



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0618369-7 B1



(22) Data do Depósito: 08/11/2006

(45) Data de Concessão: 12/04/2022

(54) Título: MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM VÍRUS ALVO NÃO ADENOVIRAL OU UMA OU MAIS PROTEÍNA(S) ALVO QUE NÃO É(SÃO) RELACIONADA(S) A ADENOVÍRUS, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA CÉLULA DE EXPRESSÃO DE VERTEBRADO IMORTALIZADA E SEU USO

(51) Int.Cl.: C12N 5/10; C07K 14/01; C07K 14/075; C12N 5/16.

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2005 EP 05 110453.7; 14/12/2005 US 60/750,156.

(73) Titular(es): PROBIOGEN AG.

(72) Inventor(es): VOLKER SANDIG; INGO JORDAN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2006068234 de 08/11/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/054516 de 18/05/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/05/2008

(57) Resumo: FATOR PROTÉICO DE AUMENTO DE PRODUTIVIDADE, NOVAS LINHAS CELULARES E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um vírus alvo ou proteínas-alvo não adenovirais utilizando uma linhagem celular de expressão potente com, integrado de maneira estável em seu genoma, um gene que codifique uma proteína reguladora heteróloga específica.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM VÍRUS ALVO NÃO ADENOVIRAL OU UMA OU MAIS PROTEÍNA(S) ALVO QUE NÃO É(SÃO) RELACIONADA(S) A ADENOVÍRUS, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA CÉLULA DE EXPRESSÃO DE VERTEBRADO IMORTALIZADA E SEU USO".

[0001] A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um vírus alvo não adenoviral ou proteínas-alvo, utilizando uma linhagem celular de expressão potente apresentando um gene que codifica uma proteína reguladora heteróloga específica integrado de maneira estável em seu genoma.

Antecedentes da Invenção

[0002] Produtos biofarmacêuticos de células eucarióticas são uma parte integral da medicina moderna. Entretanto, maior produtividade e maior segurança são parâmetros importantes que ainda requerem otimização substancial. O gargalo mais crucial nos esforços de otimização é o próprio substrato celular. Um transgene seguro que possa ser introduzido em linhagens celulares já liberadas para uso em processos biofarmacêuticos para aumentar os rendimentos de produto dessas células manipuladas é extremamente valioso.

[0003] Adenovírus são vírus de DNA de filamento duplo sem envólucro (nus) que infectam um amplo espectro de animais. Entre os membros melhor caracterizados está o adenovírus humano sorotipo 5 (Ad5). Esse vírus é uma causa frequente de sintomas do resfriado comum, e a infecção frequentemente ocorre na infância.

[0004] Os adenovírus são passíveis de manipulação genética, e adenovírus incompetentes para replicação, incluindo Ad5 (número de acesso do GenBank para sequência: AC_000008), são usados como vetores em terapia genética e para vacinação terapêutica. Para se obterem vírus incompetentes para replicação, grandes regiões do DNA

genômico são substituídas por sequências não virais. As funções virais faltantes são fornecidas em trans pelas linhagens celulares hospedeiras que tenham sido transfectadas de maneira estável com genes que estejam deletados no vetor. Um dos primeiros sistemas que foram desenvolvidos consiste em vetores adenovirais deletados na região E1 reguladora produzida em linhagens celulares que fornecem as proteínas E1 correspondentes.

[0005] A linhagem celular mais comum para essa finalidade é a linhagem celular 293. Essa linhagem foi gerada em 1977 por transfecção de DNA genômico adenoviral fragmentado em células humanas primárias (Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36, 59-74 (1977)), muito antes de se reconhecer que adenovírus podem servir de vetores de terapia genética. Demonstrou-se subsequentemente que a linhagem celular resultante continha os nucleotídeos 1 a 4344 do DNA genômico (Louis *et al.*, Virology 233, 423-429 (1997)), que inclui a região E1; essa caracterização demonstrou que a região E1 pode ser usada para imortalizar e transformar células primárias.

[0006] Adjacente à região E1, segue-se o gene para pIX ("proteína 9"; nucleotídeos 3609 a 4031 no DNA genômico). O promotor para pIX está incrustado dentro do componente E1B da região E1. Um mecanismo chamado de oclusão de promotor permite a expressão de pIX em um momento precoce retardado no ciclo de infecção viral no início da replicação de DNA viral, com números crescentes de cópias de DNA viral (Fessler e Young, J. Virol. 72, 4049-4056 (1998)). Embora o gene esteja presente dentro dos 4344 nucleotídeos integrados em células 293, a expressão de pIX não pode ser detectada, mesmo com métodos sensíveis de marcação radioativa (Spector *et al.*, J. Virol. 36, 860-871 (1980)).

[0007] Conforme acima descrito, vetores adenovirais deficientes em replicação foram gerados por deleção da região E1 do genoma viral. Os

produtos de E1 são essenciais para a replicação viral, e a função da região E1 tinha, portanto, de ser fornecida em trans mediante transgenes E1 estáveis na célula de empacotamento do adenovírus (como a linhagem celular 293). Por causa com a proximidade da região E1, o gene pIX causava frequente recombinação entre vetores adenovirais deletados e E1 no genoma do hospedeiro. Esse evento de recombinação gerava adenovírus competentes para replicação (RCA), uma contaminação séria em preparações de vetores. Para suprimir esse evento de recombinação, pIX era deletada do genoma do adenovírus. No decorrer desses experimentos, reconheceu-se que pIX estabiliza o capsídeo adenoviral contra estresse térmico e estérico mediante aumento da interação dos blocos de construção principais, os hexons (Colby e Shenk, *J. Virol.* 39, 977-980 (1981); Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.* 6, 1733-1739 (1987)). A morfogênese na ausência de pIX fornece vírus sensíveis à temperatura, que não podem destruir moléculas de DNA genômico maiores que 105% dos 35938 pares de bases do tipo selvagem. Para ainda permitir uma capacidade de empacotamento normal e a estabilidade térmica, a proteína pIX foi introduzida de maneira estável em linhagens celulares pretendidas como células de empacotamento para vetores adenovirais (Krougliak e Graham, *Hum. Gene Ther.* 6, 1575-1586 (1995); WO 99/57296 e Imler *et al.*, *Gene Therapy* 3, 75-84 (1996)).

[0008] Também reconhecendo que pIX decora a superfície de vírions, proteínas de fusão com pIX foram geradas com a finalidade de expandir a faixa de hospedeiros de vetores adenovirais ou para seguir a morfogênese e a migração intracelular de partículas virais (revisado por Parks, *Mol. Ther.* 11, 19-25 (2005)).

[0009] Embora claramente uma proteína estrutural, pIX também está implicada como proteína reguladora para a replicação do adenovírus. Considera-se que PIX funcione como transativador da

transcrição para aumentar a expressão de E1A, uma função possivelmente até exercida como uma virocina pela proteína PIX proveniente do capsídeo na etapa de infecção (revisado por Parks, Mol. Ther. 11, 19-25 (2005)). PIX, juntamente com a proteína precoce E4 Orf3, também é descrita como interagindo com inclusões subnucleares chamadas de corpúsculos PML (Puvion-Dutilleul *et al.*, Exp. Cell. Res. 218, 9-16 (1995); Leppard e Everett, J. Gen. Virol. 80, 997-1008 (1999)). Esses são agregados dinâmicos de 250 nm a 500 nm de tamanho e que se propõe que estejam envolvidos na regulação da diferenciação celular (Wang *et al.*, Science 279, 1547-1551 (1998)), controle da apoptose (Quignon *et al.*, Nature Gen. 20, 259-265 (1998)) e resposta a infecções virais (Möller e Schmitz, Arch Immunol Ther Exp (Warz) 51, 295-300 (2003)).

[00010] Por causa de seus efeitos pleotrópicos, introduzidos a proteína PIX em linhagens celulares para examinar se PIX aumenta a proliferação celular ou as propriedades de produção de produtos biofarmacêuticos que não estejam relacionados a adenovírus ou vetores adenovirais. Há uma necessidade geral de fatores que modulem essas propriedades em linhagens celulares estabelecidas.

[00011] Por exemplo, vírus atenuados (enfraquecidos) são candidatos promissores a vacinas: com a inoculação, eles imitam uma infecção natural, mas permitem mais tempo para o estabelecimento da resposta imune protetora desejada pelo vacinado. Com números crescentes de pacientes imunocomprometidos (por exemplo, devido a infecção por HIV), são desejáveis cepas altamente atenuadas. Embora cepas atenuadas ainda prossigam até a infecção (normalmente benigna), cepas altamente atenuadas são bloqueadas em um nível celular, mesmo na ausência de um sistema imune funcional. Um método frequentemente usado para estabelecer e manter a atenuação é a passagem dos vírus em diferentes tecidos do hospedeiro. Por exemplo,

vírus do sarampo e da caxumba destinados a vacinação humana são passados por células primárias, em ovos de galinha embrionados ou culturas derivadas delas. Uma nova geração de vacinas se baseia em vírus de varíola altamente atenuados, que também dependem de células primárias de galinha para produção. Uma linhagem celular que pode substituir células primárias de galinha e que, ao mesmo tempo, se proteja ainda menos eficientemente contra a infecção viral devido a manipulações secundárias, como introdução do transgene de PIX, fornece, conseqüentemente, um substrato altamente desejável.

[00012] Para outras finalidades, pode-se preferir uma linhagem celular de mamíferos (em vez de aves). Essas linhagens celulares preferidas já existem e passaram pelo exame de autoridades sanitárias com relação à segurança e a riscos apresentados pelos produtos biofarmacêuticos derivados. Aqui também uma manipulação secundária (como introdução do transgene de PIX) para aumentar o espectro de aplicações disponíveis ou as eficiências de produção, sem comprometer as características de segurança, é altamente desejável.

Sumário da Invenção

[00013] Quando se prepararam linhagens celulares que tenham sido transfectadas de maneira estável como o gene adenoviral pIX (ou seu análogo de fusão quimérico), observou-se inesperadamente que pIX exerce um efeito fenotípico em células de aves e humanas. Para células de aves, isso é particularmente surpreendente, porque as células de ave não podem ser infectadas por adenovírus humanos, aviadenovírus (como CELO ou adenovírus de pássaros do tipo 8) não codificam um homólogo de PIX (Ojkic e Nagy, J. Gen. Virol. 81, 1833-1837 (2000)). Além disso, observou-se que a presença estável de PIX aumenta a suscetibilidade da célula à indução pelo análogo de RNA de filamento duplo, provavelmente mediante o receptor do tipo Toll 3. Provavelmente nesse contexto, também observou-se inesperadamente que a presença

da proteína PIX aumenta os rendimentos de vírus de varíola altamente atenuados em células hospedeiras de aves. Como células infectadas por vírus de varíola sofriam menos da indução por análogo de RNA de filamento duplo, podemos ter encontrado uma interação entre a proteína PIX e genes anti-interferon do vírus da varíola que não havia sido anteriormente descrita. Também observou-se um aumento surpreendente no rendimento de produto proteináceo (não apenas vírus) liberados por uma linhagem celular transfectada de maneira estável.

[00014] Assim, a presente invenção apresenta:

(1) um método para a preparação de um vírus alvo não adenoviral ou uma ou mais proteínas-alvo, o método compreendendo:

(a) o cultivo de uma célula de expressão obtível por infecção ou transfecção de uma célula hospedeira, integrado de maneira estável em seu genoma, um gene que codifique uma PIX de Adenovírus ou sua variante funcional, como uma proteína reguladora heteróloga, e expressão estável da dita proteína reguladora ou sua variante funcional, com o dito vírus alvo, ou com um vetor veículo de sequências de ácidos nucleicos que codifiquem o dito vírus alvo, ou com um vetor veículo de sequências de ácidos nucleicos que codifiquem a dita uma ou mais proteínas-alvo (em que o vírus alvo não adenoviral não contenha a dita proteína reguladora e a(s) proteína(s) alvo difira(m) da dita proteína reguladora ou sua variante funcional), e

(b) o isolamento do vírus alvo ou da(s) proteína(s) alvo;

(2) uma modalidade preferida de (1) acima, em que a dita proteína PIX ou sua variante funcional coopere com fatores virais não cognatos, module a distribuição subcelular de fatores diferentes da dita proteína, module a transcrição e/ou crescimento celular e intensifique a produtividade da célula na produção de um vírus não contendo a dita proteína reguladora e na produção de uma proteína diferente da dita

proteína reguladora ou sua variante funcional;

(3) uma modalidade preferida de (1) e (2) acima, em que o adenovírus pIX é fornecido como uma proteína de fusão com outra proteína que module ou expanda a atividade ou a distribuição subcelular do adenovírus pIX, por exemplo, esteja fusionado a receptor alfa de ácido retinoico, de preferência seja uma proteína de fusão com a sequência mostrada em SEQ ID NO: 4 ou seja fusionada a um GFP e contenha um NLS, de preferência seja uma proteína com a sequência mostrada em SEQ ID NO: 23;

(4) uma modalidade preferida de (1) a (3) acima, em que a célula hospedeira e de expressão seja uma célula de vertebrado, incluindo células de mamíferos e células de aves, de preferência a célula de mamífero seja uma célula derivada de cérebro humano, e a célula de ave seja uma célula derivada de retina de pato ou uma célula derivada de somito de pato;

(5) uma modalidade preferida de (1) a (4) acima, em que a célula hospedeira e de expressão seja derivada de cérebro humano, de preferência de cérebro fetal e, mais preferivelmente, seja uma célula NC5T11, e a dita célula seja veículo de uma sequência de ácido nucléico que codifique PIX de Adenovírus ou sua variante funcional como uma proteína reguladora heteróloga, de preferência a dita proteína reguladora heteróloga seja codificada por um ácido nucléico mostrado na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 22;

