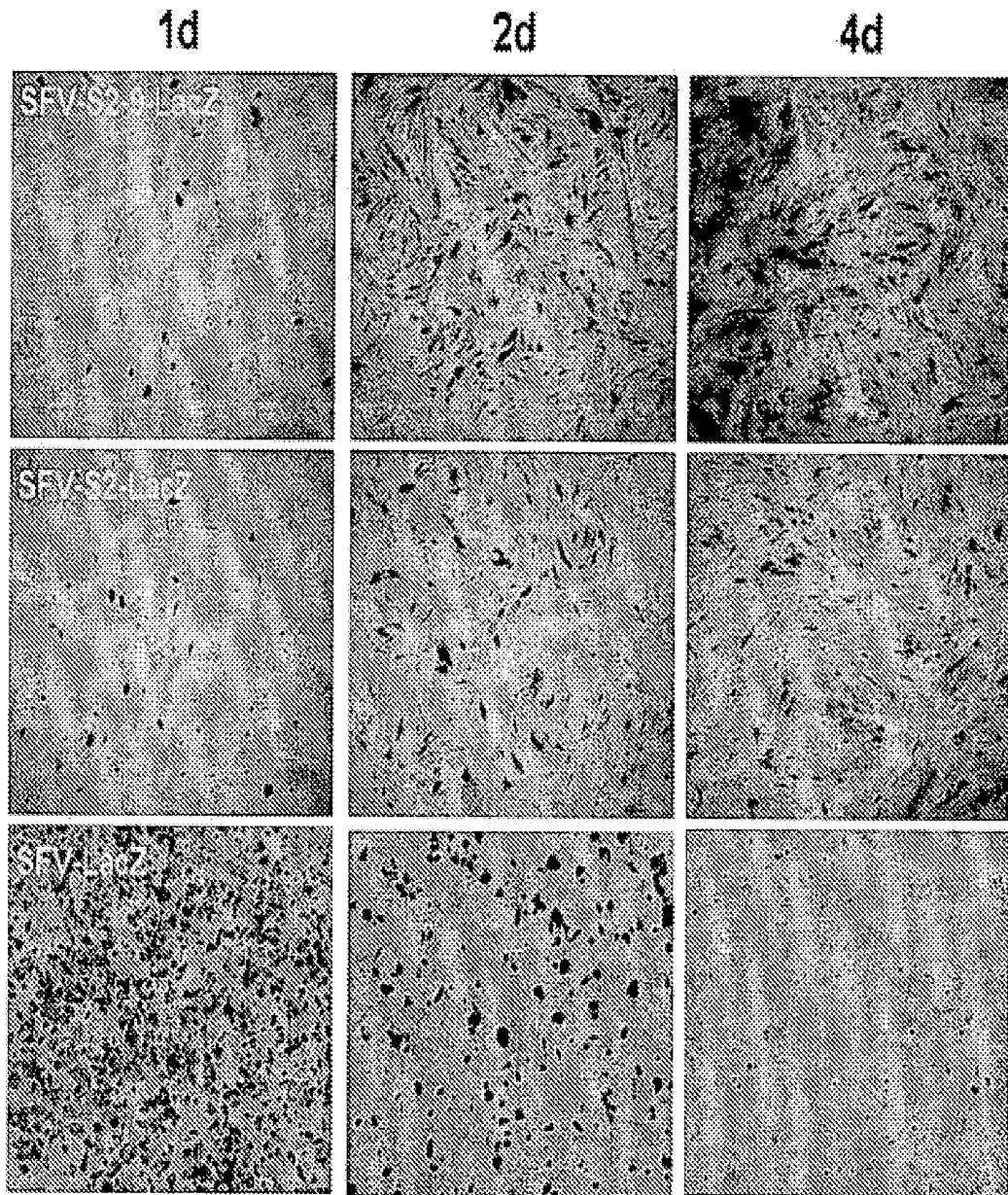


FIG 14

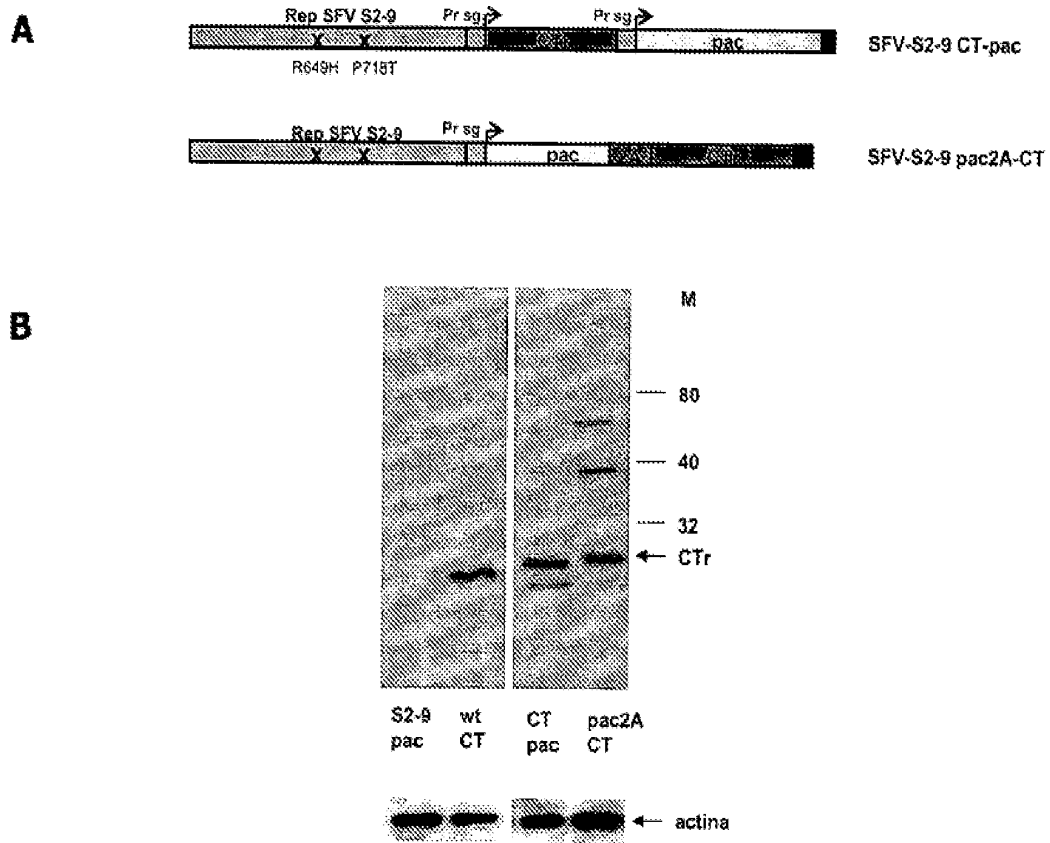


