

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 112**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/GB2015/052493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15757557 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3186382**

54 Título: **Método y medios para purificar vectores retrovíricos**

30 Prioridad:

29.08.2014 GB 201415344

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2021

73 Titular/es:

**AUTOLUS LIMITED (100.0%)
Forest House, 58 Wood Lane
London W12 7RZ, GB**

72 Inventor/es:

**PULÉ, MARTIN;
MEKKAOUI, LEILA y
CHEUNG, GORDON WENG-KIT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 818 112 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y medios para purificar vectores retrovéricos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los vectores retrovéricos. En particular, la invención se refiere a métodos para la producción de vectores lentivéricos, células productoras y proteínas marcadoras para su uso en tales métodos.

10

Antecedentes de la invención

Los vectores retrovéricos son relevantes para una variedad de aplicaciones, incluida la terapia génica. Sin embargo, el progreso en la terapia génica lentivérica, por ejemplo, se ha visto obstaculizado por el requisito de producción de vectores lentivéricos purificados con títulos elevados.

15

Los vectores lentivéricos se generan típicamente mediante una célula de empaquetamiento que libera partículas de vector en el sobrenadante. Dado que los vectores lentivéricos son lábiles, los métodos de purificación posteriores deben usar condiciones fisiológicas (o no rigurosas) tanto como sea posible para maximizar la recuperación del vector. Además, la metodología debe ser escalable y rentable.

20

En la actualidad, las partículas lentivéricas se purifican normalmente a partir del sobrenadante mediante ultracentrifugación. Este es un proceso laborioso, que solo proporciona un 40 % de recuperación vírica y no se puede escalar fácilmente. Se han explorado otros métodos para la purificación, por ejemplo, ultrafiltración, que proporciona una recuperación del 50 % utilizando una membrana de 750 kda, centrifugación en gradiente de baja densidad o cromatografía de intercambio aniónico. Todos estos métodos son engorrosos, laboriosos y relativamente poco probados. Además, estos métodos dan como resultado la concentración de proteínas de la envoltura, así como otros componentes celulares que dificultan la infectividad del título vírico.

25

La cromatografía de afinidad se puede utilizar como método de captura de una sola etapa para la recuperación genérica de vectores víricos mediante la explotación de las interacciones entre estreptavidina y biotina. Nesbeth *et al.* (Molecular Therapy 2006, 13, 814-822) diseñó una nueva línea celular BL15 de empaquetamiento basada en 293T humana, que produce metabólicamente vectores lentivéricos marcados con biotina de forma espontánea que solo requieren biotina en el medio de cultivo. Esta tecnología de biotilación metabólica facilita la captura cromatográfica y de partículas paramagnéticas mediada por afinidad de partículas víricas.

30

35

Se ha descrito un sistema similar para adenovirus (Parrott *et al.* (2003) Mol. Ther. 8:688-700), en el que la proteína de la cápside de la fibra se fusiona genéticamente con un péptido aceptor de biotina, que se biotinila metabólicamente durante la producción del vector por la biotina ligasa endógena en las células 293.

40

Sin embargo, el valor de estos sistemas de biotilación para la purificación de vectores víricos en la fabricación es limitado por dos razones principales: dado que la afinidad de la biotina a la estreptavidina es muy alta, la posterior eliminación del virus de la matriz de estreptavidina es difícil y requiere condiciones rigurosas. Además, dado que estos métodos requieren la presencia de biotina, la biotina libre residual compite con la matriz de estreptavidina por unirse (Nesbeth *et al.* 2006 (como anteriormente); Williams *et al.* (2005) Biotechnology and Bioengineering 89: 783-787; y Williams *et al.* (2005) Journal of Chromatography B 820: 111-119).

45

También ha habido diversos informes de estrategias para ayudar a la purificación de vectores víricos recombinantes modificando la proteína de la envoltura vírica para incluir algún tipo de marcador.

50

El documento WO2007/095201 describe un vector vírico que comprende una proteína de envoltura vírica recombinante que consiste en una envoltura vírica de rhabdovirus, tal como VSV-G, diseñado con un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo se clona entre las unidades SU y TM de la envoltura. Las partículas víricas marcadas con péptidos se purifican posteriormente mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos.

55

El documento WO20141121005 describe un vector vírico que comprende una envoltura vírica marcada con epítipo mediante la cual los epítipos, CD118, V5 o HA, se clonan después del péptido señal o después de la región rica en prolina (PRR) de las glicoproteínas de la envoltura vírica. La posterior purificación del sobrenadante se basa en una centrifugación tras la recolección de partículas víricas marcadas con epítipo seguido de incubación con anticuerpos contra los tres epítipos. A continuación, las partículas purificadas se eluyen añadiendo el antígeno, es decir, el epítipo de los anticuerpos.

60

Ye *et al.* (2004, J. Virol. 78:9820-9827) diseñaron una envoltura de MLV marcada con péptido de unión a metal incorporando el péptido en una parte de la región hipervariable de la proteína vírica. La posterior purificación vírica implicó entonces cromatografía de afinidad de metal inmovilizado.

65

El documento WO20041000220 describe el marcaje de la proteína de pico de VSV-G mediante la inserción de un marcador de péptido His-6. A continuación, el virus se puede aislar y purificar mediante cromatografía de afinidad en columna o sedimentación con perlas magnéticas.

- 5 Una desventaja de tales sistemas es que la inserción de una proteína marcadora en el marco de lectura de una proteína de envoltura vírica puede alterar la integridad funcional de la proteína de la envoltura e impactar negativamente en el título vírico.

10 Este problema se ilustra mediante estudios destinados a la ingeniería genética de la glicoproteína de la envoltura vírica para la transducción vírica específica de células. La glicoproteína de la envoltura vírica del virus de la leucemia de Moloney (MLV) es la envoltura más comúnmente alterada para la transducción dirigida con modificaciones que incluyen: inserción de péptidos en dominios plegados previamente; expresión de péptidos como dominios adicionales; y péptidos fusionados directamente a la parte transmembrana de la envoltura.

15 Aunque algunos de estos estudios generaron envolturas quiméricas correctamente plegadas que pudieron unir su receptor específico en las células diana, la mayoría de las envolturas quiméricas sustituidas en N-terminal estudiadas hasta la fecha han tenido una incorporación vírica muy baja o ausencia de transducción de células diana. Por ejemplo, vectores gammaretrovíricos con proteínas de la envoltura modificadas al factor 1-alfa derivado de células estromales (Katane *et al.*, 2002 EMBO Rep. 3, 899-904. doi: 10.1093/embo-reports/kvf179) o un péptido de unión a integrina (Wu *et al.*, 2010 Cancer Res. 70, 9549-9553. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1760) demostraron tener eficacias de transducción deficientes.

25 La ingeniería genética de proteínas de la envoltura vírica tales como MLV, VSV-G y RD114, por lo tanto, sigue siendo un desafío técnico para el campo. Esto se debe a la delicada interacción entre los dominios de unión y fusión. Sus actividades dependientes, cuando se alteran por inserciones de péptidos, parecen inhibir la infección y, a su vez, afectar negativamente al título vírico. Esto es cierto para los métodos que implican la alteración de las glicoproteínas de la envoltura para marcar el vector para la purificación, así como para los métodos que implican la alteración de las glicoproteínas de la envoltura para permitir la transducción vírica específica de la célula.

30 Por tanto, existe la necesidad de métodos para producir y purificar vectores retrovíricos que no estén asociados con estas desventajas.

Descripción de las figuras

35 Figura 1: Prueba de la unión de un epítipo de unión a estreptavidina.
A. Diagrama esquemático de las secuencias de aminoácidos de los seis marcadores de unión a estreptavidina en un pedúnculo de CD8. Estas construcciones coexpresan la proteína verde fluorescente (eGFP) a través de una secuencia de entrada de ribosoma interna (IRES) aguas abajo de los primeros marcos de lectura abiertos. B. Las construcciones se transfectaron en células HEK 293T y se tiñeron con estreptavidina-APC 48 horas después de la transfección y se analizaron por citometría de flujo. La unión de estreptavidina (eje y) se representa gráficamente frente a la señal de eGFP. Se ve claramente la diferencia en la unión de estreptavidina de las diferentes construcciones.

45 Figura 2: Anotación de los epítipos StreptagII, Flankedccstreptag y ccstreptag en tres formatos diferentes. Todas las construcciones tienen péptidos señal amino-terminales, luego una o dos copias de un péptido de unión a estreptavidina. En el caso de dos péptidos de unión a estreptavidina, los péptidos están separados por una porción del pedúnculo de CD8. A continuación, las construcciones están unidas al pedúnculo de CD8, transmembrana y un endodominio corto, o bien están conectados a una señal de GPI. Todas las construcciones coexpresan eGFP a través de una IRES aguas abajo del marco de lectura abierto de la proteína de marcaje.

50 Figura 3: Transfección de células 293T con epítipos StreptagII, flankedccstreptag y ccstreptag en tres formatos diferentes que se muestran en la figura 2. Las células 293T también se transfectaron con una proteína irrelevante (HA1-TCR beta) coexpresada con eGFP como control negativo. Algunas células se coexpresaron con Q8.I2.eGFP y se tiñeron con un anticuerpo primario Qbend10-Biotina seguido de un anticuerpo secundario Estreptavidina-APC como control positivo. Los marcadores se expresaron en un pedúnculo de CD8, un anclaje de GPI (x1) con un marco de lectura abierto o con un anclaje de GPI (x2) con dos copias del marco de lectura abierto. Las células 293T transfectadas con las proteínas de marcaje se tiñeron con estreptavidina APC. Todas las células se analizaron mediante citometría de flujo y la unión de estreptavidina APC (eje y) se representa gráficamente frente a la señal de eGFP (eje x). De los marcadores anclados a GPI, solo aquellos con dos copias del péptido de unión a estreptavidina parecían unirse a estreptavidina.

65 Figura 4: Selección de células K562 transducidas con Flankedccstreptag-D8-x2-GPI y selección -L8 con perlas de estreptavidina.
Las K562 transducidas fueron positivas cercanas al 100 % para los transgenes después de la transducción. Las células positivas se mezclaron con preclasificación de K562 no transducida (NT). La mezcla se incubó tanto con dynabeads de estreptavidina (Life Technologies, N.º de cat. 65601) como con microperlas de estreptavidina

(Miltenyi, N.º de cat 130-048-101) según el protocolo del fabricante. Se recogió la fracción celular seleccionada, así como la fracción de flujo continuo para ambos protocolos. La selección se evaluó mediante tinción con estreptavidina-APC y para las poblaciones de células positivas para eGFP 9 días después de la clasificación mediante citometría de flujo.

5
Figura 5: Transducción retroviral de células 293T para expresar de forma estable construcciones de epítipo flankedccstreptag.

La expresión del transgén se demuestra mediante la detección de eGFP por citometría de flujo. La fluorescencia de eGFP se muestra como un histograma superpuesto a la señal de células 293T no transducidas. Las células 293T son 100 % positivas para los transgenes.

Figura 6: Transducción lentiviral de células NT-293T con sobrenadante lentiviral marcado con epítipo seleccionado con perlas de estreptavidina.