(6) uma modalidade preferida de (5) acima, em que a célula hospedeira seja uma célula NC5T11 nº 34, e a célula de expressão é derivada da célula NC5T11 nº 34, a dita célula NC5T11 nº 34, estando depositada no DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2744;

(7) uma modalidade preferida de (1) a (4) acima, em que a célula hospedeira e de expressão seja uma célula de ave, de preferência seja derivada de retina de pato ou de somito de pato, e a

dita célula seja veículo de uma sequência de ácido nucléico que codifica PIX de Adenovírus ou sua variante funcional como uma proteína reguladora heteróloga, de preferência a dita proteína reguladora heteróloga seja codificada por um ácido nucléico mostrado na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 22;

(8) uma modalidade preferida de (7) acima, em que a célula hospedeira seja uma célula CR.PIX (17a11b), e a célula de expressão seja derivada da célula CR.PIX (17a11b), a dita célula CR.PIX (17a11b) estando depositada no DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2749;

(9) uma célula de expressão para a produção de um vírus alvo ou uma ou mais proteínas-alvo conforme definido em (1) a (8) acima, de preferência a expressão sendo conforme definida em (5) a (8) acima;

(10) um método para a preparação da célula de expressão conforme definida em (9) acima, que compreende a infecção ou transfecção de uma linhagem celular hospedeira conforme definida em (1) a (8) acima com um vírus, ou com um vetor veículo de sequências de ácidos nucléicos que codifiquem o dito vírus ou com um vetor veículo de sequências de ácidos nucléicos que codifiquem a dita uma ou mais proteínas-alvo;

(11) uma célula hospedeira conforme definida em (5) a (8) acima;

(12) um método para a preparação de uma célula hospedeira de acordo com (11) acima, que compreende a transfecção de uma célula de partida apropriada com um vetor veículo da dita proteína reguladora ou sua variante funcional;

(13) o uso da célula de expressão conforme definida em (7) acima para a preparação de um vírus alvo ou de uma ou mais proteínas-alvo;

(14) uma proteína de fusão compreendendo pelo menos um

primeiro domínio compreendendo uma proteína reguladora e pelo menos um segundo domínio compreendendo uma proteína ou proteína que aja como modulador de transcrição e/ou como um sinal para direcionamento subcelular, conforme definido em (2) ou (3) acima; e

(15) uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão conforme definida em (14) acima.

Breve Descrição das Figuras

[00015] Figura 1: histórico da linhagem celular NC5T11. A: neuroesferas de células primárias cultivadas sob condições livres de soro. B: monocamada de células primárias cultivadas em DMEM/F12 com 5% de FCS. C: foco primário duas semanas após a transfecção com p79. As setas indicam a borda entre células primárias e imortais. D: cultura aderente homogênea de células imortalizadas em DMEM/F12 com 5% de FCS. E: cultura em suspensão de NC5T11 em tubos de agitação em Excell VPRO.

[00016] Figura 2: imunofluorescência detectando E1A e E1B em NC5T11. Depois da fixação com metanol, as células foram tratadas com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k, respectivamente seguido por anticorpos anti-rato conjugados a vermelho Texas. Conforme mostrado na fig. 2, todas as células na amostra mostram coloração nuclear típica para E1A e coloração citoplasmática para E1B. Depois da fixação com metanol, as células foram tratadas com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k, respectivamente seguido por anticorpos anti-rato conjugados a vermelho Texas. Conforme mostrado aqui, todas as células na amostra mostram coloração nuclear típica para E1A e coloração citoplasmática para E1B.

[00017] Figura 3: produtividade específica de clones aat selecionados. Clones celulares de NC5T11 transfectados com C55 e selecionados com puromicina foram semeados a 7×10^4 células em placas de 12 cavidades, o número de células e o título de aat foram

determinados nos dias 1, 2 e 3 após a semeadura, e se calculou a produtividade específica celular máxima por dia.

[00018] Figura 4: análise de expressão de NC5T11 puro nº 8 em cultura de lotes com agitação. As células foram semeadas em 12 mL de EXCELL VPRO a 6×10^4 células/mL em tubos de agitação de polipropileno de 50 mL (TPP, Suíça) com e submetidos a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Amostras de 200 µL foram tiradas nos dias 4, 7, 9, 11, 15, 18 e 21. A densidade e a viabilidade das células foram determinadas depois de tingir com azul de tripan usando um hemocítômetro.

[00019] Figura 5: detecção de cDNA de pIX-RARA por PCR em clones reunidos. Clones reunidos veículos do gene pIXRARA foi gerada a partir de NC5T11 puro nº 8 por transfecção com F67 e seleção com higromicina. O RNA foi extraído usando-se um kit de extração de RNA (Machery Nagel, Alemanha), e cDNA foi sintetizado usando-se Transcriptase Reversa AMV (Invitrogen). cDNAs para apenas o fragmento pIX ou para todo o gene pIXRARA foram amplificados com iniciador 1 e 1 e 164, respectivamente.

[00020] Figura 6: detecção das sequências de pIXs como parte da proteína de fusão em subclones resistentes a higromicina de NC5T11 puro nº 8 e NC5T11 (nº 34, 35, 36, 37, 38) por PCR. O DNA foi isolado de clones de células cultivados em 6 cavidades por lise em SDS, seguido por extração com fenol e precipitação. O DNA foi amplificado com os iniciadores 1 e 2 durante 28 ciclos.

[00021] Figura 7: a estabilidade dos genes pIXRARA e pIX em NC5T11 transfectada de maneira estável foi determinada com relação a E1B: E1A+E1B e pIXRARA foram introduzidos em transfecções separadas e genes de E1 e foram mantidos na ausência de seleção durante > 2 anos e são, portanto, considerados integrados de maneira estável. O DNA genômico foi isolado de clones de células selecionadas

em 2 momentos: imediatamente após parada por seleção com hyg (precoce); após 2 meses na ausência de pressão seletiva (tardia). Os níveis de DNA de PIX e E1B foram determinados por PCR de Tempo Real.

[00022] Figura 8: retardo de crescimento induzido por tratamento com RA em clones recombinantes de pIXRARA de NC5T11 e NC5T11 puro nº 8. As células foram semeadas a 2×10^5 em placas de 6 cavidades, na presença ou ausência de 6 $\mu\text{g/mL}$ de ácido retinoico. Fotos mostrando o retardo de crescimento nos clones tratados com RA nº 12 e nº 34, mas não em NC5T11, foram tiradas 4 dias após a semeadura usando-se imagem por contraste de fase a uma ampliação de 4x.

[00023] Figura 9: PIXRARA impede a inibição da replicação dos vírus por interferon. Células NC5T11 e NC5T11 nº 34 foram infectadas com EMCV, um vírus sensível a interferon, a uma MOI de 0,004, em células tratadas com interferon beta. Os lisados celulares foram submetidos a titulação por formação de placa em células A549.

[00024] Figura 10: análise de expressão da linhagem celular NC5T11 puro nº 8 que expressa alfa-1-antitripsina do vetor C55 e seus subclones nº 10, nº 12, nº 14, veículos do vetor F67 (pEFpIX-RARA) além de C55. As células foram semeadas em EXCELL VPRO (JRH Biosciences) a 6×10^4 células/mL em tubos de agitação de polipropileno de 50 mL (TPP, Suíça), com um volume total de 12 mL, e submetidas a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm.

[00025] Figura 11: expressão de PIX em células CR de retina de pato. Painel esquerdo: reação de PCR contra o gene de PIX em DNA genômico de células pIX. Carga de gel da esquerda para a direita: marcador de 1 kb (Invitrogen); PCR em DNA genômico de CRpIX; controle sem molde; controle positivo com plasmídeo usado na transfecção de CrpIX. Painel direito: Western Blot para detecção de

proteína pIX em células CRpIX. Raia 1: células 293; raia 2: proteína pIX em células CRpIX.

[00026] Figura 12: manutenção estável do transgene de PIX em células de retina de pato. Painel esquerdo superior: MCX e DXS são alíquotas independentes de um clone de CRpIX cultivado durante > 3 meses em paralelo e sem seleção. Após três meses, usou-se TaqMan para contar os números de cópias do transgene de E1B e PIX em MCX e DXS. Como o transgene de E1B é mantido independentemente do PIX, a razão dos dois genes é uma indicação da manutenção do transgene de PIX. A razão não se alterou entre MCX e DXS. Além disso, a razão de mRNA de PIX para mRNA de E1B também não se alterou, e o mRNA de PIX excedia o mRNA de E1B, indicando a expressão de PIX. Painel direito: MCX e células CR.HS de origem (negativas para PIX) foram cultivadas com ou sem pressão seletiva de higromicina durante 2 semanas (indicado pela barra preta no eixo x). Em vários momentos, o DNA genômico foi isolado (indicado por "A", "B" e "C") e submetido a quantificação por TaqMan (inferior esquerdo). Enquanto as células de origem foram mortas pela higromicina, as células MCX sobreviveram. A razão de transgenes permaneceu constante, novamente indicando a manutenção estável do transgene de PIX também na presença de pressão seletiva. O tempo de duplicação para as células de origem é de aproximadamente 32 h, mas de apenas 41 horas para células MCX.

[00027] Figura 13: efeito de PIX sobre a replicação de MVA em células CS. Células CS e CSpIX foram infectadas com MVA e ensaiadas quanto à replicação de MVA 48 h e 72 h após a infecção. O rendimento de MVA era significativamente maior em células CS positivas para PIX. Da mesma forma, conforme evidenciado na microimagem de contraste de fase, o efeito citopático pareceu retardado para células CSpIX em 48 horas. Entretanto, ambas as culturas são suscetíveis ao vírus em graus

similares, pois a lise completa é evidente 72 horas após a infecção.

[00028] Figura 14: efeito de PIX sobre a replicação de MVA em células CR. Células CR e CRpIX em suspensão foram infectadas com várias multiplicidades e a várias densidades de células de semeadura. O rendimento de MVA foi ensaiado 48 h após a infecção e está mostrado no eixo y. O tamanho das bolhas apresenta as densidades de células de semeadura. As bolhas preenchidas mostram os valores para células CRpIX, bolhas brancas mostram os valores para as células de origem. Em todas as configurações, PIX confere um claro aumento nas taxas de amplificação de MVA.

[00029] Figura 15: distribuição subcelular de PIX-GFP em células de pato. PIX etiquetado com GFP aparece em poucos pontos brilhantes citoplasmáticos e coloração citoplasmática difusa, excluindo grandemente o núcleo. Outros clones exibem coloração citoplasmática difusa mais forte e acumulação mais intensa fora do núcleo.

[00030] Figura 16: distribuição subcelular de variantes de PIX-GFP em células CHO. Para investigar alterações induzidas da distribuição de PIX dentro das células, variantes de fusão foram geradas, incluindo a inserção de um sítio de localização nuclear (NLS) e fusão ao receptor alfa retinoico, uma proteína celular que já contém um NLS. Mostram-se células CHO transitoriamente transfectadas com plasmídeos de expressão para variantes de PIX-GFP.

[00031] Figura 17: efeito de indução com interferon na presença de PIX. Células CSpIX e CRpIX foram tratadas com poli I:poli C, um indutor conhecido da resposta de interferon do tipo I, e comparadas a células de origem. As células CSpIX reagiram com maior sensibilidade a poli I:poli C do que as células CS. Células CRpIX e CR reagiram de maneira comparável e em menor medida que as células CS.

[00032] Figura 18: efeito da infecção com MVA e indução com interferon na presença de PIX-GFP. Células CSp9GFP e CRp9GFP

foram tratadas com poli I:poli C e infectadas com MVA a uma M.O.I. de 0,1, conforme indicado. Mais uma vez, células derivadas de CS reagiram mais fortemente à indução com interferon. Surpreendentemente, corpúsculos de PIX brilhantes pareceram diminuir de número com a indução ou infecção em ambas as linhagens celulares, ao passo que a intensidade de sinal global de PIX-GFP aumenta. Além disso, o efeito da indução com poli I:poli C é melhorado por infecção paralela com MVA, conforme indicado por um número maior de células CS ainda aderentes 22 h após o tratamento.

Descrição Detalhada da Invenção

[00033] O método da modalidade (1) da invenção utiliza uma célula de expressão com um gene que codifica uma proteína reguladora heteróloga, a saber, pIX, ou sua variante funcional, integrado em seu genoma. A dita proteína reguladora possui as seguintes propriedades:

1. Modula a transcrição e, particularmente se ligada a moduladores ou reguladores apropriados, também influencia o crescimento celular.

2. Intensifica a produtividade da linhagem celular com relação à produção de um vírus não contendo a dita proteína reguladora (isto é, a proteína reguladora não é um substituto para uma proteína deletada do vírus) e/ou com relação à produção de uma proteína diferente da dita proteína reguladora ou sua variante funcional.

[00034] De acordo com a invenção, a proteína reguladora heteróloga é a proteína pIX de adenovírus sorotipo 5 (por exemplo, aquela com a sequência de aa mostrada na SEQ ID NO: 2), seus mutantes (incluindo mutantes de adição, substituição e/ou deleção), suas variantes (por exemplo, variantes obtidas de um adenovírus de um sorotipo diferente) e similares.