FIG 15

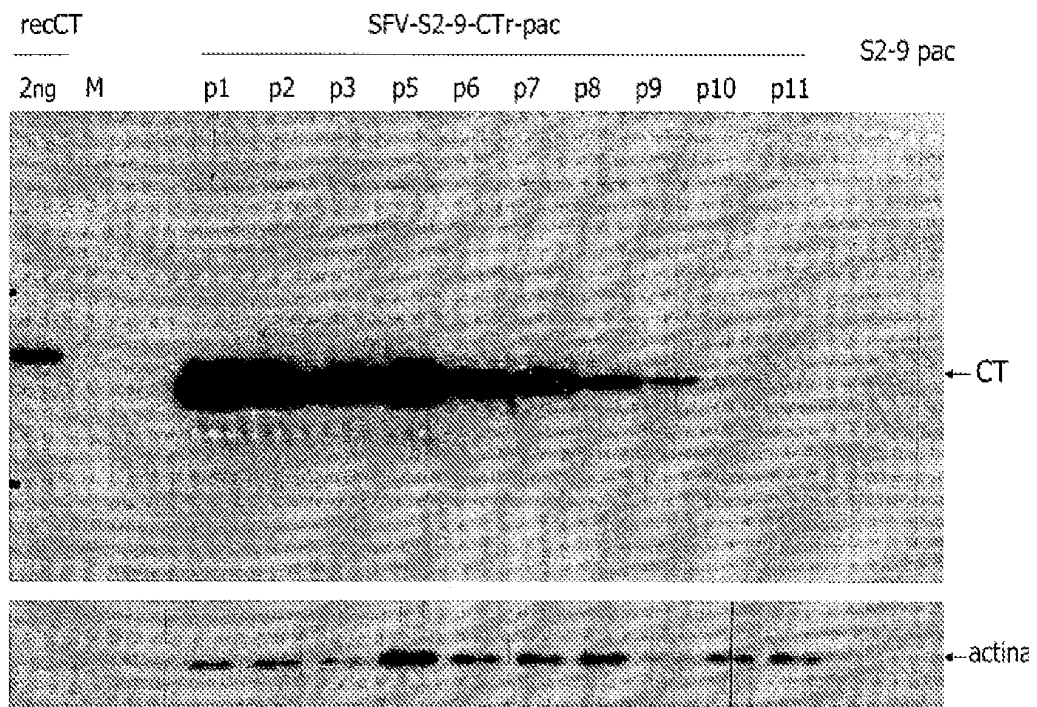


FIG 16

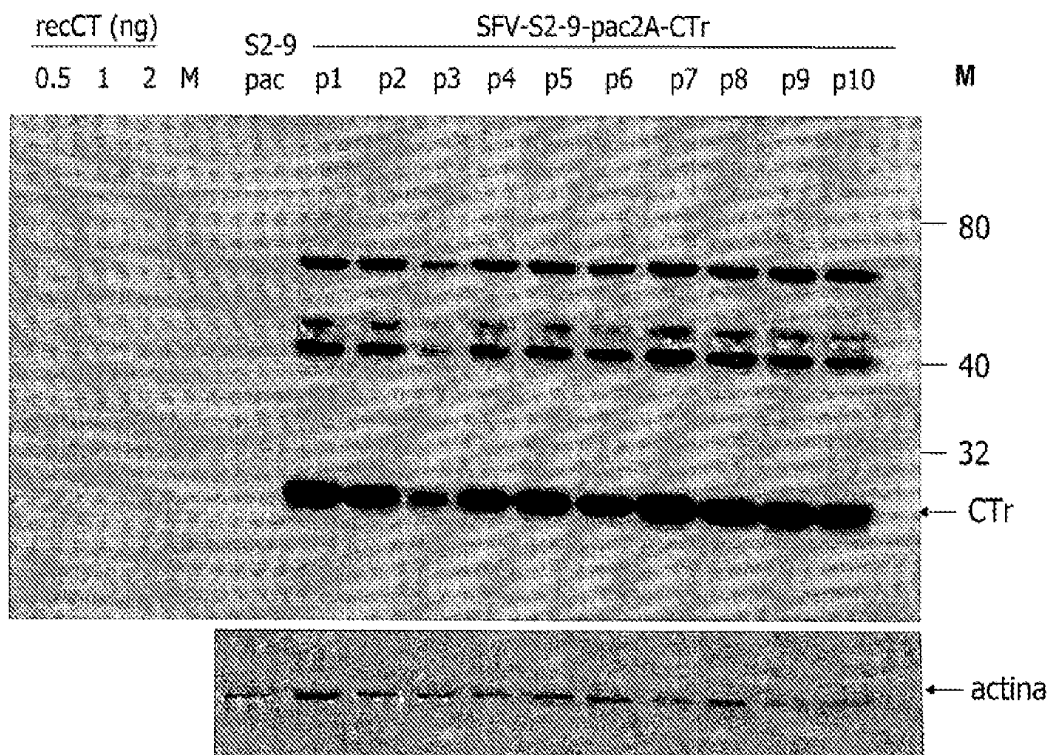