15
Las partículas de LV pseudotipadas de VSV-G se produjeron a partir de células 293T que expresaban flankedccstreptag-L8 (LV-MP14585) o flankedccstreptag-d8-x2-GPI (LV-MP14586) en su superficie en un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Los sobrenadantes se separaron en una fracción bruta (LV bruto; que representan el sobrenadante no purificado) y una fracción purificada se produjeron en LV a partir de células 293T con flankedccstreptag-L8-I2.eGFP y de células 293T flankedccstreptag-d8-x2-I2-eGFP se incubaron con estreptavidina-Dynabeads durante 2 horas a 4 °C con rotación. La mezcla de perlas-LV se colocó luego en una rejilla magnética provocando que las perlas se inmovilizaran. Después de lavar el complejo de perlas-virus con PBS 5 veces, los complejos se resuspendieron en medio frío como LV seleccionado (izquierda). Como control negativo, se incubó LV no marcado con las perlas (LV-NT). El transgén codifica un receptor de antígeno quimérico con un gen marcador que puede teñirse usando el anticuerpo Qbend10-APC. Se utilizaron sobrenadantes para transducir células NT-293T en presencia de 10 mg/ml de polibreno. Se realizó por duplicado.

25
Figura 7: Secuencia de aminoácidos de flankedccstreptag, glutatión-S-transferasa, RQR8 y epítipo de marcador de polihistidina (H6) en pedúnculos de CD8

Las secuencias de aminoácidos de las diferentes construcciones se muestran con los diferentes segmentos de componentes anotados.

30
Figura 8: Purificación viral mediante selección de las células K562 con las respectivas perlas usando los epítopos GST, RQR8 y marcador de His.

Las células K562 se transdujeron retroviralmente con las cuatro construcciones de manera individual. Posteriormente, las poblaciones de células se seleccionaron con sus respectivas perlas según el protocolo del fabricante. Las Dynabeads de proteína A se incubaron previamente con rituximab humano de grado clínico durante la noche a 4 °C y se lavaron con PBS a 5x para eliminar cualquier rituximab no unido antes de añadirlo a las células. Se recogieron las fracciones seleccionadas así como el flujo continuo de toda la selección. Se evaluaron las fracciones para detectar células positivas basándose en la expresión de eGFP mediante citometría de flujo con un canal en blanco para tener en cuenta la autofluorescencia de las células muertas.

40
Figura 9: Transducción retroviral de células 293T con construcciones de epítopos RQR8, GST y flankedccstreptag.

La expresión del transgén se confirma detectando la fluorescencia de eGFP mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma que muestra la fluorescencia de eGFP para cada línea celular 293T superpuesta sobre la señal de células 293T no transducidas.

50
Figura 10: Purificación de la purificación del LV marcado a partir del sobrenadante celular y posterior transducción de células 293T-NT. Se produjeron partículas de LV pseudotipadas de VSV-G que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) con un espaciador Fc humano a partir de células 293T que expresan los marcadores sintéticos en su superficie (Flankedccstreptag (A), RQR8 (B) y GST (C)) en un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Los sobrenadantes se separaron en una fracción bruta (sin dilución; que representan el sobrenadante no purificado) y una fracción purificada fue LV marcado con flankedccstreptag, LV marcado con RQR8 y LV marcado con GST y se incubaron con Estreptavidina-Dynabeads, Rituximab humano (hRTX) preincubado con Dynabeads de proteína A (una vez al día y lavado para eliminar cualquier hRTX no unido) y perlas de glutatión, respectivamente durante 2 horas a 4 °C con rotación. Luego se colocó la mezcla de perlas-LV en una rejilla magnética y una vez inmovilizadas las perlas, los medios se recogieron como fracciones de flujo continuo. Después de lavar el complejo de perlas-virus con PBS 5 veces, los complejos se resuspendieron en medio frío como fracciones purificadas (columnas centrales). Como control negativo, el LV no marcado se incubó con perlas de estreptavidina, perlas con hRTX-Proteína-A y perlas de glutatión. Las células diana se transdujeron con el vector de prueba y se teñieron 120 horas después de la transducción con un anticuerpo conjugado con fluorescencia que detecta el receptor de antígeno quimérico y se analizó mediante citometría de flujo. Se muestra un diagrama de puntos de la expresión de CAR frente a la dispersión lateral para todas las condiciones.

65
Figura 11: Representación esquemática de partículas de LV marcadas purificadas por su respectivo ligando. En este proceso, las partículas virales unidas a cualquiera de estos marcadores se pueden purificar a partir del

sobrenadante bruto y concentrar hasta un número arbitrario usando una amplia variedad de perlas unidas a ligando.

Figura 12: Purificación del LV marcado con RDpro pseudotipado a partir del sobrenadante celular y posterior transducción de células 293T.

Se produjeron partículas de LV pseudotipadas con RDpro que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) a partir de células 293T que expresan los marcadores sintéticos en su superficie (Flankedccstreptag (A) y RQR8 (B)). El sobrenadante se trató exactamente como en la Figura 10, se separó en una fracción bruta (sin dilución; que representan el sobrenadante no purificado) y una fracción purificada fue LV marcado con flankedccstreptagl y LV marcado con RQR8, que se incubaron con estreptavidina-Dynabeads y Rituximab humano (preincubado con Proteína-A Dynabeads), respectivamente. Se recogió el flujo continuo de la inmovilización magnética de las perlas. Como control negativo, el LV no marcado se incubó tanto con perlas de estreptavidina como con perlas de hRTX-Proteína-A. Se transdujeron células 293T con el LV de prueba. Estas células diana se tiñeron 120 horas después de la transducción con un anticuerpo conjugado con fluorescencia que detecta el CAR y se analizó mediante citometría de flujo. La expresión de CAR frente a la dispersión lateral se muestra en un diagrama de puntos.

Figura 13: Transducción de PBMC con LV marcado con Flankedccstreptag y RQR8.

Las partículas de LV pseudotipadas con RDpro, que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) con un anti-espaciador de Fc humano, se produjeron a partir de células 293T que expresan los marcadores sintéticos en su superficie (RQR8 (A) y Flankedccstreptag (B)). El sobrenadante se trató exactamente como en la Figura 10, se separó en una fracción bruta (sin dilución; que representan el sobrenadante no purificado) y una fracción purificada donde el LV marcado con flankedccstreptagl y el LV marcado con RQR8 se incubaron con Dynabeads de estreptavidina y el Rituximab humano se preincubó con Dynabeads de proteína A, respectivamente. Se transdujeron PBMC (n = 2, 3 pocillos/condición) con sobrenadante de LV marcado con RQR8 sin dilución y Flankedccstreptag y con sobrenadante de LV no marcado (control) usando placas recubiertas con Retronectina. Mientras que las partículas de LV seleccionadas de ambos marcadores se añadieron a PBMC para su transducción en ausencia de retronectina pero con la ausencia o presencia de un imán debajo de la placa durante 1 hora a 37 °C (n = 3). Las eficacias de transducción se determinaron mediante tinción con anticuerpo anti-Fc humano para el CAR, de las últimas condiciones se representan en el panel inferior derecho con barras de error que representan la desviación típica de n=3

Figura 14: Secuencias de proteínas de marcaje diseñadas basadas en proteínas de envoltura RD114 recombinantes.

El sitio de escisión de furina es "RPKR" y se muestra resaltado en negrita y cursiva. (a) Para generar RD114 SU marcado en su extremo amino con RQR, la secuencia RQR8 (resaltada en azul) se insertó justo después del péptido señal de la envoltura RD114. Para permitir la orientación correcta para la unión y para aislar de la glicoproteína de la envoltura, se insertó un enlazador de serina-glicina entre RQR y SU (resaltado en gris). Después del procesamiento, el marcador RQR está en el extremo amino terminal del fragmento SU. (b) Para generar TM de envoltura RD114 marcado en su extremo amino con RQR, el marcador se insertó justo después del sitio de escisión de furina. De nuevo, se insertó un enlazador flexible entre RQR y el fragmento TM de la envoltura RD114. Después del procesamiento, RQR es accesible en el extremo amino terminal del dominio TM. (c) Para generar RD114 SU marcado en su extremo amino con flankedstreptagcc, la secuencia del marcador (resaltada en verde) se insertó justo después del péptido señal de la envoltura RD114. Para permitir la orientación correcta para la unión y para aislar de la glicoproteína de la envoltura, se insertó un enlazador de serina-glicina entre el marcador y SU (resaltado en gris). Después del procesamiento, el marcador ccstreptag está en el extremo amino terminal del fragmento SU. (d) Para generar TM de envoltura RD114 marcada en su extremo amino con ccstreptag, el marcador se insertó justo después del sitio de escisión de furina. De nuevo, se insertó un enlazador flexible entre el marcador y el fragmento TM de la envoltura RD114. Después del procesamiento, ccstreptag es accesible en el extremo amino terminal del dominio TM.

Figura 15: Diagrama esquemático de las proteínas de marcaje diseñadas por ingeniería basadas en proteínas de la envoltura RD114 recombinantes. La glicoproteína de la envoltura se escinde en un sitio de escisión de la furina para producir dos fragmentos SU y TM que están conectados mediante enlaces disulfuro. El marcador (ya sea RQR o un mimético de biotina - ST se muestra como ejemplos), se puede insertar en el extremo amino de SU, justo después del péptido señal o en el extremo amino de TM justo después del sitio de escisión de la furina.

Figura 16: Secuencia de proteína env RD-PRO y RD114-TR (transmembrana y endodominios resaltados)

Figura 17: Elución de partículas víricas marcadas con biotina

Las partículas víricas flankedccstreptag-LV (FL-LV) y LV no marcadas (NT-LV) se purificaron usando perlas separando magnéticamente las perlas del sobrenadante celular. Las perlas unidas a LV se resuspendieron luego en DMEM simple o DMEM con D-Biotina 30 mM. Se utilizó citometría de flujo para visualizar partículas marcadas y no marcadas en las perlas después de la purificación en la resuspensión DMEM simple (SIN DILUCIÓN) y, para la resuspensión de BMEM/Biotina, en el eluido de perlas (perlas purificadas) y el eluido de flujo continuo (flujo continuo).

Figura 18: Elución de partículas víricas marcadas con biotina

Las partículas víricas flankedccstreptag-LV (FL-LV) y LV no marcadas (NT-LV) se purificaron usando perlas separando magnéticamente las perlas del sobrenadante celular. Las perlas unidas a LV se resuspendieron luego en DMEM simple o DMEM con D-Biotina 30 mM. Se usó citometría de flujo para visualizar partículas marcadas y no marcadas en las perlas después de la purificación en el eluido de perlas de resuspensión de DMEM simple y eluido de flujo continuo (lado izquierdo), eluido de perlas de resuspensión de BMEM/biotina y el eluido de flujo continuo (lado derecho).

10 Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un sistema en el que las partículas de vector vírico se pueden marcar indirectamente usando una célula productora que expresa el marcador en la superficie celular. Dado que la proteína de marcaje se expresa en la célula productora, el marco de lectura de la envoltura vírica no se ve afectado, el cual, por tanto, conserva la integridad funcional y el título vírico.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula productora de retrovirus que expresa una proteína de marcaje en la superficie celular, de modo que los vectores retrovíricos producidos por la célula se marcan con la proteína de marcaje. La proteína de marcaje comprende:

- i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
- ii) un espaciador; y
- iii) un dominio de direccionamiento de membrana

de tal manera que, cuando se incorpora a un vector retrovírico, la proteína de marcaje facilita la purificación del vector retrovírico del sobrenadante celular mediante la unión de la proteína marcadora a la estreptavidina; en donde el dominio de unión comprende un imitador de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43 que se une a la estreptavidina con una afinidad menor que la biotina, de modo que se pueda usar biotina para eluir vectores retrovíricos capturados por estreptavidina producidos por la célula; y en donde el dominio de dirección de la membrana comprende un dominio transmembrana y un endodominio.