[00035] "Variante funcional da proteína reguladora heteróloga", de acordo com a invenção, inclui homólogos do adenovírus além do

sorotipo 5, todos os tipos de mutação (adição, substituição e/ou deleção) de resíduos de aminoácidos particulares da respectiva proteína reguladora de tipo selvagem, modificação por fusão com sequências de proteínas ou peptídeos ativos adicionais e outros. São particularmente preferidas as proteínas de fusão, a saber, proteínas de fusão compreendendo pelo menos um primeiro domínio que compreenda uma proteína reguladora, conforme acima definida, e pelo menos um segundo domínio compreendendo uma proteína ou peptídeo que aja como um modulador de transcrição. Em uma modalidade preferida da invenção, o dito modulador de transcrição é um fator de transcrição incluindo o receptor alfa de ácido retinoico, que pode estar presente em forma completa ou incompleta (isto é, truncado). O modulador também pode ser um peptídeo de trânsito, que inclui sequências NLF, por exemplo, aquelas mostrada em SEQ ID NO: 21. De acordo com a invenção, os primeiro e segundo domínios ligados covalentemente entre si diretamente ou mediante um elo peptídico. Elos peptídicos adequados incluem estruturas flexíveis e hidrofílicas, como poli Gly-Ser.

[00036] Os termos "células" e "linhagem celular", conforme usados na descrição detalhada a seguir, referem-se a células de expressão/linhagens celulares de expressão e células hospedeiras/linhagens celulares hospedeiras.

[00037] De acordo com a invenção, é preferível que a proteína reguladora heteróloga ou sua variante funcional seja expressada na célula em uma quantidade de pelo menos 1 pg/ μ g de proteína celular, de preferência em uma quantidade de pelo menos 10 pg/ μ g de proteína celular, de modo que sua expressão possa ser determinada por Western-Blotting.

[00038] Na célula da invenção, a proteína reguladora heteróloga ou sua variante funcional está, de preferência, sob controle de um promotor

homólogo ou heterólogo estável. Promotores adequados são promotores celulares constitutivos ou suas variantes, como o promotor de fator 2 de translocação e alongamento humano. Uma variante particular do promotor de fator 2 de translocação e alongamento humano utilizado na invenção tem a sequência mostrada na SEQ ID NO: 12. A sequência mostrada representa uma versão "curta" do promotor, que está localizada no cromossomo humano 19:3.935.325-3.936.638 (montagem de genoma humano, maio de 2004) e garante uma expressão de nível médio estável. Para uma expressão mais forte, pode-se usar uma versão "mais longa" do promotor localizada em chr19:3.935.349-3.938.957 (montagem de genoma humano, maio de 2004).

[00039] De acordo com a invenção, a célula é uma célula de vertebrado, incluindo células de mamíferos, células de aves e outras. Células de mamíferos adequadas são células humanas e células de roedores, incluindo de camundongo, rato, hamster, etc. Células de mamíferos particularmente preferidas de acordo com a invenção são células derivadas de cérebro humano, particularmente de cérebro humano fetal, uma célula NOS ou Sp2/0 de camundongo, uma célula BHK ou CHO. Células de aves adequadas são células de pato, galinha, codorna e ganso. Células de aves particularmente preferidas de acordo com a invenção são células derivadas de retina de pato ou derivadas de somito.

[00040] Por outro lado, a célula da invenção pode ser derivada de uma célula primária ou de uma célula previamente imortalizada. Além disso, a célula também pode ser veículo de genes imortalizadores (virais), incluindo uma proteína E1 de um adenovírus, como a proteína E1 de mastadenovírus grupo C tipo 5 e outros. É particularmente preferido de acordo com a presente invenção que a célula também seja veículo do gene de E1A e/ou E1B de adenovírus mostrado na SEQ ID

NO: 5.

[00041] A célula utilizada no método da modalidade (1) da invenção também pode ser veículo de sequências funcionais, por exemplo, sequências requeridas para sua aplicação como célula de expressão, como sequências marcadoras de seleção, sítios doadores/receptores de união e/ou sequências de reconhecimento de recombinase, que permitam a integração de uma sequência de ácido nucléico alvo a ser expressada na célula, etc.

[00042] A "infecção", "transfecção" e "transformação" efetuadas no método das modalidades (1), (10) e (12) da invenção podem ser efetuadas de acordo com procedimentos padronizados conhecidos por aqueles versados na técnica. Os ditos métodos também podem englobar etapas de seleção, isolamento e expansão adequadas, caso requerido.

[00043] No método da modalidade (1), o vírus alvo inclui vírus do tipo selvagem, com mutação ou deletado, vírus adaptado ao frio ou atenuado, cepas de vacinas, vetores virais veículos de gene(s) heterólogo(s), vetores virais, como lentivírus, vírus da varíola, vírus adeno associados (aav), vírus da herpes, flavivírus e similares.

[00044] Além disso, no método da modalidade (1), a uma ou mais proteínas-alvo incluem anticorpos, proteínas recombinantes, como eritropoetina, alfa-1-antitripsina, fatores da coagulação sanguínea VIII e IX e interferons, antígenos virais, como influenza HA e NA, e M, HBV-S, proteína G de herpes e proteína G da raiva, hormônios peptídicos e similares. Embora o método permita a produção de células capazes de expressão contemporânea de mais de uma proteína-alvo, é particularmente preferido que codifique apenas uma proteína-alvo.

[00045] O cultivo e isolamento do método da modalidade (1) da invenção pode ser efetuado de acordo com procedimentos padronizados prontamente disponíveis para aqueles versados na

técnica. O dito método também pode incluir etapas de purificação padronizadas, assim como etapas de modificação subsequentes do vírus alvo ou proteína(s) alvo.

[00046] Com relação às modalidades preferidas das linhagens celulares de expressão e hospedeiras das modalidades (9) e (11), respectivamente, assim como aos métodos de produção das ditas linhagens celulares das modalidades (10) e (12), faz-se referência à discussão detalhada apresentada acima com relação à modalidade (1).

[00047] De acordo com as modalidades (14) e (15), a invenção apresenta uma proteína de fusão compreendendo pelo menos um primeiro domínio que compreende uma proteína reguladora e pelo menos um segundo domínio que compreende uma proteína ou peptídeo que aja como um modulador da transcrição conforme acima definido, e uma sequência de nucleotídeos que codifica a dita proteína de fusão, respectivamente. A invenção também se refere ao uso da dita proteína de fusão (por exemplo, em aplicações diagnósticas ou farmacêuticas etc.) e da sequência de nucleotídeos que a codifica das modalidades (14) e (15), respectivamente, por exemplo, em todos os tipos de construtores de vetores, linhagens celulares, cultura de tecido, animais transgênicos etc.

[00048] A linhagem celular NC5T11 nº 34 foi depositada no DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha, em 4 de novembro de 2005, sob o número de acesso DSM ACC2744. A linhagem celular CR.PIX (17a11b) foi depositada no DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha, em 4 de novembro de 2005, sob o número de acesso DSM ACC2749.

[00049] A invenção será explicada em maiores detalhes por meio dos exemplos a seguir, que, entretanto, não devem ser tomados como

limitando a invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Desenvolvimento da linhagem celular NC5T11

[00050] A linhagem celular foi desenvolvida a partir de uma mistura de células de cérebro fetais por imortalização com os genes E1A e B de adenovírus 5 por transfecção não viral.

[00051] Uma amostra de tecido foi tirada da zona periventricular do cérebro de um feto após abortamento induzido. Foi dissecada com tesouras e homogeneizada por aspiração com uma pipeta de cultura de tecido em meio de cultura neuronal, à base de DEMEM/F12 contendo 20 ng/mL de hFGF (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EUA), 20 ng/mL de hEGF (Invitrogen), 1x suplemento N2 (Invitrogen) e 8 µg/mL de heparina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). As células foram sedimentadas a 200 g durante 3 min. A viabilidade das células foi avaliada usando-se azul tripan e iodeto de propídio, usando-se um citômetro de fluxo (BD Biosciences, Jose, CA 95131, EUA). A viabilidade era de 75%. $0,5 \times 10^6$ células foram semeadas em balões T25. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células formaram neuroesferas até o dia 5 de cultura. As neuroesferas são mostradas na Figura 1A. No dia 8, as células foram transferidas para DMEM/F12 suplementado com 5% de FCS, para permitir a fixação e para estimular a proliferação. As células formaram uma monocamada homogênea conforme mostrado na Figura 1B e foram passadas a 1:5 uma vez por semana. Essa cultura de células neurais primárias foi chamada de NC5.

[00052] Após 2 semanas em soro contendo meio, as células foram transfectadas com vetor p79 em placas de 6 cavidades subconfluentes usando-se Effectene (Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha) como um reagente de transfecção, segundo as instruções dos fabricantes. O plasmídeo p79 contém os seguintes elementos: o pBluescript (Stratagene, EUA), serve de estrutura principal do plasmídeo, em que o

marcador de resistência à ampicilina foi substituído pelo gene de resistência à canamicina acionado por um promotor bacteriano que permite o crescimento e seleção em *E. coli*. O vetor aloja um fragmento de adenovírus 5 do tipo selvagem (SEQ ID NO: 5) contendo os quadros de leitura abertos para E1A (variantes de união 13S e 12S, com ou sem o domínio CR3, respectivamente), e E1B 55k e 19k, assim como sequências a montante de E1A. O gene de E1A é precedido pelo promotor de fosfoglicerato quinase (camundongo). As sequências do adenovírus são seguidas pelo sinal de poliadenilação do gene de timidina quinase de herpes simples, servindo de substituto para o sinal de poliadenilação de E1B. Os elementos foram obtidos dos respectivos organismos ou de plasmídeos doadores por PCR e clonados usando-se técnicas convencionais de DNA recombinante e verificados por sequenciamento. Dois dias após a transfecção, as células foram tripsinizadas e transferidas para um disco de 10 cm. Duas semanas depois, focos de pequenas células com uma elevada razão de núcleo/citoplasma e bordas claramente distinguíveis se formaram (Figura 1C) em células transfectadas, mas não em tratadas de controle. A partir de 11ª transfecção, oito focos independentes foram isolados tripsina usando-se cilindros de clonagem (Corning, EUA), semeados em cavidades de uma placa de 24 cavidades e expandidos mediante uma placa de 12 cavidades, placa de 6 cavidades e balão T25. Todos os focos isolados continham dois tipos de células: células pequenas com bordas nítidas e células do tipo fibroblasto estendidos.

[00053] Três semanas após a transfecção, 15 clones adicionais se tornaram visíveis na transfecção T11, alguns dos quais podendo se originar de células restantes de clones primários já isolados.

[00054] Os clones T11a.1 e T11a.6 mostraram o crescimento mais rápido e foram criopreservados em DMEM/F12, 10% de DMSO, 25% de soro 8 semanas após a transfecção. Nesse momento, todos os clones

ainda continham uma fração de células com citoplasma aumentado, assemelhando-se ao fenótipo primário. Entretanto, com uma razão de divisão de 1:5 para T11a.1 e T11a.6, foram supercultivadas e eliminadas aproximadamente 3 meses após a transfecção. Experimentos de imunofluorescência foram realizados para associar a morfologia alterada com a expressão de E1A e E1B. Depois da fixação com metanol, as células foram tratadas com anticorpos de rato dirigidos contra E1A e E1B 55k, respectivamente seguido por anticorpos anti-rato conjugados com vermelho Texas. Conforme mostrado na figura 2, todas as células na amostram mostram coloração nuclear típica para E1A e coloração citoplasmática para E1B.

[00055] Três meses após a transfecção, os clones T11a.1 e T11a.6 foram transferidos para meio livre de soro ProPER (Cambrex, Bélgica) por semeadura de $1,6 \times 10^6$ células após tratamento com tripsina. As células foram colhidas por centrifugação, e o meio foi trocado por centrifugação uma vez por semana. A população de células sobreviveu, mas, mesmo seis meses após a transfecção, as células ainda mostraram baixa viabilidade e cresciam com um elevado tempo de duplicação de 60 – 80 h.

[00056] Quando as células foram transferidas de volta para DMEM/F12 com 5% de FCS após 3 meses em meio ProPER, uma cultura homogênea e altamente viável com um tempo de duplicação de 40 h se formou para ambos os clones. T11a.1 foi escolhido como o clone celular mais robusto para experimentos adicionais e chamado de NC5T11 (figura 1D).

Exemplo 2: Estabelecimento de NC5T11 puro clone nº 8

[00057] A produção de proteínas em uma linhagem celular depende de métodos eficientes de transfecção e seleção. A adequação de marcadores de seleção comumente usados G418, puromicina, higromicina, blasticidina, MTX, histidinol para NC5T11 era

desconhecida. Em uma primeira etapa de avaliação, diferentes reagentes de transfecção comercialmente disponíveis Lipofectamine (Invitrogen), Eugene (Roche, Alemanha), Polyfect (Qiagen) e Effectene foram testados segundo os protocolos dos fabricantes. O plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, EUA) que expressa GFP do promotor CMV humano foi usado para determinar a eficácia de transfecção transitória. A eficiência mais elevada foi obtida com Effectene (Qiagen), atingindo 20 – 50% dependendo da densidade celular, quando aplicado a células aderentes crescendo em DMEM/F12 10% de FCS.

[00058] Para testar os genes marcadores de seleção, foram construídos vetores de expressão contendo o gene de alfa-1-antitripsina (aat) humano, sob controle do promotor CMV humano, seguido pelo sinal PoliA do hormônio de crescimento bovino e o respectivo marcador de seleção controlado por um promotor fraco. Mais especificamente, para testar a seleção com puromicina, usou-se o vetor C55, que contém o gene de resistência à puromicina acionado pelo promotor PGK humano, seguido pelo sinal de poliadenilação precoce de SV40.

[00059] Depois da transfecção, as células foram semeadas em DMEM/F12 5% de FCS contendo 0,75 µg/mL de puromicina e selecionadas durante 3 semanas com troca semanal do meio. Geraram-se clones reunidos, e a expressão foi verificada por imunofluorescência usando-se um anticorpo anti-alfa-1-antitripsina policlonal de cabra (Innogenetics, EUA), seguido por um anticorpo anticabra de coelho secundário marcado com biotina e conjugado de estreptavidina-Vermelho Texas.