FIG 17

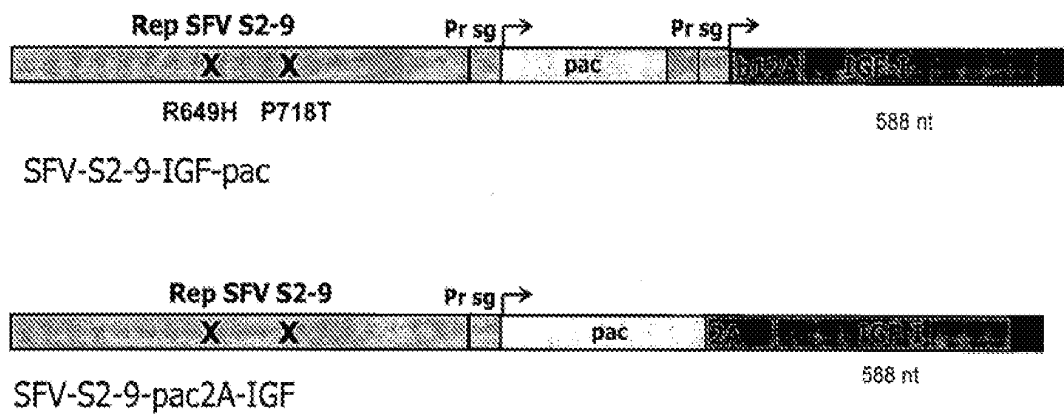


FIG 18