La invención también proporciona una célula productora de retrovirus que expresa una proteína de marcaje en la superficie celular, de tal manera que los vectores retrovíricos producidos por la célula se marquen con la proteína marcadora, en donde la proteína de marcaje comprende:

- i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
- ii) un espaciador; y
- iii) un dominio de direccionamiento de membrana

de tal manera que, cuando se incorpora a un vector retrovírico, la proteína de marcaje facilita la purificación del vector retrovírico del sobrenadante celular mediante la unión de la proteína marcadora a la estreptavidina; en donde el dominio de unión comprende un imitador de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43 que se une a la estreptavidina con una afinidad menor que la biotina, de modo que se pueda usar biotina para eluir vectores retrovíricos capturados por estreptavidina producidos por la célula; en donde el dominio de unión comprende dos o más epítomos de unión a estreptavidina; y en donde el dominio de direccionamiento de la membrana comprende un anclaje de GPI.

El dominio de direccionamiento de la membrana puede comprender un dominio transmembrana y un endodominio. El dominio de direccionamiento de la membrana puede comprender un anclaje de GPI.

El espaciador puede comprender un pedúnculo de CD8 o un equivalente del mismo.

La proteína de marcaje también puede comprender un sitio de escisión, escisión en la que liberan vectores retrovíricos unidos a la estreptavidina.

La proteína de marcaje puede comprender un enlazador entre el dominio de unión y el espaciador, cuyo enlazador es o comprende el sitio de escisión. El sitio de escisión se puede escindir mediante trombina.

Cuando el dominio de direccionamiento de la membrana comprende un dominio transmembrana y un endodominio; el dominio transmembrana y el endodominio pueden ser efectivamente los mismos que el transmembrana y el endodominio de la proteína de la envoltura de un vector retrovírico.

El dominio transmembrana y el endodominio se pueden obtener de la proteína de la envoltura RD-PRO.

El dominio de unión puede comprender flankedccstreptag (SEQ ID NO: 2). El epítomo de unión a estreptavidina puede ser un péptido mimético de biotina. Tal mimético de biotina se puede unir a estreptavidina con una afinidad menor

que la biotina, de modo que se pueda usar biotina para eluir vectores retrovéricos capturados por estreptavidina producidos por la célula de empaquetamiento.

5 Los miméticos de biotina desvelados en el presente documento incluyen: Streptag (SEQ ID NO: 38) (descrito por Schmidt et al, Protein Eng. Enero de 1993;6(1):109-22.), O streptag II (SEQ ID NO: 1) (descrito por Skerra et al, J. Mol. Biol. 255, 753-766 (1996)), nanotag en formato short (corto) (SEQ ID NO: 35) o long (largo) (SEQ ID NO: 36) tal como se describen Lamilar et al, Protein Expr. Purif. 33, 39-47 (2004)), SBP tag (SEQ ID NO: 37) tal como se describe Keefe et al (Protein Expr. Purif. 23, 440-446 (2001)), o los marcadores restringidos por disulfuro descritos por Giebel et al (Biochemistry (Mosc.) 34, 15430-15435 (1995)) (en adelante denominado ccstreptag (SEQ ID NO: 3).)

La proteína de marcaje puede comprender dos o más epítomos de unión a estreptavidina.

15 La proteína de marcaje puede comprender una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas como las SEQ ID NO. 1 a 5.

Los dominios de unión desvelados en el presente documento pueden comprender glutatión S-transferasa.

20 Las proteínas de marcaje desveladas en el presente documento pueden comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 6.

Los dominios de unión desvelados en el presente documento pueden comprender un epítomo de unión a rituximab y/o un epítomo Qbend10.

25 Los dominios de unión desvelados en el presente documento pueden comprender RQR8.

Las proteínas de marcaje desveladas en el presente documento pueden comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 21.

30 La célula productora puede ser una célula de empaquetamiento que comprende genes que codifican las proteínas retrovéricas Gag, Pol y Env integradas de forma estable dentro del genoma celular.

35 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje obtenida de células productoras tal como se define en relación con el primer aspecto de la invención.

40 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar una célula productora o una célula de empaquetamiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica una proteína de marcaje tal como se define en relación con el primer aspecto de la invención en una célula, de tal manera que la proteína de marcaje se expresa en la superficie celular.

45 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para fabricar una célula productora según el primer aspecto de la invención que produce vectores retrovéricos, comprendiendo el kit: un ácido nucleico que codifica una proteína de marcaje tal como se define en relación con el primer aspecto de la invención; y un genoma de vector retrovérico; y opcionalmente ácidos nucleicos que comprenden los genes retrovéricos gag, pol y env.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para purificar un vector retrovérico según el segundo aspecto de la invención que comprende la etapa de captura del vector retrovérico utilizando estreptavidina.

50 La estreptavidina se puede inmovilizar sobre un sustrato sólido. La estreptavidina puede estar presente en una columna que contiene una matriz de unión o inmovilizada sobre perlas.

El método también puede comprender la etapa de eluir el vector retrovérico capturado con estreptavidina con biotina o destiobiotina.

55 En el presente documento se describe un método para purificar un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje que comprende un dominio de unión que comprende glutatión S-transferasa que comprende la etapa de captura del vector retrovérico usando glutatión reducido.

60 En el presente documento se describe un método para purificar un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje que comprende un dominio de unión que comprende un epítomo de rituximab y/o QBend10 que comprende la etapa de captura del vector retrovérico usando un anticuerpo monoclonal de rituximab.

El método puede comprender además la etapa de unir vectores retrovéricos capturados con rituximab a la Proteína A.

65 Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de marcaje que comprende un dominio de unión que se une a estreptavidina; un espaciador; y un dominio de direccionamiento de membrana.

5 El término "tener", tal como se usa en el presente documento, es sinónimo del término "que comprende".

DOMINIO DE UNIÓN

10 'Dominio de unión' se refiere a una entidad, por ejemplo un epítipo, que es capaz de reconocer y unirse específicamente a una entidad diana, por ejemplo, una fracción de captura.

15 El dominio de unión puede comprender uno o más epítipos que son capaces de unirse específicamente a un resto de captura. Por ejemplo, los dominios de unión pueden comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco epítipos capaces de unirse específicamente a un resto de captura. Cuando el dominio de unión comprende más de un epítipo, cada epítipo puede estar separado por una secuencia enlazadora, tal como se describe en el presente documento.

20 El dominio de unión se puede liberar del resto de captura tras la adición de una entidad que tiene una mayor afinidad de unión por el resto de captura en comparación con el dominio de unión.

Epítipo de unión a estreptavidina

25 El dominio de unión comprende uno o más epítipos de unión a estreptavidina. Por ejemplo, el dominio de unión puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco epítipos de unión a estreptavidina.

30 La estreptavidina es una proteína de 52,8 kDa purificada de la bacteria *Streptomyces avidinii*. Los homotetrámeros de estreptavidina tienen una afinidad muy alta por la biotina (vitamina B7 o vitamina H), con una constante de disociación (Kd) $\sim 10^{-15}$ M. La estreptavidina es bien conocida en la técnica y se usa ampliamente en biología molecular y bionanotecnología debido a la resistencia del complejo estreptavidina-biotina a los disolventes orgánicos, desnaturizantes, enzimas proteolíticas y extremos de temperatura y pH. El fuerte enlace estreptavidina-biotina se puede usar para unir diversas biomoléculas entre sí o sobre un soporte sólido. Se necesitan condiciones rigurosas para romper la interacción estreptavidina-biotina, sin embargo, que pueden desnaturizar una proteína de interés que se está purificando.

35 El dominio de unión comprende un mimético de biotina. Un "mimético de biotina" se une específicamente a la estreptavidina.

40 Como se ha descrito anteriormente, la afinidad de la interacción biotina/estreptavidina es muy alta. Por tanto, es una ventaja de la presente invención que el dominio de unión comprende un mimético de biotina que tiene una afinidad menor por la estreptavidina en comparación con la biotina misma.

45 En particular, el mimético de biotina se puede unir a la estreptavidina con una afinidad de unión menor que la biotina, de modo que la biotina se pueda usar para eluir vectores retrovíricos capturados por estreptavidina. Por ejemplo, el mimético de biotina se puede unir a estreptavidina con una Kd de 1 nM a 100 μ M.

Los miméticos de biotina se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Péptidos miméticos de biotina.

<i>nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>afinidad</i>
Long nanotag Short nanotag	DVEAWLDERVPLVET (SEQ ID NO: 35) DVEAWLGAR (SEQ ID NO: 36)	3,6 nM 17 nM
Streptag streptag II	WRHPQFGG (SEQ ID NO: 38) WSHPQFEK (SEQ ID NO: 1)	72 μ M
SBP-tag	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (SEQ ID NO: 37)	2,5 nM
ccstreptag flankedccstreptag	CHPQGPPC (SEQ ID NO: 3) AECHPQGPPCIEGRK (SEQ ID NO: 2)	230 nM

50 El mimético de biotina puede ser Flankedccstreptag.

El dominio de unión puede comprender más de un mimético de biotina. Por ejemplo, el dominio de unión puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco miméticos de biotina.

55 Cuando el dominio de unión comprende más de un mimético de biotina, cada mimético puede ser el mismo o un

mimético diferente. Por ejemplo, el dominio de unión puede comprender dos flankedccstreptag separados por un enlazador (por ejemplo, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5).

5 SEQ ID NO: 4 (StreptagII-d8-x2)
WSHPQFEKSGGGGSPAPRPPTPAPTIASWSHPQFEK

SEQ ID NO: 5 (Flankedccstreptag-d8-x2)
ECHPQGPPCIEGRKSSGGGGSPAPRPPTPAPTIASECHPQGPPCIEGRKS

10 *Glutación S-transferasa*

Los dominios de unión desvelados en el presente documento pueden comprender un dominio de glutación S-transferasa (GST).

15 Las GST comprenden una familia de isoenzimas metabólicas de fase II eucariotas y procariotas que catalizan la conjugación de la forma reducida de glutación (GSH) con sustratos xenobióticos con el fin de desintoxicar. La familia GST consiste en tres superfamilias: las proteínas citosólicas, mitocondriales y microsomales (también conocidas como MAPEG) (Udomsinpraser *et al.* Biochem. J. (2005) 388 (Parte 3): 763-71).

20 La proteína GST tiene una fuerte afinidad de unión por GSH y esta interacción se usa comúnmente en biología molecular para permitir el aislamiento de una proteína marcada con GST de una mezcla de proteínas.

Una secuencia de aminoácidos para GST se muestra como la SEQ ID NO: 6.

25 SEQ ID NO: 6 (GST)

MGTSLLCWMALCLLLGADHADAMSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDK
WRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIR
YGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLY
MDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPPKSDLEVLV
QGPLG

30 *Epítipo de unión a rituximab*

Una presente proteína de marcaje puede comprender un dominio de unión que comprende un epítipo de unión a rituximab (epítipo R) y/o un epítipo Qbend10 (epítipo Q).