[00060] Para isolar clones celulares individuais, 10.000 células dos clones reunidos foram semeadas em um disco de 15 cm. Após 4 semanas, os clones foram isolados usando-se cilindros de clones (Corning), e os clones nº 1, 2, 7, 8, 9, 10 foram analisados quanto à expressão de aat. Mais especificamente, as células foram semeadas a

7×10^6 células em placas de 12 cavidades, e o número de células e a expressão de aat foram determinados. As taxas de produtividade específica das células calculadas são dadas na Figura 3. O clone NC5T11 puro nº 8 mostra uma produtividade específica acima de 100 pg/célula/dia e foi escolhido para desenvolvimento adicional.

Exemplo 3: Deslocamento de NC5T11 e NC5T11 puro nº 8 para meio de produção e análise de expressão em cultura de lotes com agitação

[00061] A taxa de crescimento tanto de NC5T11, quanto de NC5T11 puro nº 8 em meio ProPER (Cambrex) foi reduzida aproximadamente duas vezes em comparação com o meio contendo soro. Consequentemente, Xcell VPRO (JRH Biosciences) foi testado como uma alternativa. A adaptação foi feita por semeadura direta de $4,5 \times 10^6$ células em 5 mL de EXCELL VPRO em um balão T25. Após 2 semanas, o crescimento celular foi reiniciado, e se estabeleceu uma razão de divisão semanal de 1:3. Como etapa seguinte, ambos os clones foram adaptados para crescerem na presença de tensão de cisalhamento. As células foram semeadas em 12 mL de EXCELL VPRO a 6×10^4 células/mL em tubos de agitação de polipropileno de 50 mL (TPP, Suíça) com e submetidos a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Após passagens repetidas, efetuaram-se ensaios por bateladas para determinar as densidades celulares máximas e a acumulação de produto durante as fases de crescimento exponencial e estacionário. Foram feitas as seguintes observações: o clone NC511puro mostrou uma elevada viabilidade, que foi mantida acima de 70% até o dia 18. A densidade celular máxima não excedeu 1×10^6 . A acumulação de produto continuou durante a fase estacionária (figura 5). Concluiu-se que o desenvolvimento de meios específicos ou aperfeiçoamento adicional das células serão requeridos para se conseguir uma elevada densidade celular, comparável à obtida com

células CHO. Isso provavelmente resultará em títulos de produtos substancialmente aumentados.

Exemplo 4: Construção da proteína de fusão pIX-RARA e vetores de integração tanto para pIX-RARA, quanto para pIX

[00062] As sequências para PIX de adenovírus e receptor alfa de ácido retinoico (RARA) foram obtidas por PCR de adenovírus tipo 5 e DNA genômico humano, respectivamente, usando-se os iniciadores:

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

[00063] Ambos os fragmentos foram amplificados separadamente. Uma superposição entre os iniciadores 2 e 3 permitiu conectar ambos os fragmentos mediante PCR usando-se os iniciadores 3 e 4. O gene de fusão foi clonado no vetor pEFpromhyg, resultando em pEFpIXRARA. Esse vetor contém o fator 2 de alongamento humano localizado em chr19:3.935.325-3.936.638 (montagem de genoma humano, maio de 2004; SEQ ID NO: 12). Contém elementos a montante e o primeiro íntron do gene EF2. O códon de partida natural de EF2, localizado em 5' com relação ao primeiro íntron, foi removido por mutagênese. No vetor, pEFpromhyg, a sequência de EF2 é seguida pelo sítio de restrição único (AfeI) usado para inserção de pIX-RARA. Um sítio de ligação a ribossomo interno após o sítio AF1 permite a expressão do gene de resistência a higromicina como um segundo quadro de leitura aberto em um RNA unido a pIX-RARA. Essa configuração suporta a expressão de pIX-RARA em todas as células resistentes a higromicina.

[00064] O gene para wt pIX foi amplificado usando-se os iniciadores AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT (SEQ ID NO: 10) e

ACCGAGCGCTTGTTTTAAACCGCATTGG (SEQ ID NO: 11) e integrado no sítio Afe de pEFpromhyg, em vez de pIX-RARA, para fornecer pEFpIX.

Exemplo 5: Modificação das linhagens celulares NC5T11 e NC5T11 puro nº 8 com o gene de PIX e a proteína de fusão PIX-receptor de ácido retinoico

[00065] Os clones celulares NC5T11 e NC5T11 puro nº 8 foram preparados para transfecção em placas de 6 cavidades por semeadura de $1,3 \times 10^6$ células/cavidade em DMEM/F12, 5% de FCS. O plasmídeo F67 (pEFpIXRARA) e o plasmídeo F76 (pEFpIX) foram linearizados com a enzima de restrição Asp700 (Roche) e transfectados após precipitação com etanol usando-se Effectene (Qiagen): o DNA foi misturado com 16 μ L de intensificador e 200 μ L de tampão EC. Após 2 min à temperatura ambiente, 18 μ L de Effectene foram adicionados, e a formação de lipossomo foi deixada durante 10 min à temperatura ambiente. A mistura de transfecção foi adicionada a 1 mL de volume de cultura em células semeadas a 80% de confluência em placas de 6 cavidades no dia anterior. Uma alta eficiência de transfecção foi confirmada com uma transfecção paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, EUA). Um dia após a transfecção, o meio foi trocado para DMEM/F12 com 10% de FCS, e se adicionaram 75 ou 100 μ g/mL (NC5T11) e 50 μ g/mL (NC5T11 puro nº 8) de higromicina. O meio de seleção foi substituído duas vezes por semana. Após 18 dias, 15 – 20 clones claros se tornaram visíveis em cada uma das cavidades. Os clones reunidos foram tratados com tripsina, e a seleção continuou durante mais duas semanas. Os clones reunidos foram testados quanto à expressão de PIXRARA por RTPCR. Um sinal forte foi detectado com os iniciadores 1 e 2, um sinal mais fraco com os iniciadores 1 e 4 na maioria dos clones reunidos. Para isolar clones celulares individuais, 10.000 e 1.000 células dos clones reunidos foram semeadas em discos de 15 cm. Após 4 semanas, os clones foram isolados usando-se

cilindros de clone (Corning). Para clones resultantes da transfecção de F76, aplicou-se uma estratégia diferente. Os clones reunidos foram tratados com tripsina, transferidos para um tubo de agitação de 50 mL em EXCELL VPRO contendo 75 µg/mL de higromicina e, após 2 semanas de cultura em suspensão, 2.000 células viáveis foram misturadas com 12 mL de matriz de clone (Genetix, RU), semeadas em uma placa de seis cavidades (Greiner) (2 mL/cavidade) e submetidas a recolhimento de colônias automatizado (clonepixFL, Genetics, RU). Clones originados de NC5T11 puro nº 8 receberam os números 10 – 21. Clones originados de NC5T11 receberam os nº 34 – 45. Clones transfectados com pEF1PIX foram chamados de NC5T11PIXA-NC5T11PIXE. Os clones foram testados quanto à presença do respectivo vetor por PCR. Um teste inicial usando os iniciadores 1 e 2 é apresentado na figura 6. Todos os clones mostrando um sinal positivo foram deslocados para crescimento em ExCell VPRO. A readaptação foi feita por semeadura direta de $4,5 \times 10^6$ células em 5 mL de EXCELL VPRO em um balão T25. Após 6 semanas em cultura estacionária, as células foram transferidas para tubos de agitação de polipropileno de 50 mL (TPP, Suíça) a uma densidade de semeadura de 6×10^4 células/mL em EXCELL VPRO, com um volume total de 12 mL, e submetidas a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. Os clones nº 10, 12, 14 (NC5T11 puro nº 8 pIXRARA) e nº 34, 43 (NC5T11pIXRARA) e NC5T11PIXB, NC5T11PIXC foram escolhidos pela maior viabilidade sob tensão de cisalhamento. Os clones nº 34, 43 e NC5T11PIXC foram reclonados e analisados quanto à estabilidade do DNA integrado. A estabilidade foi avaliada determinando-se a razão de genes entre PIX e E1B, porque E1A+E1B e pIXRARA foram introduzidos em transfecções separadas, e genes de E1 foram introduzidos e foram mantidos na ausência de seleção durante > 2 anos e são, conseqüentemente, considerados integrados de maneira estável.

O DNA genômico foi isolado de clones celulares selecionados em 2 momentos: imediatamente após a parada de seleção com hyg (precoce); após 2 meses na ausência de pressão de seleção (tardia). Os níveis de DNA de PIX e E1B foram determinados por PCR em Tempo Real (ABI 7000, CYBR Green) a 2 concentrações de DNA. Exemplos dessa avaliação são mostrados na figura 7. O vetor pEF2PIXRARA é mantido de maneira estável nos suclones nº 34 e 43, com aproximadamente 0,4 – 0,6 cópia de PIXRARA por E1B. O clone NC5T11PIXC contém originalmente 4 cópias de pIX por E1B. Esse número é reduzido duas vezes no decorrer do experimento.

Exemplo 6: Crescimento dependente de ácido retinoico de NC5T11pIX-RARA

[00066] O ácido retinoico (RA) é um indutor da diferenciação celular. A diferenciação está tipicamente associada a um crescimento celular reduzido. A resposta a RA depende da expressão do receptor retinoico alfa, um fator de transcrição ativador por RA. RA tem um efeito profundo sobre PML (leucemia pró-mielocítica), revertendo o fenótipo transformado por parada do crescimento.

[00067] Conforme mostrado na figura 8, o tratamento com RA a uma concentração de 6 µg/mL não teve nenhum efeito sobre o crescimento de NC5T11 ou do clone que expressão alfa-1-antitripsina NC5T11 puro nº 8. Entretanto, o crescimento dos clones nº 14 (NC5T11 puro nº 8 pIXRARA) e nº 34 (NC5T11pIXRARA) foi interrompido pelo tratamento com 6 µg/mL durante 5 dias na cultura aderente em DMEM/F12 com 5% de FCS.

Exemplo 7: PIXRARA impede a inibição da replicação do vírus por interferon

[00068] Células NC5T11 e NC5T11 nº 34 foram semeadas em placas de 6 cavidades a $8,0 \times 10^5$ células/cavidade em DMEM/F12 5% de FCS. Após 12 h, adicionou-se interferon beta (rebif 44 da Serono) as

cavidades a uma concentração de 1 e 8 UI/mL. Após 30 min, as células tratadas com interferon e as células de controle tanto de NC5T11, quanto de NC5T11 nº 34 foram infectadas com vírus de encefalomiocardite (EMCV) a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,004. Após 24 h, as culturas foram colhidas e congeladas a -80°C para romper as células. Essa suspensão foi descongelada e clareada por centrifugação com $800 \times g$ durante 10 min. Os lisados foram submetidos a titulação de vírus por ensaio em placa com células A549: em resumo, as células A549 foram semeadas em placas de 24 cavidades e cultivadas até atingir a confluência, incubadas durante 30 minutos com lisados clareados diluídos de 10 a 2×10^8 vezes, superpostas com 0,2% de agarose de baixa formação de gel tipo VII em RPMI e 10% de FCS e incubadas a 37°C durante 24 h. A camada de agarose foi aspirada, as células foram fixadas com glutaraldeído a 2% em PBS durante 20 min a 20°C , lavadas com água e incubadas durante 30 min à temperatura ambiente com solução de 1% de violeta cristal em etanol a 50% para contar as placas de vírus. Os resultados mostrados na figura 9 demonstram que a replicação de EMCV é relativamente ineficaz em células NC5T11, e que é altamente sensível ao tratamento com interferon antes da infecção. A 8 UI/mL, nenhum vírus viável pode ser recuperado da cultura. Em contraste, a replicação de vírus em NC5T11 nº 34 é afetada apenas levemente pelo tratamento com interferon. Além disso, mesmo na ausência de IFN exógeno, títulos mais elevados são observados para NC5T11 nº 34. Os fenômenos mostrados modelam processos de vacina típicos, porque muitas cepas de vacina induzem uma resposta de IFN em células produtoras, com uma via de IFN intacta, infecção a baixa multiplicidade de infecção (MOI), preferida em processos de produção, pode causar secreção de IFN, resultando em um bloqueio da replicação de vírus em células que não foram inicialmente infectadas. Consequentemente, a expressão de PIX pode

permitir uma produção de altos títulos de vírus, partindo-se de baixa MOI.

Exemplo 8: Estimulação da produção de proteínas por pIX-RARA

[00069] NC5T11 puro nº 8 pIXRARA veículo do vetor F67, assim como alfa-1-antitripsina, foram comparadas ao clone de partida NC5T11 puro nº 8 na capacidade de produzir alfa-1-antitripsina em um ensaio por bateladas com agitação. As células foram semeadas em EXCELL VPRO (JRH Biosciences) a 6×10^4 células/mL em tubos de agitação de polipropileno de 50 mL (TPP, Suíça), com um volume total de 12 mL, e submetidas a rotação com um raio de 1 cm e uma velocidade de 160 rpm. A cultura foi continuada até o dia 22. Além das células em suspensão, formou-se um anel de aglomerados celulares aderidos à parede do tubo. As células nesses aglomerados preservaram uma viabilidade acima de 70% durante todo o processo. Como a dissociação desses aglomerados por tripsina ou acutase (PAA) não foi bem-sucedida, as cinéticas de crescimento e as densidades celulares máximas não foram determinadas. As amostras foram tiradas nos dias 9, 13 e 22, e os títulos foram determinados usando-se ELISA de alfa-1-antitripsina. Os resultados são mostrados na figura 10.