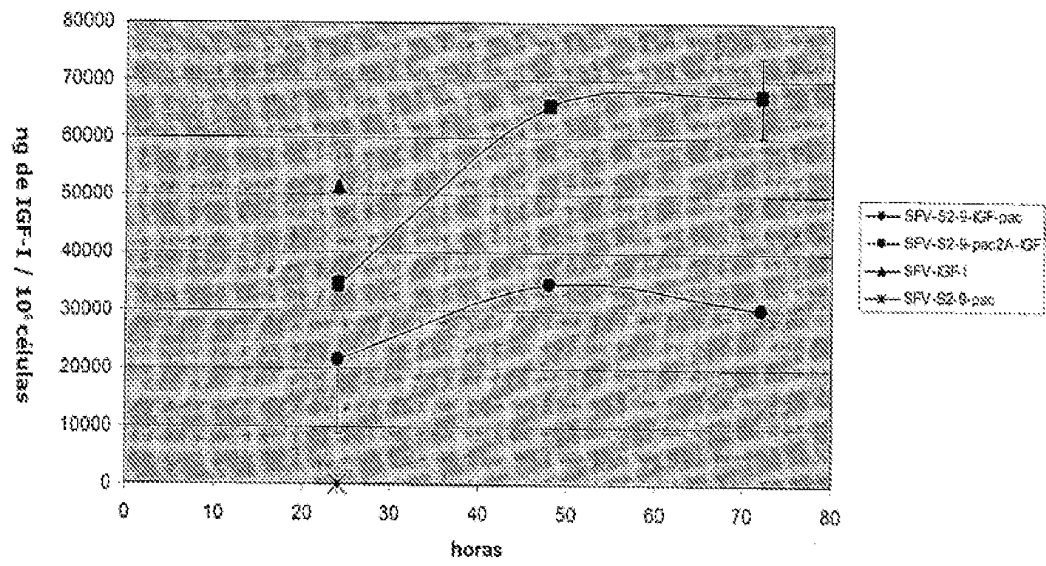


FIG 19

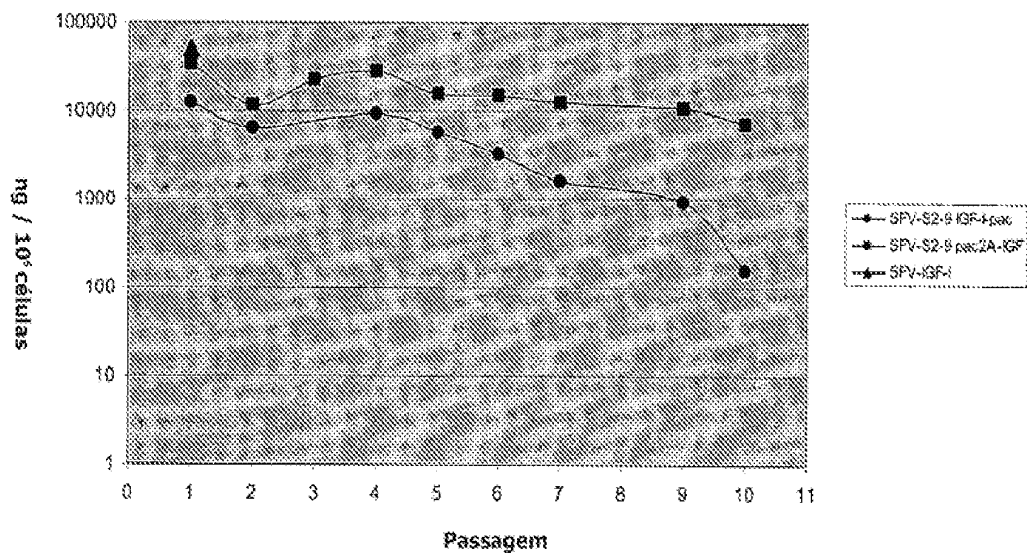


FIG 20