35 Un epítipo de unión a rituximab se refiere a un epítipo que se une específicamente a rituximab. Por ejemplo, el epítipo de unión a rituximab puede basarse en el antígeno de linfocitos B CD20.

La secuencia del epítipo de unión a Rituximab de CD20 es CEPANPSEKNPSTQYC (SEQ ID NO 7)

40 Perosa *et al* (2007, J. Immunol 179:7967-7974) describen una serie de péptidos cíclicos 7-meros constreñidos por cisteína, que llevan el motivo antigénico reconocido por el mAb anti-CD20 Rituximab, pero tienen diferentes aminoácidos alrededor del motivo. En total se describieron once péptidos, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Péptido	Secuencia de inserción
R15-C	acPYANPSLc (SEQ ID NO 8)
R3-C	acPYSNPSLc (SEQ ID NO 9)
R7-C	acPFANPSTc (SEQ ID NO 10)
R8-, R12-, R18-C	acNFSNPSLc (SEQ ID NO 11)
R14-C	acPFSNPSMc (SEQ ID NO 12)
R16-C	acSWANPSQc (SEQ ID NO 13)
R17-C	acMFSNPSLc (SEQ ID NO 14)
R19-C	acPFANPSMc (SEQ ID NO 15)
R2-C	acWASNPSLc (SEQ ID NO 16)
R10-C	acEHSNPSLc (SEQ ID NO 17)
R13-C	acWAANPSMc (SEQ ID NO 18)

45 Li *et al* (2006 Cell Immunol 239:136-43) también describen mimétipos de Rituximab, que incluyen la secuencia:

QDKLTQWPKWLE (SEQ ID NO 19).

5 Un polipéptido de la presente divulgación puede comprender un epítipo de unión a rituximab que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7-19 o una variante de la misma que conserva la actividad de unión a rituximab.

QBend10

10 El sistema de selección de CD34 CliniMACS utiliza el anticuerpo monoclonal QBend10 para conseguir la selección celular. Los presentes inventores han mapeado previamente el epítipo de unión a QBend10 desde el interior del antígeno CD34 (véase el documento WO 2013/153391) y han determinado que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 20.
ELPTQGTFNSVSTNVS (SEQ ID NO: 20).

15 Un dominio de unión de la presente divulgación puede comprender un epítipo de unión a QBend10 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma que conserva la actividad de unión a QBend10.

RQR8

20 Una proteína de marcaje puede comprender un dominio de unión que comprende o consta de una secuencia de 136 aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 21 (RQR8)

25

CPYSNP~~SL~~CSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVS~~PAKPTTTAC~~PYSNP~~SL~~CSGGGGSPAPRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR
NRRRVCKCPRPVV

VARIANTE

30 La presente proteína de marcaje puede comprender una variante de un dominio de unión como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el dominio de unión puede basarse en una secuencia proporcionada en el presente documento, pero comprende una o más mutaciones de aminoácidos, como inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos, siempre que el epítipo conserve la actividad de unión de la entidad o epítipo en el que se basa. En particular, la secuencia puede estar truncada en uno o ambos extremos terminales por, por ejemplo, uno
35 o dos aminoácidos.

Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos, siempre que se conserve la actividad de unión del epítipo. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico;
40 los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos de grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que se presenta a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y de la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:ALIFÁTICO	No polares	G A P I L V
	Polares - no cargados	C S T M N Q
	Polares - cargados	D E K R
	AROMÁTICOS	H F W Y

45 El dominio de unión puede, por ejemplo, contener 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 mutación(es) de aminoácidos en comparación con una secuencia de dominio de unión tal como se muestra en el presente documento.

50 El dominio de unión puede consistir esencialmente en una secuencia de dominio de unión tal como se muestra en el presente documento o una variante del mismo que conserva la actividad de unión del dominio de unión en el que se basa. El dominio de unión puede consistir en una secuencia de dominio de unión tal como se muestra en el presente documento o una variante de la misma que conserve esa actividad de unión del dominio de unión en el que se basa.

ESPACIADOR

5 La proteína de marcaje de la presente invención comprende una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión y el dominio transmembrana y separar espacialmente los dos dominios.

10 La secuencia espaciadora puede, por ejemplo, comprender un pedúnculo de CD8 o un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El espaciador puede comprender un equivalente de un pedúnculo de CD8 o un anclaje GPI, es decir, una secuencia que proporciona la función de separar espacialmente el dominio de unión y el dominio transmembrana. Por ejemplo, el enlazador puede comprender una secuencia enlazadora alternativa que tiene propiedades similares de longitud y/o espaciamiento de dominios como un pedúnculo de CD8 o un anclaje de GPI.

15 El espaciador puede ser un espaciador corto, por ejemplo, un espaciador que comprende menos de 100, menos de 80, menos de 60 o menos de 45 aminoácidos. El espaciador puede ser o comprender un pedúnculo de CD8 o puede comprender un anclaje de GPI; cuya síntesis y unión a la proteína está dirigida por una secuencia señal GPI, o una versión modificada de la misma.

A continuación se dan ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos enlazadores o secuencias señal de GPI:

20 SEQ ID NO: 22 (pedúnculo de CD8)

PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
LYCNHRNRRRVCKCPR

25 SEQ ID NO: 23 (pedúnculo de CD8 + enlazador)

SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGV
LLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

30 SEQ ID NO: 24 (secuencia de señal de GPI)
ASSNISGGIFLFFVANAIHLFCFS

El espaciador también puede comprender uno o más motivos enlazadores para introducir una rotura de cadena. Una rotura de cadena separa dos dominios distintos pero permite la orientación en diferentes ángulos. Dichas secuencias incluyen la secuencia SDP y la secuencia SGGGSDP (SEQ ID NO. 25).

35 El enlazador puede comprender un enlazador de serina-glicina, tal como SGGGGS (SEQ ID No. 26).

DOMINIO DE DIRECCIONAMIENTO DE MEMBRANAS

40 La proteína de marcaje de la presente invención comprende un dominio de direccionamiento de membrana.

Un 'dominio de direccionamiento de membrana' es una entidad que se localiza preferentemente en la membrana y, por lo tanto, ancla la presente proteína de marcaje a la membrana de, por ejemplo, una célula de empaquetamiento o un vector retrovírico.

45 El dominio de direccionamiento de la membrana puede ser un dominio transmembrana y un endodominio.

Un dominio transmembrana es una hélice alfa hidrófoba que atraviesa una membrana celular y se encuentra típicamente en proteínas transmembrana.

50 Cuando la proteína de marcaje tiene un dominio transmembrana, también comprende un endodominio, que se orienta al interior de, por ejemplo, la célula de empaquetamiento o el vector retrovírico.

El endodominio comprende restos polares que anclan la proteína de marcaje a la membrana I.

55 El endodominio puede potenciar directamente la incorporación en el virión. Los endodominios de las glicoproteínas retrovíricas contienen motivos que mejoran la incorporación en el virión. En el caso de un vector lentivírico, por ejemplo, la proteína de marcaje puede comprender un endodominio diseñado para mejorar la incorporación en un lenvirus, por ejemplo, similar al de RD-PRO (véase Ikeda *et al.*; Nat Biotechnol. Mayo de 2003; 21(5):569-72) o RD114-TR (Sandin *et al.*; 2002; Blood: Volumen 100; Número 3; Páginas 823-32). En la Figura 16 se muestra una secuencia de proteína env de RD-PRO y RD114-TR.

60 Por ejemplo, la proteína de marcaje puede comprender el dominio transmembrana y el endodominio que se muestra

como la SEQ ID NO: 27
 SEQ ID NO: 27 (RD-PRO TM y endodominio)
 YLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFINDRLNVSQNYPIVQQYQALKAEEEEAQD

5 El dominio de direccionamiento de la membrana puede ser un anclaje de GPI.

El anclaje de GPI es una modificación postraduccional que se produce en el retículo endoplásmico. Los precursores de anclaje de GPI preensamblados se transfieren a proteínas que llevan una secuencia de señal de GPI en C-terminal (véase Kinoshita *et al.*; J Biochem; 122, 251-257 (1997)). Durante el procesamiento, el anclaje de GPI reemplaza la secuencia señal de GPI y se une a la proteína diana mediante un enlace amida. El anclaje de GPI dirige la proteína madura a la membrana.

La presente proteína de marcaje puede comprender una secuencia señal de GPI. Por ejemplo, la proteína de marcaje puede comprender una secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 24.

15 El anclaje de GPI puede proporcionar la función tanto del dominio espaciador como del dominio de direccionamiento a la membrana de la presente proteína de marcaje. Como tal, el dominio espaciador y el dominio de direccionamiento a la membrana de la proteína de marcaje pueden ser un anclaje de GPI.

20 SITIO DE ESCISIÓN

La proteína de marcaje de la invención puede comprender un sitio de escisión, escisión en la que liberan vectores retrovéricos unidos a la estreptavidina.

25 Un "sitio de escisión" se refiere a una secuencia o motivo de aminoácidos que es específicamente reconocido por una enzima que es capaz de romper un enlace peptídico dentro o próximo al sitio de escisión. Como tal, una vez que la partícula retrovérica se ha unido al resto de captura, la adición de la enzima al complejo del resto de captura retrovérico da como resultado la escisión de la proteína de marcaje en el sitio de escisión y la liberación del vector retrovérico del resto de captura.

30 El sitio de escisión puede estar presente en una secuencia enlazadora entre el dominio de unión y el espaciador. El enlazador puede ser, o puede comprender, la secuencia de escisión.

35 El sitio de escisión se puede escindir mediante trombina. Se produce trombina *in vivo* por la escisión enzimática de dos sitios en la protrombina por el Factor X activado. En la vía de coagulación sanguínea, la trombina actúa para convertir el factor XI en XIa, VIII en VIIIa, V en Va, fibrinógeno en fibrina y XIII en XIIIa.

El sitio de escisión de la trombina puede ser, por ejemplo, LVPRGS (SEQ ID NO: 28), en el que la trombina se escinde selectivamente entre los restos de arginina y glicina.

40 PÉPTIDO SEÑAL

La proteína de marcaje de la invención puede comprender un péptido señal para ayudar en su producción.

45 El núcleo del péptido señal puede contener un largo tramo de aminoácidos hidrófobos que tiene tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede empezar con un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente, que ayuda a reforzar la topología adecuada del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido señal normalmente hay un tramo de aminoácidos que reconoce y escinde la peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindir durante o después de completarse la translocación, para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Después, los péptidos señales libres se digieren por proteasas específicas.

El péptido señal puede estar en el extremo amino de la molécula.

55 El péptido señal puede comprender la SEQ ID NO 29 o 30 o una variante de la misma que tiene 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácido (inserciones, sustituciones o adiciones) con la condición de que el péptido señal aún funcione causando la secreción de la molécula biespecífica.

SEQ ID NO 29: METDTLLLWVLLLWVPGSTG

60 SEQ ID NO 30: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

Los péptidos señal de las SEQ NO: 29 y 30 son compactos y altamente eficaces. Se predice que proporcionen aproximadamente un 95 % de escisión después de la glicina terminal, dando una eliminación eficaz por la peptidasa señal.