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

[00070] A linhagem celular CR, derivada de células de retina de pato primárias e imortalizadas de acordo com diretrizes de risco definidas, é descrita em outro lugar (pedido de patente WO 05042728, células de retina transfectadas com plasmídeo 60E). As células foram cultivadas em meio DMEM F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, EUA) suplementado com 5% de soro de novilho fetal (Biocrom AG, 12213 Berlim, Alemanha) a 39°C e 7,5% de CO₂. Para a passagem, as células foram brevemente tratadas com TrupLE Express (Invitrogen). O plasmídeo 76F pEFPIX1 foi linearizado com as enzimas de restrição

Ssp I e Xmn I (ambas da New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, EUA) e purificado a 400 ng/ μ L por cromatografia de afinidade (kit de extração em gel da Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha). 5 μ L (2 μ g) do DNA purificado foram transfectados em células CR com os reagentes Effectene (Qiagen): o DNA foi misturado com 16 μ L de intensificador e 200 μ L de tampão EC. Depois de 2 min à temperatura ambiente, 18 μ L de Effectene foram adicionados, e a formação de lipossomo foi deixada durante 10 min à temperatura ambiente. A mistura de transfecção foi adicionada a 1 mL de volume de cultura em células semeadas a 80% de confluência em placas de 6 cavidades no dia anterior. A alta eficiência de transfecção foi confirmada com transfecção paralela de pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA 94303-4230, EUA).

[00071] As culturas transfectadas com pIX foram expandidas em balões T75 três dias após a transfecção, e a seleção foi iniciada com 25 μ g/mL de higromicina B (Invitrogen). O meio foi substituído uma vez por semana com higromicina B elevada a 50 μ g/mL. Após três semanas, um total de quatro grandes focos sobreviveram e foram ressemeados em um balão T25: as células foram destacadas com TrypLE e coletadas com 100 x g durante 10 min, ressuspendidas em meio fresco e plaqueadas em um balão T25.

[00072] Quatro semanas após a transfecção, as células e uma cultura subconfluente saudável em um balão T25 foram destacadas com TrypLE em 5 mL de DMEM F12, 5% de FCS. 2 mL dela foram misturados com meio nº 63032-1000M (JRH Biosciences, KS 66215, EUA), um meio livre de componentes derivados de animais destinado à manutenção de culturas em suspensão. Adicionou-se higromicina B a 50 μ g/mL. O DNA genômico foi isolado de 2 mL da cultura e submetido a PCR contra o transgene pIX com os iniciadores V293 e V294. O controle negativo foi fornecido por uma reação paralela sem DNA, o controle positivo por uma reação paralela com plasmídeo 76F. O

produto de PCR esperado na figura 11 (painel esquerdo) demonstra a inserção estável do transgene pIX nas células CR, agora chamadas de "CRpIX".

[00073] A expressão da proteína PIX foi confirmada por Western Blotting: 6×10^5 células foram rompidas por ebulição em (20 mM de Tris, pH 7,4, 300 mM de NaCl, 1% de Na-desoxicolato, 1% de Triton® X-100, 0,1% de SDS), e a proteína foi separada por eletroforese em gel, então, transferida para uma membrana de náilon. PIX foi detectada com anticorpo primário para pIX (um presente do Dr. W. Seidel, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Alemanha), então, reagida com anticorpo secundário dirigido contra o primeiro anticorpo e marcado com fosfatase alcalina.

[00074] O sinal de tamanho esperado na figura 11 (painel direito) confirma a expressão de pIX em células CRpIX. Nenhum sinal estava presente no controle negativo das células 293 preparadas em uma reação paralela.

[00075] As células foram cultivadas em meio nº 63032-1000M por duas passagens adicionais, então, transferidas para meio nº 14561-1000M (também da JRH Biosciences) por duas passagens adicionais. Todos os meios JRH foram suplementados com 1 x Glutamax I (Invitrogen) e 100 µg/mL de higromicina B.

[00076] Com a segunda passagem em meio nº 14561-1000M, uma pequena fração (aproximadamente 2% de uma cultura em suspensão de 5 mL) foi ressuspendida completamente em DMEM:F12, meio FCS e plaqueada em uma placa de petri de 15 cm de diâmetro. Após 6 dias, onze focos foram removidos para cavidades individuais de uma placa de 12 cavidades e mantidos em DMEM F12, meio FCS. Para a transferência de clone, o meio foi aspirado, e placas de clonagem (Sigma, MO, EUA) foram embebidas em TrypLE, brevemente aplicado diretamente aos clones, então, transferido para as cavidades cheias de

meio. Os clones individuais foram expandidos para experimentos adicionais e determinação de propriedades de crescimento.

[00077] Para analisar a manutenção de PIX nas células transfectadas de maneira estável, o DNA genômico foi isolado de 1×10^6 células com o kit QIAamp DNA Sangue (Qiagen), e o número de moléculas de E1B e PIX foi determinado em 25 ng e 50 ng de DNA genômico, em uma reação ABI 7000 TaqMan com química de detecção SYBR Green (ABI). Os iniciadores usados para a quantificação foram gTggTTgCTTCATgCTAgTg (SEQ ID NO: 13) e TCTTCAGCAggTgACAgTTg (SEQ ID NO: 14) para E1B, ACCTACgAgACCgTgTCTg (SEQ ID NO: 15) e gAgCCgTCAACTTgTCATC (SEQ ID NO: 16) para PIX. Como o E1B foi introduzido independentemente e tem de ser mantido nas células para sobreviver, esse gene serve de marcador interno para padronizar o número de cópias de PIX e a força de expressão do gene.

[00078] A figura 12 demonstra a manutenção estável do transgene PIX em células CR em suspensão, mesmo na ausência de pressão de seleção. Também demonstra que células positivas para PIX sofrem de uma diminuição de crescimento. Observou-se consistentemente proliferação diminuída para todas as nossas células (células de aves e humanas) com a transfecção estável com o plasmídeo de expressão de PIX, demonstrando um impacto de PIX sobre a bioquímica da célula hospedeira. Além disso, observou-se uma tendência em células CR aderentes positivas para PIX de evitar o crescimento em camadas confluentes (inibição por contato aumentada).

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

[00079] A linhagem celular CS é derivada de somitos embrionários, também descritas no pedido de patente WO 05042728. A geração de células CS positivas para PIX foi realizada em paralelo ao procedimento

acima descrito para a linha CR. Contrariamente a CRpIX, nenhuma cultura em suspensão foi estabelecida para CSpIX. A dependência de ancoragem estrita é uma característica de células CS. Uma célula que não se prolifera em suspensão pode ser considerada como sendo menos tumorigênica, pois o potencial de metastatizar é gravemente prejudicado. A proteína PIX não altera essa propriedade em células CS. Embora pleotrópica, essa proteína parece, portanto, não ter impacto sobre o fenótipo de transformação. Essa observação sustenta nossa consideração de que PIX pode ser aplicado com segurança em processos biofarmacêuticos.

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

[00080] Células CS transfectadas de maneira estável para expressão de PIX e células CS de origem como referência foram semeadas em uma placa de 6 cavidades a 2×10^6 células/cavidade e infectadas com MVA a uma M.O.I. de 0,1 no dia seguinte. Fotografias para documentar as diferenças no avanço de CPE foram tiradas 48 h e 72 h após a infecção. O rendimento de vírus no sobrenadante 48 h após a infecção e o rendimento completo (sobrenadante mais pélete de células lisadas) 72 h após a infecção foram determinados em um ensaio de microfoco. Os resultados são mostrados na figura 13: a presença de PIX nas células CS parece retardar o início de CPE 48 h após a infecção, quando comparado com a referência de origem. 72 h após a infecção, ambas as culturas são lisadas completamente, sugerindo que as diferenças na extensão de CPE não é derivada a uma mistura de células refratárias a MVA e suscetíveis a MVA na população de CS.PIX.

[00081] Segundo nosso conhecimento, células positivas para PIX nunca foram testadas contra vírus diferentes de adenovírus cognatos.

Exemplo 12: Efeito de PIX sobre a replicação de MVA em células CR

[00082] O efeito positivo da proteína PIX também foi quantificado em células CR. Contrariamente às células CS, as células CR estão

adaptadas à suspensão. As culturas em suspensão são preferíveis para muitas aplicações industriais. Consequentemente, determinamos o efeito de PIX nesse sistema, em oposição a uma cultura aderente.

[00083] Para células CR, o efeito de suporte de PIX não é tão pronunciado quanto em células CS, mas observou-se consistentemente títulos mais elevados para MVA. Os rendimentos de MVA foram otimizados em uma série de experimentos e se mostraram maiores 48 h após a infecção a densidades celulares médias. A figura 14 mostra uma comparação da suspensão de clone CR.HS (selecionado de vários clones como a linhagem celular com maiores rendimentos de MVA) e linhagem celular CR.MCX PIX(+). A abscissa indica M.O.I. (0,01, 0,05 ou 0,1, respectivamente), a ordenada indica o arrebetamento, e o tamanho das bolhas indica as densidades celulares ($8, 2$ ou $0,8 \times 10^6$ células/mL, respectivamente). O arrebetamento é a razão de vírus de saída (ou rendimento) para vírus de entrada (o inóculo, dependendo do número de células e da M.O.I.) e, portanto, uma medida da eficiência de amplificação. Em todas as configurações, as linhagens celulares PIX(+) excedem a linhagem PIX(-) em desempenho.

Exemplo 13: Exclusão nuclear de PIX

[00084] Um gene de fusão PIX-GFP foi gerado para visualizar a distribuição da proteína PIX em células vivas e superar a atividade de ligação fraca do anticorpo disponível. Plasmídeo 76F pEFPIX1 foi tratado com as enzimas de restrição Acc I e Dra I, e as terminações foram embotadas com polimerase Klenow (todos da New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, EUA). Do padrão de bandas complexo, o fragmento desejado de 447 pb contendo a sequência de codificação de PIX foi isolado por extração em gel de agarose (kit de extração em gel da Qiagen, 40724 Hilden, Alemanha). A enzima de restrição Dra I reconhece a sequência "TTTAAA", para cortar depois do último resíduo de timidina, em que o tripleto central "TAA" é o códon de

parada do quadro de leitura aberto de PIX. O fragmento de 447 pb é, portanto, desprovido de um códon de parada. A fusão desse fragmento ao gene para EGFP no plasmídeo pEGFP-N1 aberto com Sma I (também da New England Biolabs) gera um gene de fusão contínuo de PIX seguido por EGFP. O plasmídeo resultante foi chamado de p9GFP, a proteína de fusão expressada sendo chamada de PIX-GFP neste texto.

[00085] Células CS e CR foram transfectadas com p9GFP e selecionadas com 300 µg/mL de geneticina (Invitrogen) para expressão estável de PIX-GFP. Duas populações de diferentes expressões de PIX-GFP foram observadas em até 2 semanas: uma população normalmente tinha 2 a 5 pontos brilhantes de PIX-GFP no citoplasma, a outra população tinha uma expressão mais uniforme de PIX-GFP no citoplasma e acumulação mais difusão do sinal de GFP em uma região proximal ao núcleo. Em ambos os casos, os núcleos das células pareciam uma região escura, sugerindo que nenhuma ou muito pouca proteína quimérica entra no núcleo. Exemplos representativos de ambos os tipos de clones em CRPIXGFP são mostrados na figura 15.

[00086] Consistente com esse resultado, descobriu-se uma sequência de exportação nuclear no quadro de leitura aberto de PIX por aplicação do algoritmo de pesquisa NetNES (Cour *et al.*, Protein Eng. Des. Sel. 17, 527-536 (2004)) para a sequência primária de PIX. O NES identificado por esse programa é 313-GCACAATTGGATTCTTTGACCCGGGAATT-342 (SEQ ID NO: 17)

(traduzido: AQLDSLREL; SEQ ID NO: 18). Segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que esse sinal foi descrito na proteína PIX. Inversamente, uma sequência de localização nuclear (NLS) não foi descrita na literatura para PIX, e não podemos detectar esse sinal (por exemplo, usando o algoritmo fornecido pela Universidade de Columbia em <http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>).

[00087] A localização citoplasmática de PIX-GFP em nossas células de pato é, portanto, consistente com a sequência primária de PIX.

Exemplo 14: Variantes de fusão PIX GFP

[00088] A surpreendente exclusão nuclear de PIX GFP foi investigada com constructos de fusão com PIX adicionais. Um plasmídeo de expressão de PIX-GFP-NLS foi derivado do constructo p9GFP acima descrito por inserção dos oligonucleotídeos sintéticos i185 e i186. Esses oligos foram desnaturados a 80°C durante 5 min e deixados anelar em 10 mM de MgCl₂ por resfriamento gradual à temperatura ambiente, para fornecer:

5'-GATGTACAAAGATCCGAAGAAGAACCGCAAAGGTTAACGCGGCCGCAC-3'

(SEQ ID NO: 19)

3'-CTACATGTTTCTAGGCTTCTTCTTGCGTTTCCAATTGCGCCGGCGTG-5'

(SEQ ID NO: 20)

[00089] Esse oligonucleotídeo de filamento duplo foi digerido com BsrG I e Not I e inserido nos mesmos sítios de p9GFP. Traduzida, a inserção adiciona uma sequência NLS (PKKNRK; SEQ ID NO: 21) à proteína de fusão PIX-GFP que se assemelha ao vírus símio 40 NLS. Um novo sítio Hpa I introduzido com esse enxerto serve de marcador diagnóstico para confirmar uma clonagem bem-sucedida. O plasmídeo resultante é chamado de p9GFP NLS, a proteína expressada PIX-GFP-NLS, e o quadro de leitura aberto que codifica a proteína PIX-GFP-NLS são mostrados nas SEQ ID NOs: 23 e 22, respectivamente.