65 RETROVIRUS

La proteína de marcaje de la presente invención facilita la purificación de un vector retrovívico a partir de un sobrenadante celular mediante la unión de la proteína de marcaje a un resto de captura.

5 El término 'purificación' se utiliza de acuerdo con su significado convencional para referirse al proceso de aislamiento del vector retrovívico de una mezcla, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular, tal que el vector retrovívico esté sustancialmente libre de contaminantes

10 El concepto de usar vectores víricos para terapia génica es bien conocido (Verma y Somia (1997) Nature 389:239-242).

15 Existen muchos retrovirus. Para la presente solicitud, el término "retrovirus" incluye, pero sin limitación: virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), virus del tumor mamario del ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus de la mielocitomatosis aviar-29 (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (AEV) y todos los demás retroviridos, incluidos los lentivirus.

20 Se puede encontrar una lista detallada de retrovirus en Coffin et al ("Retrovirus" 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs 758-763).

En una realización preferida, el vector retrovívico se obtiene de un lentivirus.

25 Los lentivirus también pertenecen a la familia de los retrovirus, pero pueden infectar células en división y no en división (Lewis et al (1992) EMBO J. 3053-3058).

30 El grupo de lentivirus se puede dividir en "primates" y "no primates". Ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS). El grupo de lentivirus no primates incluye el prototipo de "virus lento", el virus visna/maedi (VMV), así como el virus de la encefalitis-artritis caprina (CAEV) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIV) descritos más recientemente.

35 En la técnica se pueden encontrar detalles sobre la estructura genómica de algunos lentivirus. A modo de ejemplo, los detalles sobre el VIH y el VAIE se pueden encontrar en la base de datos del NCBI Genbank (es decir, números de referencia al genoma AF033819 y AF033820 respectivamente). Los detalles de las variantes del VIH también se pueden encontrar en <http://hiv-web.lanl.gov>. Los detalles de las variantes de VAIE se pueden encontrar en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

40 Durante el proceso de infección, al entrar en la célula hospedadora susceptible, el genoma del ARN lentivívico se copia en el ADN mediante la transcriptasa inversa codificada víricamente que se transporta dentro del virus original. Este ADN se transporta al núcleo de la célula hospedadora, donde posteriormente se integra en el genoma del hospedador. En esta fase, típicamente se lo conoce como provirus. El provirus es estable en el cromosoma del hospedador durante la división celular y se transcribe como otros genes celulares. El provirus codifica las proteínas y otros factores necesarios para producir más virus, que, para un virus competente de replicación de tipo silvestre puede salir de la célula mediante un proceso que a veces se denomina "gemación".

45 Los lentivirus tienen tres genes principales que codifican las proteínas víricas en el orden: 5'-gag-pol-env-3'. Existen dos genes reguladores, tat y rev. Existen genes accesorios adicionales según el virus (por ejemplo, para el VIH-1: vif, vpr, vpu, nef) cuyos productos intervienen en la regulación de la síntesis y procesamiento del ARN vírico y otras funciones replicativas. La repetición terminal larga (LTR) es de aproximadamente 600 nt de longitud, de los cuales, la región U3 es de 450, la secuencia R es de 100 y la región U5 es de unos 70 nt de longitud.

50 Las proteínas víricas involucradas en las primeras etapas de la replicación incluyen la transcriptasa inversa y la integrasa. La transcriptasa inversa es la ADN polimerasa dependiente de ARN codificada por virus. La enzima utiliza el genoma del ARN vírico como molde para la síntesis de una copia de ADN complementario. La transcriptasa inversa también tiene actividad ribonucleasa H para la destrucción del molde de ARN. La integrasa se une tanto al ADNc vírico generado por la transcriptasa inversa como al ADN del hospedador. La integrasa procesa la LTR antes de insertar el genoma vírico en el ADN del hospedador. Tat actúa como un trans-activador durante la transcripción para potenciar la iniciación y elongación. El elemento de respuesta Rev actúa postranscripcionalmente, regulando el corte y empalme del ARNm y el transporte al citoplasma.

55 El proteoma lentivívico consta de cinco proteínas estructurales principales y 3-4 proteínas no estructurales (3 en los lentivirus de primates). La proteína SU de la envoltura superficial glicosilada Gp120, codificada por el gen vírico env, la proteína de envoltura transmembrana glicosilada Gp41 TM, también codificada por el gen vírico env, la proteína

P24 de la cápside no glicosilada CA, codificada por el gen vírico gag, la proteína P17 de matriz no glicosilada MA, también codificada por gag y la proteína de la cápside no glicosilada NC, también codificada por gag.

5 Las proteínas de la envoltura SU y TM están glicosiladas en al menos algunos lentivirus (por ejemplo, VIH, SIV). La glicosilación puede desempeñar un papel estructural en el ocultamiento y la variación de los sitios antigénicos necesarios para que el hospedador monte una respuesta del sistema inmunológico. SU y TM forman un complejo que interactúa específicamente con las proteínas del receptor celular. Esta interacción conduce finalmente a la infección por fusión de la membrana vírica con la membrana celular.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vector lentivírico", cuando se hace referencia a un sistema de vector lentivírico también se incluye una partícula de vector lentivírico capaz de transducir una célula receptora con un nucleótido de interés (NDI).

15 Una partícula de vector lentivírico incluye los siguientes componentes: un genoma vectorial, que puede contener uno o más NDI, una nucleocápside que encapsula el ácido nucleico y una membrana que rodea la nucleocápside.

20 El término "nucleocápside" se refiere al menos a las proteínas del núcleo vírico específicas del grupo (gag) y la polimerasa vírica (pol) de un genoma de retrovirus. Estas proteínas encapsidan las secuencias empaquetables y ellas mismas están rodeadas además por una membrana que contiene una glicoproteína de envoltura.

25 El término "genoma del vector" se refiere tanto a la construcción de ARN presente en la partícula de vector lentivírico como a la construcción de ADN integrada. El término también abarca una construcción de ADN separada o aislada capaz de codificar dicho genoma de ARN. Un genoma lentivírico debería comprender al menos un componente que se puede obtener de un lentivirus. La expresión "que se puede obtener de" se usa en su sentido normal con el significado de una secuencia de nucleótidos o una parte de la misma que no necesita ser obtenida necesariamente de un virus tal como un lentivirus, sino que podría obtenerse del mismo. A modo de ejemplo, la secuencia se puede preparar sintéticamente o mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

30 PROTEÍNA DE LA ENVOLTURA RETROVÍRICA

La presente divulgación proporciona una proteína de envoltura retrovívica que es, o comprende, una proteína de marcaje según el primer aspecto de la invención.

35 'Proteína de la envoltura retrovívica' se refiere a las proteínas SU y/o TM, tal como se describió anteriormente en relación con los lentivirus.

La proteína de la envoltura retrovívica puede ser una proteína de la envoltura lentivívica.

40 Por ejemplo, una proteína de envoltura retrovívica de la presente divulgación puede basarse en la proteína RD114 SU o TM o la proteína RDpro SU o TM. La expresión "basado en" indica que la proteína se obtiene o puede obtenerse de la proteína de la respectiva envoltura. Las secuencias de aminoácidos de la proteína RD114 TM y su endodominio y la proteína RDpro TM y su endodominio se muestran en la Figura 16. La proteína de la envoltura retrovívica expresada por la célula productora de la presente invención puede comprender una de estas secuencias o una variante que comprende el 80, 90, 95 o 99 % de identidad con una de las secuencias mostradas en la Figura 16.

La proteína de la envoltura retrovívica que es, o comprende, la proteína de marcaje puede funcionar para encapsular la nucleocápside y así formar una partícula retrovívica.

50 La proteína de la envoltura retrovívica puede comprender una proteína marcadora en el extremo N-terminal o C-terminal.

55 La proteína de la envoltura retrovívica puede comprender o consistir en una secuencia mostrada como una de las SEQ ID NO: 31-34 en la Figura 14 o una variante de la misma que tiene el 80, 90, 95 o 99 % de identidad con una de las secuencias mostradas en la Figura 14 que retiene la función de la proteína de la envoltura para actuar como un marcador.

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de marcaje de la presente invención.

La secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ARN o ADN o una variante de la misma.

65 La presente invención también proporciona un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico.

VECTOR

La presente invención proporciona además un vector retrovítico que comprende una proteína de marcaje según la presente invención.

CÉLULA PRODUCTORA Y CÉLULA DE EMPAQUETAMIENTO

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula productora" se refiere a una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de partículas de vector retrovítico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula de empaquetamiento" se refiere a una célula que contiene los elementos necesarios para la producción de virus recombinantes infecciosos que faltan en el genoma de ARN. Normalmente, tales células de empaquetamiento contienen uno o más plásmidos productores que son capaces de expresar proteínas estructurales víricas (tales como gag-pol y env, que pueden estar optimizadas por codón) pero no contienen una señal de empaquetamiento.

La expresión "señal de empaquetamiento", que se denomina indistintamente "secuencia de empaquetamiento" o "psi", se utiliza en referencia a la secuencia no codificante que actúa en cis, necesaria para la encapsidación de cadenas de ARN retrovítico durante la formación de partículas víricas. En el VIH-1, esta secuencia se ha mapeado en los loci que se prolongan desde aguas arriba del sitio donante de corte y empalme principal (SD) hasta al menos el codón de inicio gag.

Las líneas celulares de empaquetamiento pueden prepararse fácilmente (ver también WO 92/05266) y utilizarse para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vector retrovítico.

Las células productoras/células de empaquetamiento pueden ser de cualquier tipo de célula adecuado. Las células productoras son generalmente células de mamíferos pero pueden ser, por ejemplo, células de insecto.

Mediante el uso de líneas celulares productoras/de empaquetamiento, es posible propagar y aislar cantidades de partículas de vector retrovítico (por ejemplo, para preparar títulos adecuados de las partículas de vector retrovítico) para la posterior transducción de un sitio de interés.

Las líneas celulares de empaquetamiento son útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsidar y proporcionar una proteína de membrana para una producción de partículas de vector de alto título. La célula de empaquetamiento puede ser una célula cultivada *in vitro* como una línea celular de cultivo de tejidos. Las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero tales como líneas celulares obtenidas de fibroblastos murinos o líneas celulares humanas. La línea celular de empaquetamiento puede ser una línea celular humana, tal como, por ejemplo: HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

Hay dos procedimientos comunes para generar células productoras. En uno, las secuencias que codifican las proteínas retrovíricas Gag, Pol y Env se introducen en la célula y se integran de forma estable en el genoma celular; se produce una línea celular estable que se denomina línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce las proteínas necesarias para empaquetar el ARN retrovítico pero no puede provocar la encapsidación debido a la falta de una región psi.

Sin embargo, cuando se introduce un genoma de vector (que tiene una región psi) en la línea celular de empaquetamiento, las proteínas auxiliares pueden empaquetar el ARN del vector recombinante psi-positivo para producir el reservorio de virus recombinante. Esto se puede utilizar para transducir células receptoras. El virus recombinante cuyo genoma carece de todos los genes necesarios para producir proteínas víricas puede infectar solo una vez y no puede propagarse. Por lo tanto, se puede introducir una secuencia de ácido nucleico en el genoma de una célula hospedadora sin la generación de retrovirus potencialmente dañinos.