[00090] Uma proteína de fusão PIX-RARA etiquetada com GFP foi gerada mediante amplificação com PCR de um fragmento contendo PIX-RARA com os iniciadores EBR 44A (5'-GGATCCTTCCTCCTCGGGCGGGTGT-3'; SEQ ID NO: 24), V293 (5'-AACCAGCGCTACCATGAGCACCAACTCGT-3'; SEQ ID NO: 25) e plasmídeo nº 67F pEF PIX RARA NEO como molde. O amplicon de 1.926 pb foi tratado com polinucleotídeo quinase e inserido em pEGFP-C2

(Clontech) linearizado com EcoR I e embotado com enzima Klenow (todas as enzimas da New England Biolabs). O plasmídeo resultante é chamado de p9 GFP RARA, a proteína expressada de PIX GFP RARA. [00091] A figura 16 mostra a distribuição intracelular das várias proteínas etiquetadas com GFP em células CHO transitoriamente transfectadas.

Exemplo 15: PIX e interferon

[00092] Muitos vírus induzem a resposta imune celular inata mediante TLR-3 (receptor 3 do tipo Toll). TLR-3 reconhece RNA de filamento duplo, um padrão distintivo da replicação viral. Entre as funções de TLR-3 está a ativação de NFkB e interferon do tipo I (Alexopoulou *et al.*, Nature 413, 732-738 (2001)). O interferon medeia um estado antiviral na célula hospedeira. O efeito da indução com interferon mediante um RNA de filamento duplo artificial, poli I:poli C (ácido poliinosínico-policidídílico, Sigma) foi examinado. Surpreendentemente, as células CR e CRpIX apresentavam sensibilidade muito baixa a poli I:poli C, ao passo que as células CS responderam claramente ao indutor. Inesperadamente, células CS positivas para PIX responderam mais rápido e a concentrações mais baixas do que células CS de origem (figura 17). Segundo nosso conhecimento, uma conexão entre PIX e interferon não havia sido descrita na atual literatura.

[00093] O efeito de suporte de PIX para MVA foi mais forte em células CS do que em células CR, e as células CS responderam ao substituto de RNA de filamento duplo melhor do que células CR. Sabe-se que MVA induz interferon, e que esse vírus também está equipado com proteínas que aliviam a resposta de interferon. O efeito do indutor poli I:poli C sobre MVA em células CRp9GFP e CSp9GFP foi, portanto, determinado. A figura 18 sugere que células infectadas com MVA sofrem menos com poli I:poli C do que o controle não infectado. Essa

observação é consistente com o fato de que MVA tanto induz, quanto interfere com a resposta imune celular inata e se relaciona com nossa observação inesperada de que PIX de um adenovírus humano em células de aves coopera com proteínas antivirais de um vírus de varíola altamente atenuado para aumentar os rendimentos desse último vírus.

Listagem de Sequência – Texto Livre

SEQ ID NO	Descrição
1, 2	proteína pIX adenoviral
3, 4	proteína de fusão pIX-RARA
5	Ad5 E1A + E1B
6 – 11	iniciador
12	promotor do fator 2 de alongamento da tradução humano "curto"
13 – 16	iniciador
17 – 18	NES
19 – 20	oligonucleotídeos sintéticos que codificam NLS
21	NLS
22 – 23	proteína de fusão pIX-GFP-NLS
24 – 25	iniciador

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de um vírus alvo não adenoviral ou uma ou mais proteína(s) alvo que não é(são) relacionada(s) a Adenovírus, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) o cultivo de uma célula de expressão de vertebrado imortalizada que possui integrado de maneira estável em seu genoma, um gene que codifica PIX de Adenovírus que apresenta uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2, como uma proteína reguladora heteróloga, e expressa de forma estável a referida proteína reguladora, e é infectada ou transfectada com um vírus alvo não adenoviral, com um vetor portador de sequências de ácidos nucleicos que codificam o referido vírus, ou com um vetor portador de sequências de ácidos nucleicos que codificam a referida uma ou mais proteína(s) alvo que não é(são) relacionada(s) a Adenovírus, e

(b) o isolamento do vírus alvo não adenoviral ou da(s) proteína(s) alvo que não é(são) relacionada(s) a Adenovírus.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) a proteína reguladora heteróloga é expressa na célula de expressão de vertebrado imortalizada em uma quantidade de pelo menos 1 pg/μg de proteína celular, de preferência em uma quantidade de pelo menos 10 pg/μg de proteína celular; e/ou

(ii) a proteína reguladora heteróloga está sob controle de um promotor homólogo ou heterólogo estável, de preferência o referido promotor é um promotor celular constitutivo, mais preferivelmente é um promotor do fator 2 de alongamento de translocação humano.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

(i) a célula de expressão de vertebrado imortalizada é portadora de genes de imortalização (virais) adicionais, incluindo uma

proteína E1 de adenovírus, de preferência do grupo C de mastadenovírus tipo 5, mais preferivelmente a célula é portadora do gene E1A e/ou E1B de adenovírus mostrado na SEQ ID NO: 5; e/ou

(ii) a célula de expressão de vertebrado imortalizada também é portadora de sequências funcionais, como sequências marcadoras de seleção, sítios doadores/receptores de junção e/ou sequências de reconhecimento de recombinase, que permitam a integração de uma sequência de ácido nucléico alvo a ser expressada na célula.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que:

(i) o vírus alvo é selecionado de vírus mutantes ou deletados de tipo selvagem, vírus adaptados ou atenuados do resfriado, cepas de vacina, vetores virais portadores de gene(s) heterólogo(s), vetores virais como lentivírus, vírus de varíola, incluindo um vírus de varíola bovina, como Varíola Bovina Ankara Modificada, varíola de aves ou vírus de varíola de canários, e um vírus adeno associado (aav);

(ii) a uma ou mais proteínas alvo são selecionadas de anticorpos, proteínas recombinantes, como eritropoetina, alfa-1-antitripsina, fatores de coagulação sanguínea VIII e IX e interferons, antígenos virais, como HA e NA de influenza, HBV-S, proteína G de herpes e proteína G de raiva, e hormônios peptídicos.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a célula de expressão de vertebrado imortalizada é derivada de um cérebro humano, de preferência de cérebro fetal humano e, mais preferivelmente, é uma célula NC5T11, e a referida célula é portadora de uma sequência de ácido nucléico que codifica PIX de Adenovírus como uma proteína reguladora heteróloga, em que a sequência de ácido nucléico é mostrada na SEQ ID NO: 1.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado

pelo fato de que a célula de expressão de vertebrado imortalizada é derivada da célula NC5T11 nº 34, a referida célula NC5T11 nº 34, estando depositada no DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2744.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a célula de expressão de vertebrado imortalizada é uma célula de ave, de preferência é derivada de retina de pato ou de somito de pato, e a referida célula é portadora de uma sequência de ácido nucléico que codifica PIX de Adenovírus como uma proteína reguladora heteróloga, em que a sequência de ácido nucléico é mostrada na SEQ ID NO: 1.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a célula de expressão de vertebrado imortalizada é derivada da célula CR.PIX (17a11b), a referida célula CR.PIX (17a11b) estando depositada no DSMZ sob o número de acesso DSM ACC2749.

9. Método para a preparação de uma célula de expressão de vertebrado imortalizada, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(i) fornecer uma célula hospedeira de vertebrado imortalizada apresentando integrado de forma estável em seu genoma um gene que codifica para PIX de Adenovírus que apresenta uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 como uma proteína reguladora heteróloga e expressa de forma estável a referida proteína reguladora heteróloga, e

(ii) infectar ou transfectar a célula hospedeira de vertebrado imortalizada com um vírus não adenoviral, ou com um vetor portador de sequências de ácidos nucléicos que codificam o referido vírus ou com um vetor portador de sequências de ácidos nucléicos que codificam a referida uma ou mais proteína(s) alvo que não é(são) relacionada(s) a Adenovírus.

10. Uso de uma célula de expressão de vertebrado

imortalizada, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um vírus alvo não adenoviral ou de uma ou mais proteínas alvo que não é(são) relacionada(s) a Adenovírus, em que a referida célula de expressão de vertebrado imortalizada:

(i) integrou de forma estável em seu genoma um gene que codifica para PIX de Adenovírus que apresenta uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 2 como uma proteína reguladora heteróloga e expressa de forma estável a referida proteína reguladora heteróloga, e

(ii) é infectada ou transfectada com um vírus alvo não adenoviral, com um vetor portador de sequências de ácido nucleico que codificam o referido vírus, ou com um vetor portador de sequências de ácido nucleico que codificam uma ou mais proteína(s) alvo, que não é(são) relacionado ao Adenovírus.

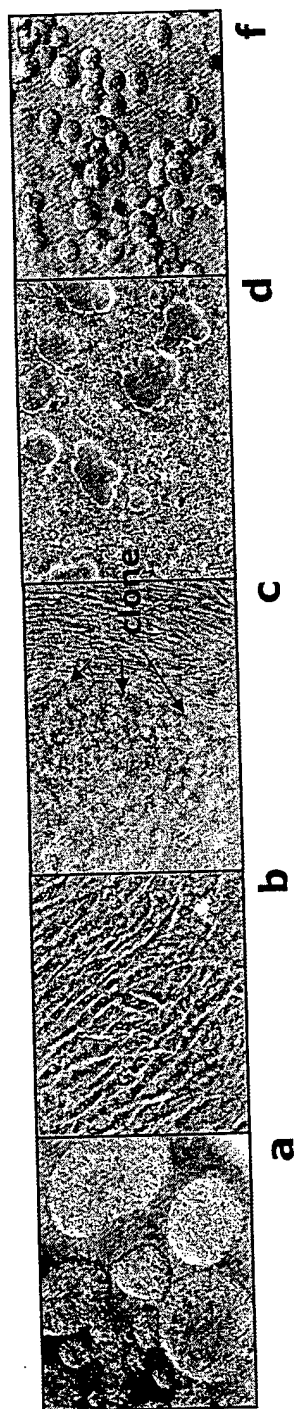


Fig. 1

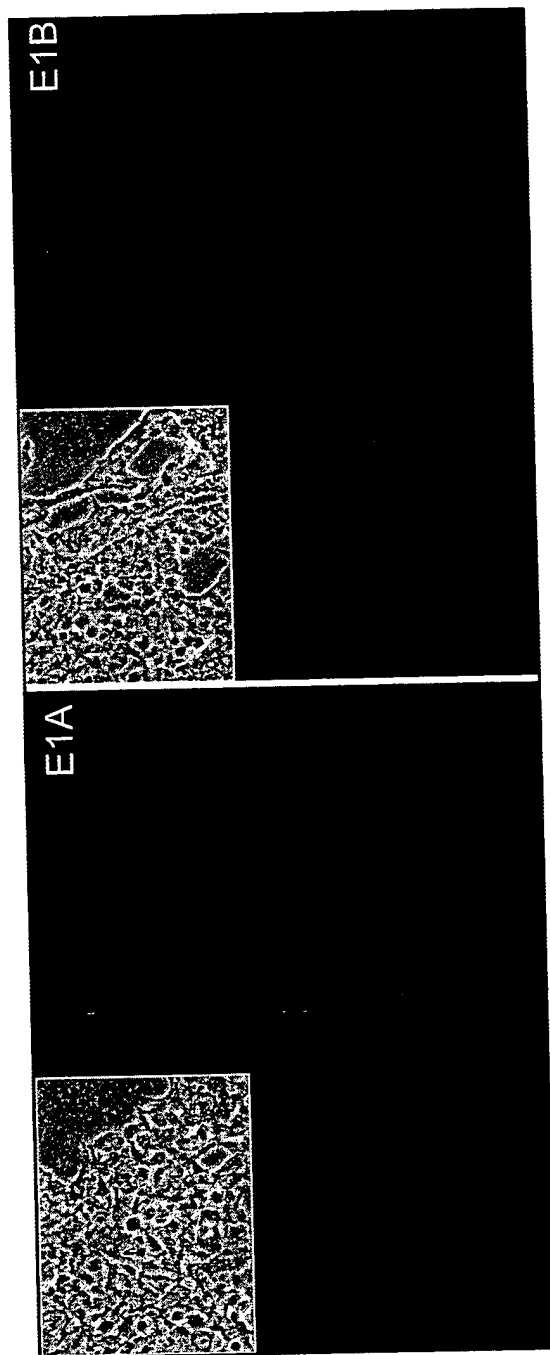
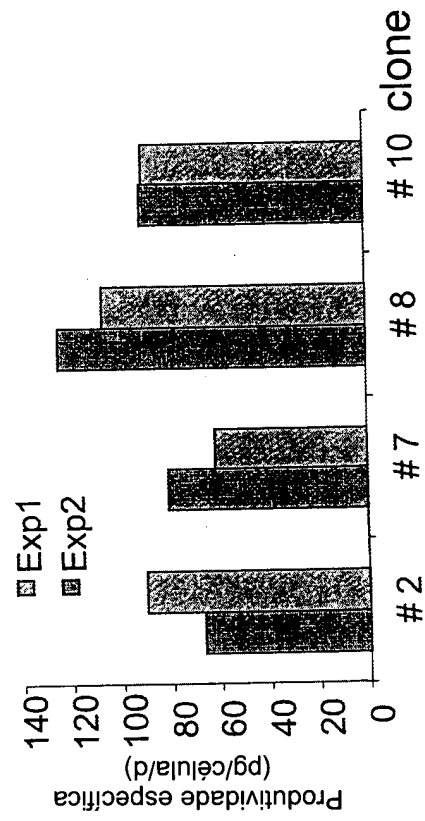