El segundo enfoque consiste en introducir las tres secuencias de ADN diferentes que se requieren para producir una partícula de vector retrovítica (es decir, las secuencias codificantes de env, la secuencia codificante de gag-pol y el genoma retrovítico defectuoso que contiene uno o más NDI) en la célula en el mismo tiempo por transfección transitoria y el procedimiento se denomina transfección triple transitoria. El documento WO 94129438 describe la producción de células productoras *in vitro* utilizando este método de transfección transitoria de ADN múltiple. El documento WO 97/27310 describe un conjunto de secuencias de ADN para crear células productoras retrovíricas *in vivo* o *in vitro* para reimplantación.

Los componentes del sistema vírico que se requieren para complementar el genoma del vector pueden estar presentes en uno o más "plásmidos productores" para la transfección en células.

La presente invención proporciona una célula productora que expresa una proteína marcadora de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la superficie celular, de modo que los vectores retrovíricos producidos por la célula se marcan con la proteína de marcaje.

La célula productora de la presente invención puede ser una célula de empaquetamiento que comprende genes que codifican las proteínas retrovéricas Gag, Pol y Env integradas de forma estable dentro del genoma. La línea celular de empaquetamiento se puede transducir con un sistema de vector vírico que comprende el genoma o se puede transfectar con un plásmido que lleve una construcción de ADN capaz de codificar el genoma de ARN.

La célula de empaquetamiento puede comprender una proteína Env que es una proteína de envoltura de la presente divulgación. Específicamente, la proteína Env puede ser una proteína de la envoltura que es o comprende una proteína de marcaje según el primer aspecto de la invención.

La proteína de marcaje se puede expresar en la célula productora o en la célula empaquetadora de la presente invención usando técnicas que son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, la línea de células productoras se puede transducir con un sistema de vector vírico o una construcción de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que es capaz de codificar una proteína de marcaje según el primer aspecto de la invención.

Como tal, la presente invención se refiere además a un método para fabricar una célula productora o una célula de empaquetamiento de acuerdo con la presente invención que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica una proteína de marcaje de acuerdo con el primer aspecto de la invención en una célula, de tal manera que la proteína de marcaje se expresa en la superficie celular.

La presente invención también proporciona un kit para fabricar una célula productora de la invención, que comprende:

- (i) un ácido nucleico que codifica una proteína de marcaje según el primer aspecto de la invención;
- (ii) un genoma de vector retrovérico; y opcionalmente
- (iii) ácidos nucleicos que comprenden los genes retrovéricos gag, pol y env.

La presente divulgación se refiere además a células productoras que producen vectores retrovéricos que comprenden una proteína de la envoltura de la presente divulgación. Específicamente, las células productoras pueden producir vectores retrovéricos que comprenden una proteína de la envoltura que es o comprende una proteína de marcaje de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La presente divulgación también proporciona un kit para fabricar dicha célula productora que comprende:

- (i) un ácido nucleico que codifica una proteína Env retrovérica de la presente divulgación; y
- (ii) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) proteínas Gag y Pol retrovéricas; y opcionalmente
- (iii) un genoma de vector retrovérico.

El genoma del vector retrovérico puede ser incapaz de codificar las proteínas gag, pol y env. Por tanto, el kit puede comprender uno o más plásmidos productores que codifican env, gag y pol, por ejemplo, un plásmido productor que codifica env y otro que codifica gag-pol.

Cuando el vector de retrovirus es un vector lentivírico, una célula de empaquetamiento, una célula productora o el kit tal como se describe anteriormente también puede comprender un gen *Rev* o un ácido nucleico que comprende un gen *Rev*.

MÉTODO

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para purificar un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje según el primer aspecto de la invención; que comprende la etapa de captura del vector retrovérico utilizando estreptavidina.

Se prevé que el uso de una pluralidad de proteínas marcadoras que comprenden uno de un dominio transmembrana, un anclaje de GPI o un dominio transmembrana de proteína de envoltura retrovérica aumentará la eficacia de la captura del vector retrovérico.

La estreptavidina se puede inmovilizar sobre un sustrato o estado sólido. Por ejemplo, la estreptavidina puede estar presente en una columna que contiene una matriz de unión o inmovilizada en perlas.

El método se puede realizar usando una proteína de marcaje de acuerdo con el primer aspecto de la invención en donde el dominio de unión comprende un epítipo de unión a estreptavidina. En el presente documento, el método puede comprender la etapa de captura de estreptavidina del vector retrovérico. El método también puede comprender la etapa de eluir el vector retrovérico capturado con estreptavidina con biotina.

Se puede realizar un método para purificar un vector retrovérico usando una proteína de marcaje en donde el dominio de unión comprende GST. En el presente documento, el método puede comprender la etapa de

captura del vector retrovítico utilizando glutatión reducido (GSH).

Se puede realizar un método para purificar un vector retrovítico usando una proteína de marcaje en la que el dominio de unión comprende un epítipo de unión a rituximab y/o un epítipo Qbend10. Se puede realizar un método usando una proteína de marcaje en la que el dominio de unión comprende un R8RQ. En el presente documento, el método puede comprender la etapa de captura del vector retrovítico usando un anticuerpo monoclonal de rituximab. El método puede comprender además la etapa de unir el vector retrovítico capturado con rituximab a la Proteína A.

La invención se describirá adicionalmente a continuación por medio de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la materia a poner en práctica la invención y que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: selección de un epítipo mimético de biotina

Se seleccionaron seis marcadores de péptidos miméticos de biotina para estudiar cómo de bien podían unirse a la estreptavidina cuando se expresaban como parte de una proteína de la superficie celular (Figura 1A). Se generó una construcción de expresión que codifica un péptido señal unido al amino terminal de estos marcadores. Además, el extremo carboxilo terminal de estos marcadores peptídicos se unió al pedúnculo de CD8, dominio transmembrana de CD8 y una pequeña parte del endodominio de CD8 suficiente para anclar la proteína a la membrana. Para probar su unión a estreptavidina, las células HEK 293T se transfectaron con cada construcción individualmente y las células se recogieron 48 horas después de la transfección y se tiñeron con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alociocianina (APC) (Figura 1B). Tres marcadores, long nanotag, short nanotag y la SBPtag no exhibieron ninguna unión a la estreptavidina en este formato; mientras que StreptagII, Flankedccstreptag y ccstreptag se unieron con éxito a estreptavidina en comparación con el control negativo.

Entonces se investigó el formato óptimo para expresar estos marcadores en la superficie celular para la unión de estreptavidina. Se construyeron plásmidos adicionales donde estos marcadores se expresan en un anclaje de GPI con una copia de los marcos de lectura abiertos de los marcadores y el anclaje de GPI con dos copias de los marcos de lectura abiertos separados por un enlazador basado en CD8 (las secuencias de aminoácidos anotadas de estas construcciones se muestran en la Figura 2). La unión de estos marcadores se comparó con la de las construcciones originales en las que los epítipos se colocaron en un pedúnculo de CD8.

Para probar su unión a estreptavidina, se transfectaron transitoriamente células HEK 293T con las construcciones y se tiñeron 48 horas después de la transfección con estreptavidina-APC (Figura 3). Las células de control positivo expresaron un marcador de unión de anticuerpo QBEND/10 (Q8); aquí, la tinción con QBEND/10 biotinilado les permitió a los presentes inventores comparar la unión de biotina de tipo silvestre de la diana de estreptavidina con la de los marcadores miméticos de la biotina como control.

Los tres marcadores expresados en un anclaje de GPI con un marco de lectura abierto (x1) no se unieron a estreptavidina-APC ya que su tinción tiene el mismo perfil que el control negativo. Los marcadores expresados en un pedúnculo de CD8 o un anclaje de GPI con dos marcos de lectura abiertos (2x) se unieron con éxito a la estreptavidina como lo indican las células positivas para el canal APC. Los tres marcadores no tuvieron diferencias significativas en la unión cuando se expresaron en el pedúnculo de CD8. Por el contrario, Flankedccstreptag mostró una mayor eficacia de unión que StreptagII y ccstreptag en un GPI (x2).

A continuación, se investigó la capacidad de estos marcadores para seleccionar lentivirus con perlas de estreptavidina utilizando Flankedccstreptag-pedúnculo de CD8 (MP11889, Figura 2) y Flankedccstreptag-d8-x2-GPI (MP13024, Figura 2).

Ejemplo 2: Selección de células K562 que expresan un epítipo mimético de biotina

Para establecer que las dos versiones de Flankedccstreptag son capaces de purificar el lentivirus del sobrenadante celular, se llevó a cabo un experimento inicial que incluía la selección de células K562 que expresaban estos marcadores en su superficie usando perlas de estreptavidina. Los presentes inventores razonaron que si los marcadores pudieran adherirse a una matriz de estreptavidina mientras se expresan en células con suficiente estabilidad para permitir la selección de las células que los expresan, también deberían ser adecuados para la captura lentivírica.

Las células K562 se transdujeron retrovéricamente para expresar los dos marcadores y se determinaron las eficacias de transducción mediante la expresión de eGFP usando citometría de flujo (gráfico de K562 transducido de la Figura 4). Posteriormente, las células transducidas se mezclaron con K562 no transducido para evaluar la eficacia de la clasificación utilizando dos perlas de estreptavidina obtenidas de Life Technologies (Dynabeads) y Miltenyi (Microbeads). La selección se realizó según el protocolo del fabricante. Las fracciones de células seleccionadas se recogieron tanto para la selección de cada marcador de epítipo como para su respectivo flujo continuo. Las células

K562 que expresan tanto flankedccstreptag-d8-x2-GPI como flankedccstreptag-L8 se clasificaron con éxito de la mezcla con la población NT K562 utilizando estreptavidina-dynabeads, como lo indica la falta de células positivas para eGFP en las fracciones de flujo continuo y su presencia en las fracciones seleccionadas. La selección con microperlas de estreptavidina de Miltenyi fue un éxito. Además, se descubrió que flankedccstreptag en un pedúnculo de CD8 presentaba una mayor eficacia de unión a la tinción del anticuerpo estreptavidina-APC en comparación con flankedccstreptag-d8-x2-GPI.

Ejemplo 3 - Marcaje indirecto de partículas lentivíricas con epítomos miméticos de biotina

Luego se investigó si la expresión de los marcadores en las células HEK293T daba como resultado partículas víricas que brotaban de la célula para madurar adquiriendo los epítomos en su superficie.

Las células 293T que expresan ambos epítomos por separado se establecieron mediante transducción retrovítica (Figura 5). Las eficacias de transducción de las células fueron casi el 100 % de células positivas basadas en la expresión de eGFP. Posteriormente, estas células, junto con las células NT-293T (control), se sometieron a triple transfección para producir lentivirus pseudotipado VSV-G utilizando un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la transfección y se procesaron para eliminar las células 293T suspendidas. Posteriormente, los sobrenadantes se incubaron con estreptavidina-dynabeads durante 2 horas a 4 °C con rotación. A continuación, las perlas se purificaron magnéticamente y se resuspendieron en medio fresco. Sucesivamente, se añadieron perlas seleccionadas a células NT-293T que se tiñeron para la expresión del transgén 72 horas después de la transducción (Figura 6).

Los tres sobrenadantes produjeron partículas lentivíricas funcionales, como lo indica la alta eficacia de transducción observada en los tres sobrenadantes brutos mediante la tinción del transgén en las células 293T diana (Figura 6A).

Las eficacias de transducción de la fracción purificada de perlas de LV-MP14585 (23,7 % y 14,2 %) y LV-MP14586 (11,1 % y 6,45 %) son más altas que las de LV-NT (1,43 % y 2,22 %). Esto demuestra que las partículas víricas no solo adquirieron los epítomos en su superficie, sino también que ambos epítomos de unión a estreptavidina se purifican del sobrenadante celular mediante perlas de estreptavidina. Estos resultados indican que las partículas lentivíricas se marcaron con éxito utilizando estos epítomos y se capturaron de los sobrenadantes celulares.

Tomando los resultados juntos, se consideró que flankedccstreptag en un pedúnculo de CD8 funcionaba mejor que flankedccstreptag en un anclaje de GPI (x2), ya que el primero presentó una mayor eficacia de unión tanto en la selección celular (Figura 4) como en la purificación vírica utilizando perlas de estreptavidina (Figura 6).

Ejemplo 4: análisis de otros marcadores de epítomos sintéticos

Se evaluó la capacidad de otros marcadores sintéticos para facilitar la purificación de partículas lentivíricas. Los marcadores adicionales evaluados fueron glutatión transferasa (GST), RTXep-QBEND10ep-RTXep-L8 (llamado RQR8) y marcador de polihistidina (marcador his o his-tag). Las secuencias de aminoácidos anotadas completas de los tres marcadores se muestran en la Figura 7.

Las eficacias de los diferentes marcadores (GST, RQR8 y His-tag) en la purificación de partículas lentivíricas de medios celulares, se probó usando el enfoque descrito previamente para flankedccstreptag (véase el Ejemplo 2), es decir, seleccionando las células K562 que expresan estos marcadores en su superficie. Las células K562 se transdujeron retrovéricamente con los epítomos flankedccstreptag, GST, RQR8 y H6 por separado (Figura 8, columna de preselección). Las células transducidas representaron una minoría de la población total basada en la expresión de eGFP; por lo tanto, las células no se mezclaron con las células NT-K562. Las poblaciones que expresan flankedccstreptag al 10,5 %, RQR8 al 9,75 %, GST al 22,7 % y H6 al 59,6 % se seleccionaron posteriormente con Dynabeads de estreptavidina, rituximab humano previamente incubado con perlas de proteína-A, perlas magnéticas de glutatión y Dynabeads de His-tag, respectivamente.

Se evaluó la presencia de células positivas en las fracciones recolectadas 12 días después de la selección. Las células K562 que expresan tanto flankedccstreptag como RQR8 se seleccionaron con éxito utilizando sus respectivas perlas, tal como indica la ausencia de células positivas para eGFP en las fracciones de flujo y su presencia en la fracción seleccionada con el 93,6 % y 89,4 % de células positivas para eGFP, respectivamente. Además, las células K562 que expresan el epítomo de GST se purificaron con éxito a partir de la población de preselección con el 91 % de células positivas para eGFP presentes en la fracción seleccionada. Sin embargo, el 10,6 % de células positivas para eGFP estaban presentes en la fracción de flujo continuo, lo que sugiere que las perlas estaban saturadas con su ligando. Por el contrario, la selección de K562 que expresaban H6 tuvo menos éxito ya que solo el 26,1 % de las células en la fracción seleccionada fueron positivas para eGFP mientras que el 71,1 % de las células fueron negativas para eGFP. Además, el 59,2 % de células positivas para eGFP estaban en el flujo continuo. Por tanto, los marcadores GST y RQR8 muestran la mejor actividad con respecto a la purificación de partículas víricas del sobrenadante celular de la misma manera que el epítomo flankedccstreptag.

Para demostrar aún más que los epítomos GST y RQR8 pueden purificar partículas víricas, las células 293T se

transdujeron retrovíricamente con estos marcadores para asegurar la expresión casi completa de cada población celular (Figura 9) antes de continuar con la producción vírica.

Del mismo modo que anteriormente, se triplicaron células 293T con epítomos positivos y se transfectaron para producir partículas lentivíricas pseudotipadas de VSV-G usando un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Después de haber tratado el sobrenadante para eliminar los restos celulares y las células 293T en suspensión, cada sobrenadante se incubó con su ligando respectivo unido a perlas magnéticas y se procesó como se indica en la Figura 10. Posteriormente, se usaron perlas/mezclas víricas recién resuspendidas para transducir células NT-293T diana. Las células transducidas se tñieron para la expresión del transgén 120 horas después de la transducción con el fin de diluir las perlas (Figura 10).

Todo el sobrenadante producido a partir de las células 293T que expresan flankedccstreptag (Figura 10A), RQR8 (Figura 10B) y GST (Figura 10C) estaban produciendo partículas víricas funcionales como lo indican las altas eficacias de transducción de las columnas sin dilución. Las células diana transducidas con la fracción purificada de LV marcados con flankedccstreptag y marcados con RQR8 dieron como resultado el 77,2 % y el 73,6 % de células transducidas, respectivamente.

Estos resultados juntos indican de manera concluyente que las partículas lentivíricas se pueden purificar a partir del sobrenadante celular bruto usando estos marcadores sintéticos y su respectivo ligando unido a una perla o columna. En la Figura 11 se muestra una representación esquemática de este proceso.

Ejemplo 5: La purificación de lentivirus es independiente de la envoltura

La capacidad de los marcadores sintéticos para purificar una envoltura vírica no tóxica (por ejemplo, RD114 variante RD-PRO) se determinó usando los marcadores flankedccstreptag y RQR8.

Se produjeron partículas víricas pseudotipadas de RD-PRO por transfección triple de células 293T que expresan los epítomos (Figura 9) como se mencionó anteriormente y se usó una mezcla de virus y perlas clasificadas para transducir células 293T diana (Figura 12).

Las células diana transducidas con LV puro en este experimento indican que el LV no marcado era capaz de una alta eficacia de transducción, mientras que el LV puro marcado con flankedccstreptag y RQR8 tenía una eficacia de transducción más baja de 30,5 % y 24,7 %, respectivamente. Estos resultados indican que el uso de RDpro en lugar de VSV-G disminuye el título de partículas víricas producidas. No obstante, las células diana transducidas con LV marcados con flankedccstreptag y RQR8 seleccionadas con sus respectivas perlas dieron como resultado un 28 % y un 14,1 % de células transducidas, respectivamente. Mientras que el LV no marcado incubado con perlas de proteína A de estreptavidina y hRTX dio como resultado un 0,42 % y un 1,10 % de células positivas para el transgén, lo que indica que las perlas clasifican específicamente las partículas víricas con su respectivo ligando en su superficie. Además, para LV marcado con flankedccstreptag, la incubación con perlas dio como resultado la purificación de casi todas las partículas víricas en comparación con la fracción de flujo continuo del control de LV no marcado. Estos resultados indican que tanto la purificación de LV marcado con flankedccstreptag como con RQR8 son independientes de la envoltura.

Ejemplo 6 - Transducción de células mononucleares de sangre periférica primaria

A continuación, se transdujeron células mononucleares óseas primarias periféricas (PBMC) con LV purificado con marcador pseudotipado con RDpro. Se extrajeron PBMC de 2 donantes sanos y se transdujeron con LV marcado con flankedccstreptag y marcado con RQR8 purificado con sus respectivas perlas sin el uso de retronectina (Figura 13).

Las eficiencias de transducción de todas las condiciones sin dilución en ambos donantes para el control de LV no marcado, LV marcado con RQR8 (Figura 13 A) y LV marcado con Flankedccstreptag (Figura 13.B) fueron alrededor del 75 % - 90 % positivos para el transgén codificado. Las PBMC se transdujeron con éxito con LV marcado con RQR8 y Flankedccstreptag purificado con sus respectivas perlas con el 30-50 % de células positivas para ambos marcadores en ambos donantes (n=3, representado gráficamente en el gráfico en la esquina inferior derecha). Sin embargo, sus eficacias de transducción fueron más bajas que las de las condiciones sin dilución. Estos resultados indican que las partículas de LV pseudotipados con RDpro marcados con RQR8 y Flankedccstreptag se pueden purificar a partir del sobrenadante celular para transducir con éxito células PBMC primarias.

Ejemplo 7: Aislamiento de partículas lentivíricas purificadas del ligando marcador

Las partículas víricas marcadas purificadas se eliminan de sus respectivos ligandos y se concentran.

Se añade biotina a las partículas víricas purificadas marcadas con Flankedccstreptag de manera que la biotina compita por la unión de estreptavidina y permita el desplazamiento del marcador flankedccstreptag y la posterior elución de partículas víricas. Para epítomos como RQR8 que no se pueden desplazar fácilmente mediante la adición

de un ligante competitivo activo para la proteína A, se diseña un sitio de escisión de trombina (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) en el enlazador de los epítomos. La adición de trombina permite que la proteasa se escinda entre los restos Arg y Gly, lo que permite la eliminación eficaz de las partículas víricas de los epítomos inmovilizados unidos a sus ligandos.

Ejemplo 8 - Construcción de proteínas de marcaje modificadas genéticamente basadas en proteínas de envoltura lentivíricas

La envoltura de RD114 se procesa mediante la eliminación del péptido señal y mediante escisión en un sitio de escisión de furina en fragmentos SU y TM (Figura 14).

Para generar RD114 SU marcado en su extremo amino con RQR, la secuencia RQR8 se insertó justo después del péptido señal de la envuelta RD114. Para permitir la orientación correcta para la unión y para aislar de la glicoproteína de la envoltura, se insertó un enlazador de serina-glicina entre RQR y SU. Después del procesamiento, el marcador RQR está en el extremo amino terminal del fragmento SU.

Para generar la TM marcada de la envoltura RD114 en su extremo amino con RQR, el marcador se insertó justo después del sitio de escisión de furina. De nuevo, se insertó un enlazador flexible entre RQR y el fragmento TM de la envoltura RD114. Después del procesamiento, RQR es accesible en el extremo amino terminal del dominio TM.

Para generar SU de RD114 marcada en su extremo amino con flankedstreptagcc, la secuencia del marcador se insertó justo después del péptido señal de la envoltura RD114. Para permitir la orientación correcta para la unión y para aislar de la glicoproteína de la envoltura, se insertó un enlazador de serina-glicina entre el marcador y SU. Después del procesamiento, el marcador ccstreptag está en el extremo amino terminal del fragmento SU.

Para generar TM de la envoltura RD114 marcada en su extremo amino con ccstreptag, el marcador se insertó justo después del sitio de escisión de furina. De nuevo, se insertó un enlazador flexible entre el marcador y el fragmento TM de la envoltura RD114. Después del procesamiento, ccstreptag es accesible en el extremo amino terminal del dominio TM.

Ejemplo 9 - Análisis de marcadores de purificación diseñados

Se determina la capacidad de las proteínas de la envoltura RD114 modificadas genéticamente para encapsular partículas víricas y dar como resultado partículas infecciosas. Esto se logra comparando el título del vector lentivírico generado con la envoltura RD114 marcada con la envoltura RD114 de tipo silvestre.

A continuación, se prueba la capacidad de acceder a los marcadores. Las líneas celulares se diseñan para expresar el RD114 mutante y las células se seleccionan usando perlas de Rituximab/proteína A y perlas de estreptavidina, respectivamente. Finalmente, la capacidad de capturar vectores lentivíricos se determina generando vectores lentivíricos con estas proteínas de la envoltura, capturando en una fase sólida afín y midiendo el título posterior. Estos resultados se comparan con proteínas marcadas independientes y en combinación con proteínas marcadas independientes.