Fig. 2

**Fig. 3**

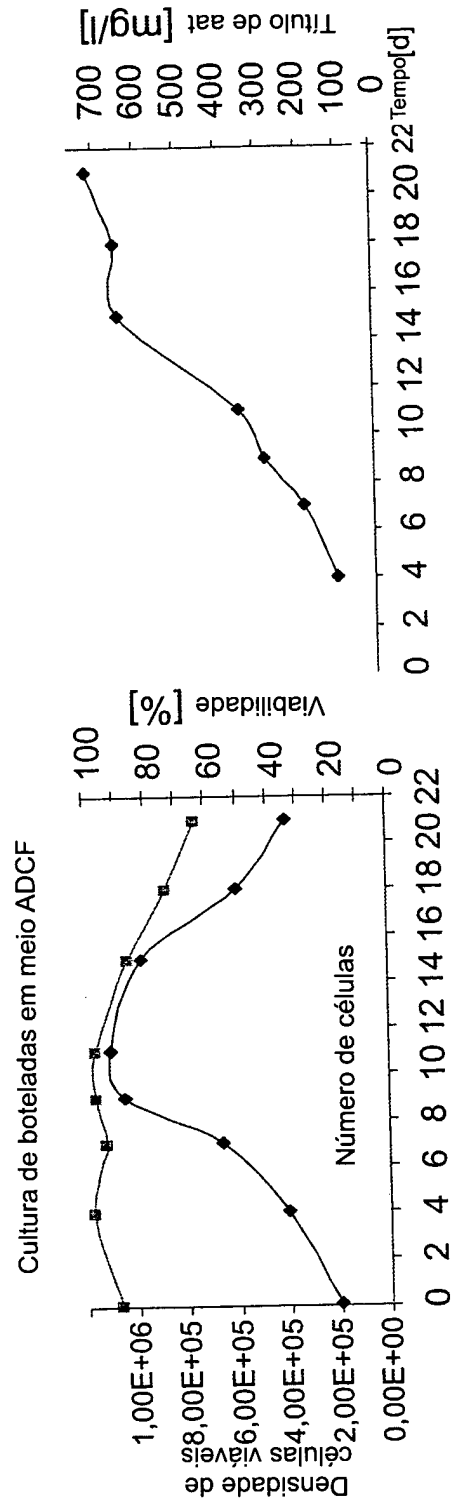


Fig. 4

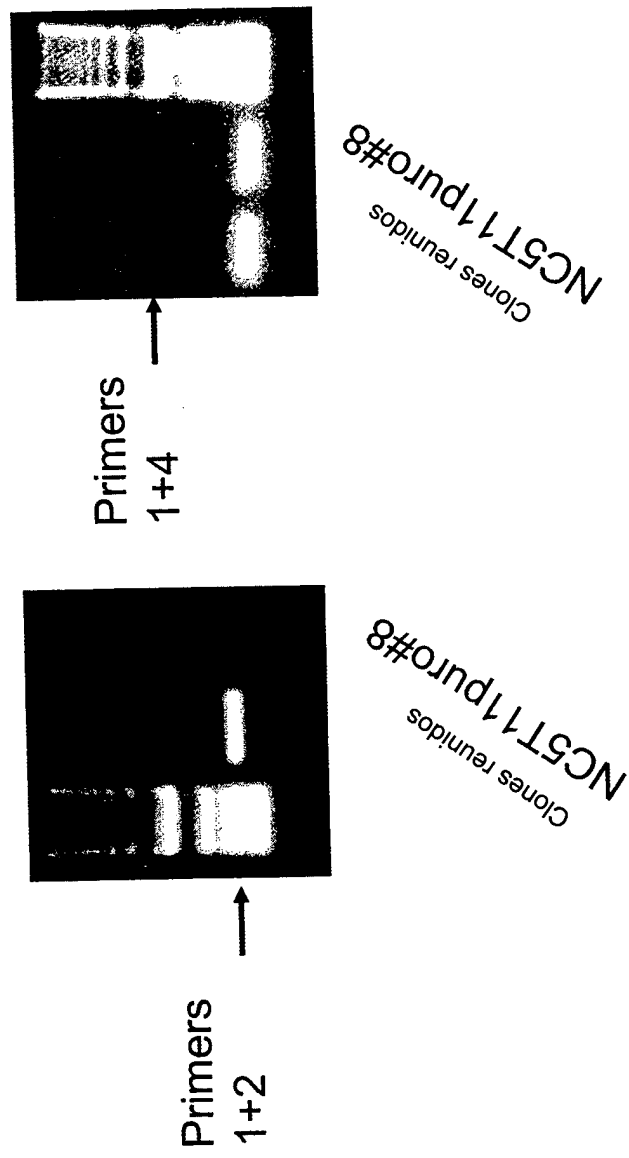


Fig. 5

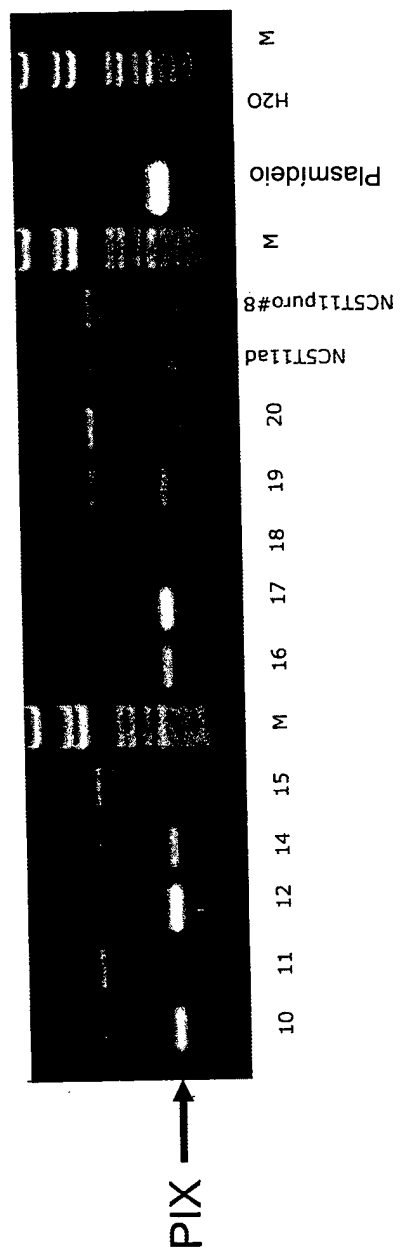


Fig. 6

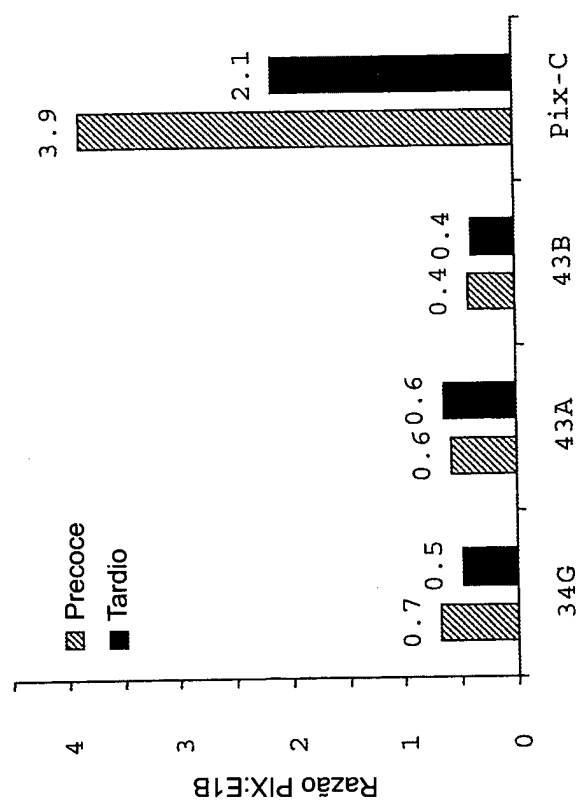


Fig. 7

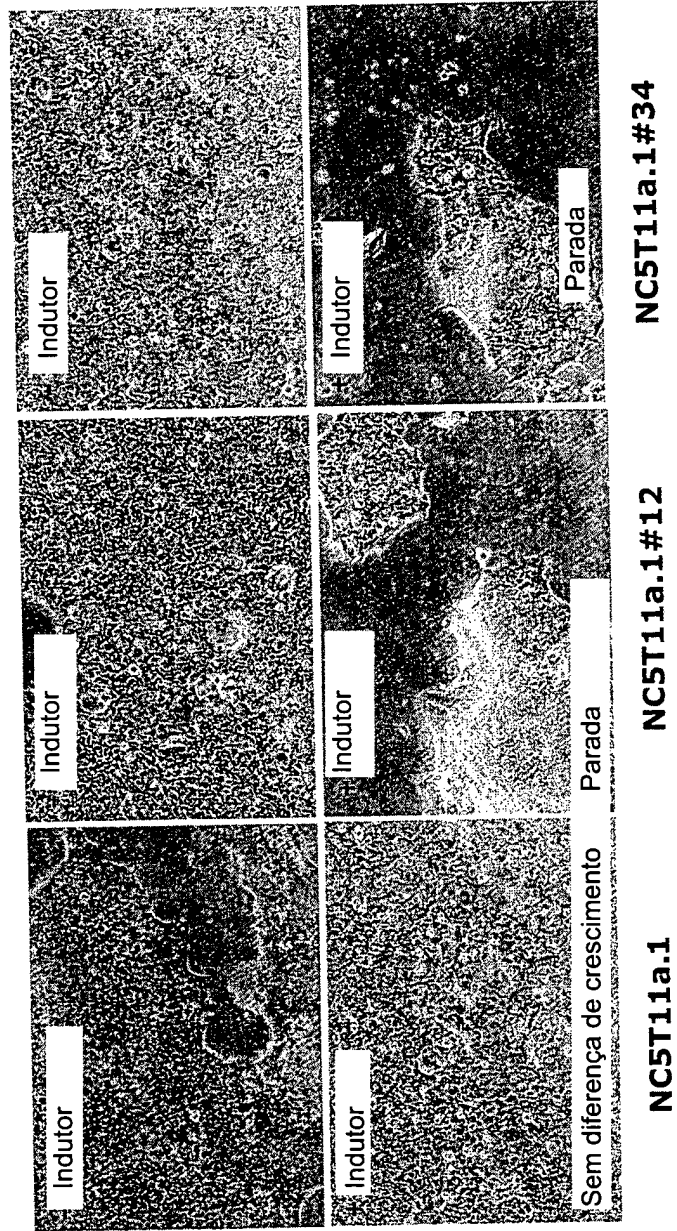


Fig. 8

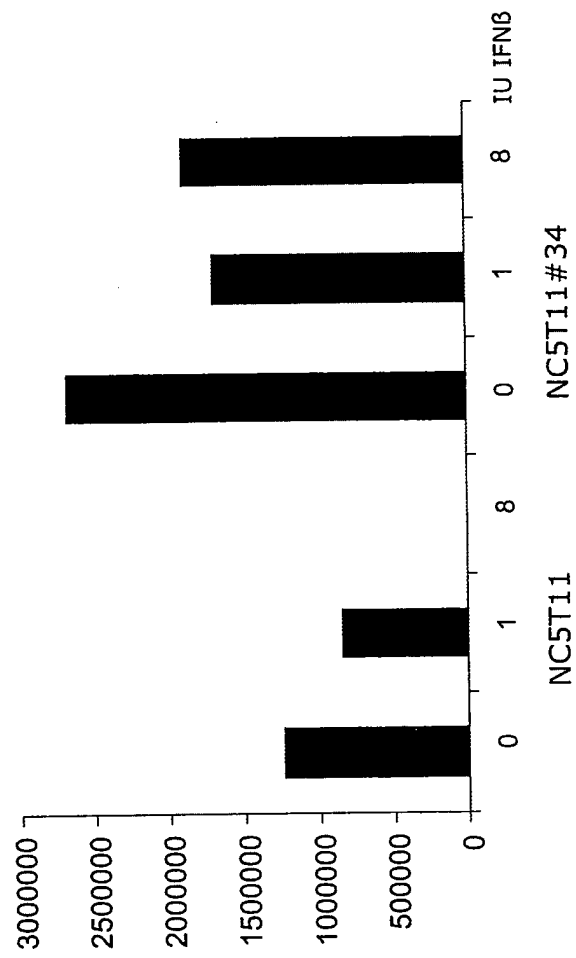


Fig. 9

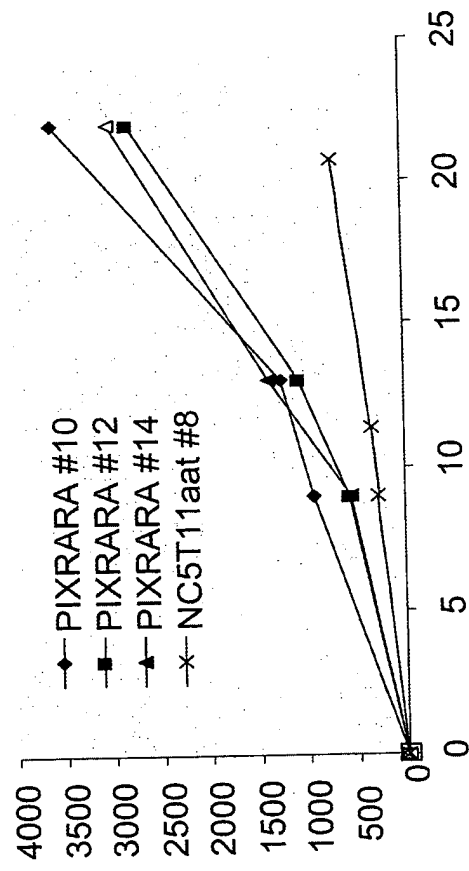


Fig. 10

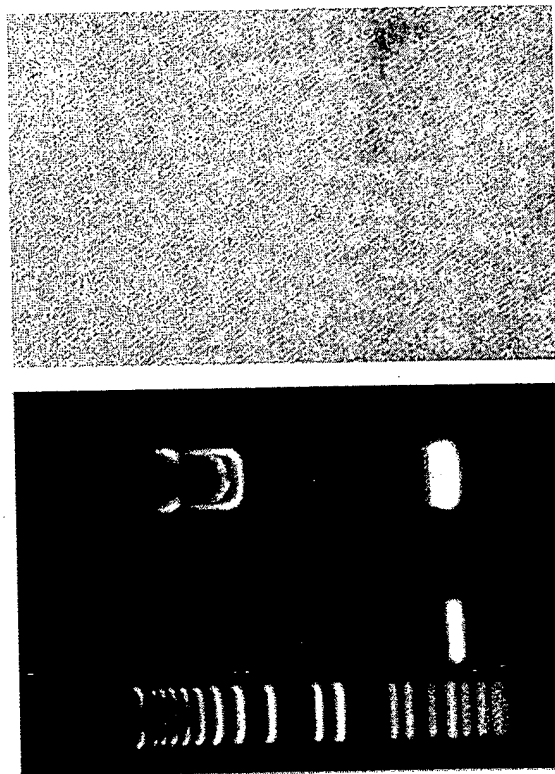


Fig. 11

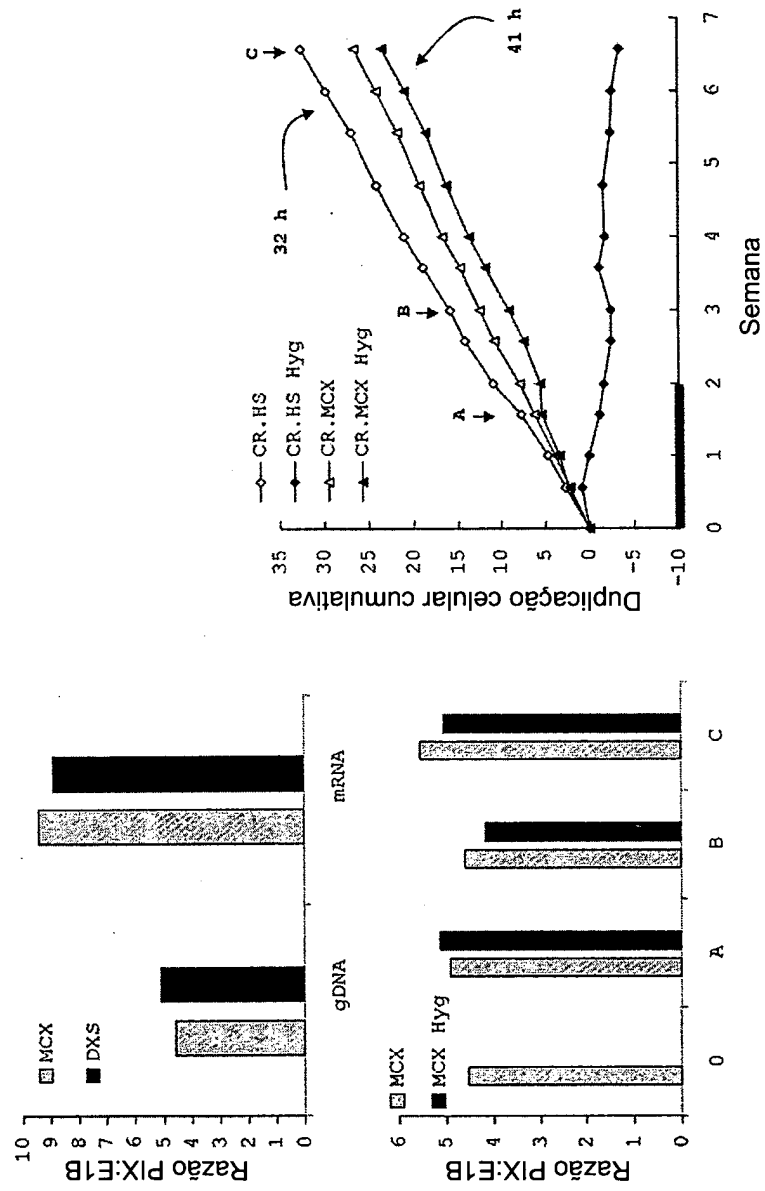


Fig. 12

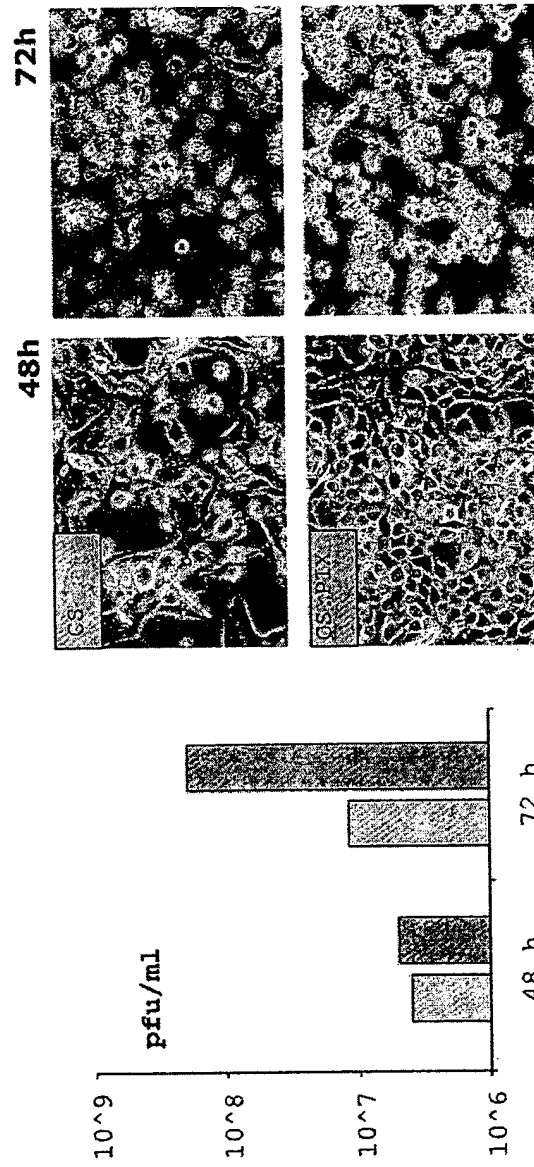


Fig. 13

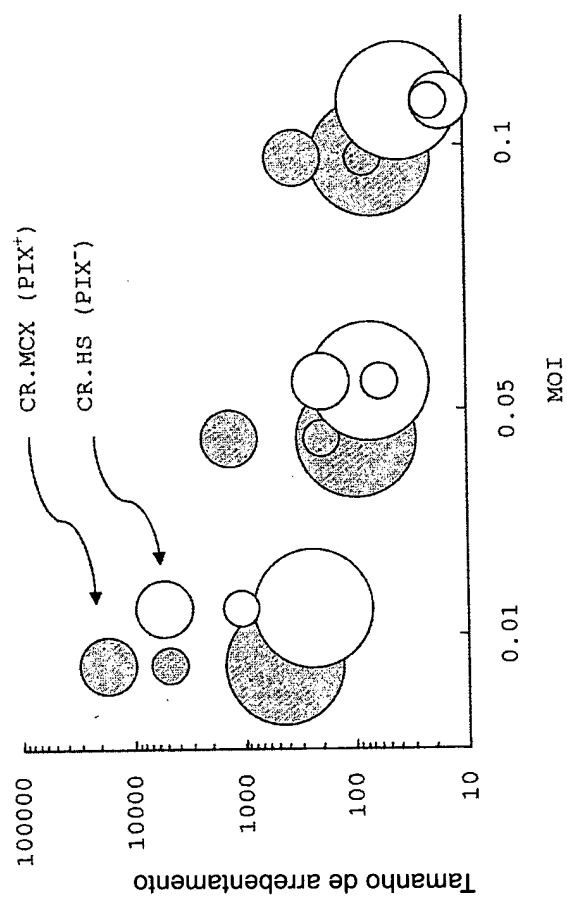


Fig. 14

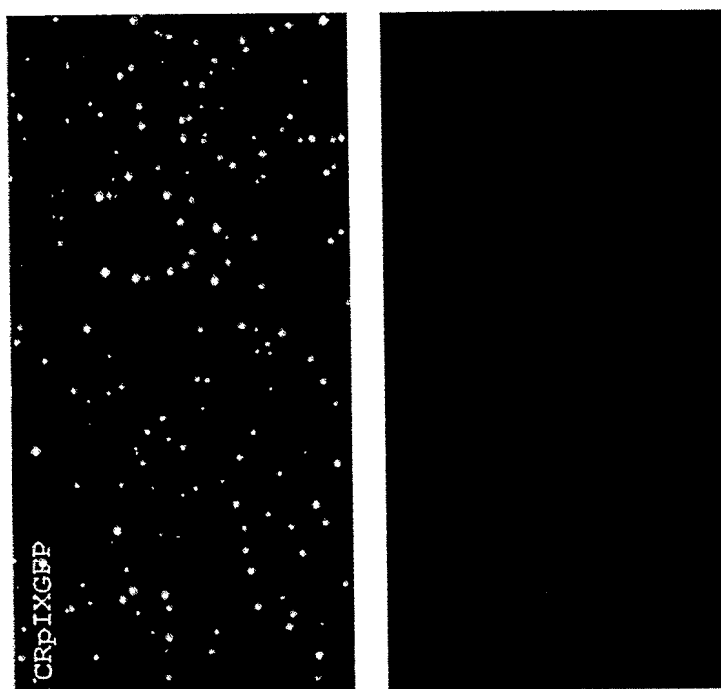
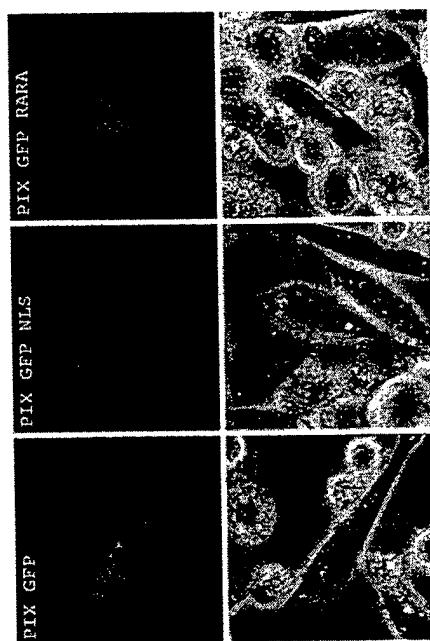


Fig. 15

**Fig. 16**

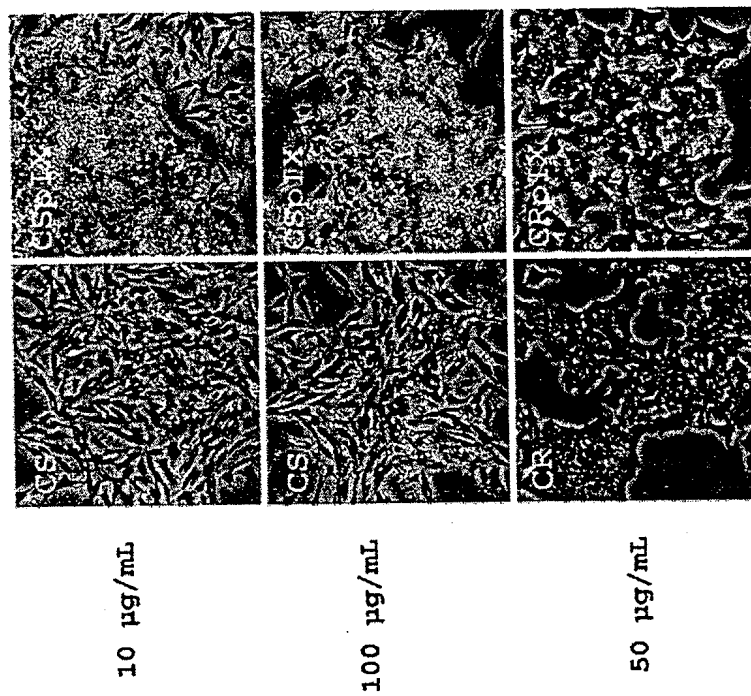


Fig. 17

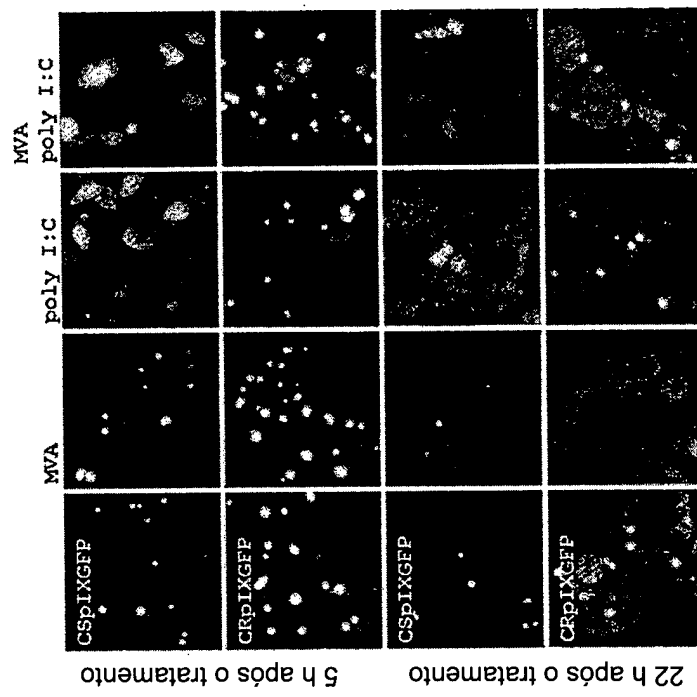


Fig. 18