Ejemplo 10: Elución de partículas víricas marcadas con biotina

Una vez que las partículas de LV con flankedccstreptag se purificaron utilizando Dynabeads de estreptavidina (0,5 mg/ml de sobrenadante de LV), las perlas unidas a LV se separaron magnéticamente del sobrenadante celular y se lavaron 5 veces con PBS usando una rejilla magnética. Después, las perlas unidas a LV se resuspendieron en la solución de elución que consiste en DMEM simple que contiene D-biotina 30 mM. La adición de polvo liofilizado de D-Biotina a DMEM simple seguido de incubación a 37 °C, con vórtice ocasional hasta que el polvo se haya disuelto, hizo la solución posterior. Las perlas unidas a LV se incubaron con solución de elución durante 2 horas a 4 °C con rotación. Posteriormente, los tubos se colocaron en una rejilla magnética para separar las perlas no unidas de las partículas víricas purificadas eluidas.

El eluido de perlas y el eluido de flujo continuo se analizaron mediante citometría de flujo y los resultados se muestran en las Figuras 17 y 18. Se demostró que las partículas de LV con flankedccstreptag se eluían de las perlas de estreptavidina mediante una solución de elución que contenía biotina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC

<120> Proteína

<130> P105388PCT

ES 2 818 112 T3

<150> GB1415344.9
<151> 29/08/2014

5 <160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Péptido mimético de biotina, streptagII

<400> 1

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

20 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido mimético de biotina, flankedccstreptag

<400> 2

Ala Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys
1 5 10 15

30 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido mimético de biotina, ccstreptag

40 <400> 3

Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys
1 5

45 <210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Dominio de unión StreptagII-d8-x2

<400> 4

ES 2 818 112 T3

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Trp Ser His Pro
 20 25 30

Gln Phe Glu Lys
 35

5 <210> 5
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dominio de unión Flankedccstreptag-d8-x2
 <400> 5

Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys Ser Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 20 25 30

Ile Ala Ser Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg
 35 40 45

Lys Ser
 50

15 <210> 6
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> dominio de glutatión S-transferasa (GST)
 <400> 6

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys
 20 25 30

25 Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys
 35 40 45

ES 2 818 112 T3

Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn
 50 55 60
 Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu
 100 105 110
 Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser
 115 120 125
 Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu
 130 135 140
 Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His
 145 150 155 160
 Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu
 165 170 175
 Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp
 180 185 190
 Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro
 195 200 205
 Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu
 210 215 220
 Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly
 245 250

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del epítipo de unión a rituximab

<400> 7

5

10

ES 2 818 112 T3

Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr
 1 5 10 15

Cys

5 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R15-C
 <400> 8

Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Cys
 1 5 10

15 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R3-C
 <400> 9

Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
 1 5 10

25 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R7-C
 35 <400> 10

Ala Cys Pro Phe Ala Asn Pro Ser Thr Cys
 1 5 10

40 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R8-, R12-, R18-C
 <400> 11

Ala Cys Asn Phe Ser Asn Pro Ser Leu Cys
 1 5 10

50 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R14-C

ES 2 818 112 T3

<400> 12

Ala	Cys	Pro	Phe	Ser	Asn	Pro	Ser	Met	Cys
1				5					10

5

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R16-C

<400> 13

Ala	Cys	Ser	Trp	Ala	Asn	Pro	Ser	Gln	Cys
1				5					10

15

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R17-C

25

<400> 14

Ala	Cys	Met	Phe	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Cys
1				5					10

30

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R19-C

<400> 15

Ala	Cys	Pro	Phe	Ala	Asn	Pro	Ser	Met	Cys
1				5					10

40

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R2-C

50

<400> 16

Ala	Cys	Trp	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Cys
1				5					10

55

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R10-C

ES 2 818 112 T3

<400> 17

Ala Cys Glu His Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

5 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido cíclico de 7-meros restringido por cisteína R13-C

<400> 18

Ala Cys Trp Ala Ala Asn Pro Ser Met Cys
1 5 10

15 <210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Mimétopo de rituximab

25 <400> 19

Gln Asp Lys Leu Thr Gln Trp Pro Lys Trp Leu Glu
1 5 10

30 <210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Epítipo de unión a QBEnd10

<400> 20

Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser
1 5 10 15

40 <210> 21
<211> 136
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Dominio de unión RQR8

50 <400> 21

ES 2 818 112 T3

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro
20 25 30

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
50 55 60

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
65 70 75 80

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
85 90 95

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
100 105 110

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val
115 120 125

Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
130 135

<210> 22

<211> 79

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia espaciadora de pedúnculo de CD8

<400> 22

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
1 5 10 15

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
20 25 30

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
35 40 45

Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
50 55 60

Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg
65 70 75

ES 2 818 112 T3

<210> 23
 <211> 85
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia espaciadora de pedúnculo de CD8 + Enlazador
 10 <400> 23

 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15

 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 20 25 30

 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 50 55 60

 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val
 65 70 75 80

 Cys Lys Cys Pro Arg
 85

 15 <210> 24
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de señal GPI de secuencia espaciadora

 <400> 24

 Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe Phe Val Ala Asn
 1 5 10 15

 Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser
 20 25
 25

 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia de rotura de cadena
 35 <400> 25

 Ser Gly Gly Gly Ser Asp Pro
 1 5

ES 2 818 112 T3

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador de serina-glicina

 10 <400> 26

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

 <210> 27
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> dominio transmembrana RD-PRO y endodominio

 20 <400> 27

Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ile Gly Pro Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp
20 25 30

Arg Leu Asn Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr Gln Ala
35 40 45

Leu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Gln Asp
50 55

 25 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> sitio de escisión de trombina

 <400> 28

 35 <210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido señal

 40 <400> 29

 45

ES 2 818 112 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
 20

5 <210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido señal
 <400> 30

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Ala Asp Gly
 20

15 <210> 31
 <211> 619
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Marcaje de RQR8 de RD114 SU
 <400> 31

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Arg Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

25 Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val

ES 2 818 112 T3

	35		40		45														
Ser	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser				
	50						55					60							
Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Phe	Asp	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala				
65					70					75					80				
Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Lys	Gln	His	Gly	Lys	Pro	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly				
				85					90					95					
Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Pro	Pro	Asn	Ser	Ile	Gln	Gln	Val	Thr	Cys				
			100					105						110					
Pro	Gly	Lys	Thr	Ala	Tyr	Leu	Met	Thr	Asn	Gln	Lys	Trp	Lys	Cys	Arg				
		115					120					125							
Val	Thr	Pro	Lys	Asn	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Gln	Asn	Cys				
	130					135					140								
Pro	Cys	Asn	Thr	Phe	Gln	Asp	Ser	Met	His	Ser	Ser	Cys	Tyr	Thr	Glu				
145					150					155					160				
Tyr	Arg	Gln	Cys	Arg	Ala	Asn	Asn	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Thr	Leu				
				165					170						175				
Leu	Lys	Ile	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	Asn	Glu	Val	Gln	Ile	Leu	Gln	Asn				
			180					185						190					
Pro	Asn	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Pro	Cys	Arg	Gly	Ser	Ile	Asn	Gln	Pro				
		195					200						205						
Val	Cys	Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Pro	Ile	His	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly				
	210					215					220								
Pro	Leu	Asp	Thr	Lys	Arg	Val	Trp	Thr	Val	Gln	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln				
225					230					235					240				
Ile	His	Lys	Ala	Met	His	Pro	Glu	Leu	Gln	Tyr	His	Pro	Leu	Ala	Leu				
				245					250						255				
Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	Arg	Thr	Phe	Asp	Ile				
			260					265					270						
Leu	Asn	Thr	Thr	Phe	Arg	Leu	Leu	Gln	Met	Ser	Asn	Phe	Ser	Leu	Ala				
		275					280					285							

ES 2 818 112 T3

Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala
 290 295 300

Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn
 305 310 315 320

Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe
 325 330 335

Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln
 340 345 350

Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn
 355 360 365

Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly
 370 375 380

Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu Pro Gln Asn Trp Thr Gly Leu Cys
 385 390 395 400

Val Gln Ala Ser Leu Leu Pro Asp Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu
 405 410 415

Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg
 420 425 430

Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala
 435 440 445

Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr
 450 455 460

Lys Leu Ser His Gln Leu Ile Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr
 465 470 475 480

Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu
 485 490 495

Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile
 500 505 510

Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly
 515 520 525

Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg
 530 535 540

ES 2 818 112 T3

Arg Glu Ser Leu Ala Ser Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe
545 550 555 560

Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu
565 570 575

Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile
580 585 590

Asn Asp Arg Leu Asn Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr
595 600 605

Gln Ala Leu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Gln Asp
610 615

<210> 32
<211> 619
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcaje de RQR de RD114 TM

<400> 32

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Asn Leu
65 70 75 80

Thr Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln
85 90 95

Asp Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Ala
100 105 110

Asn Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
115 120 125

ES 2 818 112 T3

Ser Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln
130 135 140

Ser Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr
145 150 155 160

Ala Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg
165 170 175

Val Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met His
180 185 190

Pro Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp
195 200 205

Leu Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg
210 215 220

Leu Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys
225 230 235 240

Leu Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu
245 250 255

Thr Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile
260 265 270

Pro Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu
275 280 285

Ser Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val
290 295 300

Thr Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys
305 310 315 320

Ala Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr
325 330 335

Tyr Leu Pro Gln Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu
340 345 350

Pro Asp Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala
355 360 365

Ile Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Cys Pro Tyr Ser Asn Pro
370 375 380

ES 2 818 112 T3

Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr
 385 390 395 400

Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
 405 410 415

Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 420 425 430

Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala
 435 440 445

Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr
 450 455 460

Lys Leu Ser His Gln Leu Ile Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr
 465 470 475 480

Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu
 485 490 495

Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile
 500 505

Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly
 515 520 525

Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg
 530 535 540

Arg Glu Ser Leu Ala Ser Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe
 545 550 555 560

Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu
 565 570 575

Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile
 580 585 590

Asn Asp Arg Leu Asn Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr
 595 600 605

Gln Ala Leu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Gln Asp
 610 615

<210> 33
 <211> 585

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Marcaje de Flankedccstreptag de RD114 SU

<400> 33

ES 2 818 112 T3

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
1 5 10 15

Arg Ala Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala
35 40 45

Leu Val Gln Lys Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln
50 55 60

Val Ser Glu Ala Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Thr Ala Tyr Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr
85 90 95

Pro Lys Asn Leu Thr Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys
100 105 110

Asn Thr Phe Gln Asp Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg
115 120 125

Gln Cys Arg Ala Asn Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys
130 135 140

Ile Arg Ser Gly Ser Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn
145 150 155 160

Gln Leu Leu Gln Ser Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys
165 170 175

Trp Ser Ala Thr Ala Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu
180 185 190

Asp Thr Lys Arg Val Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His
195 200 205

Lys Ala Met His Pro Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys
210 215 220

ES 2 818 112 T3

Val Arg Asp Asp Leu Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Thr Thr Phe Arg Leu Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp
 245 250 255
 Cys Trp Leu Cys Leu Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro
 260 265 270
 Thr Pro Ser Leu Thr Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser
 275 280 285
 Cys Gln Ile Ile Pro Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn
 290 295 300
 Ser Ser Cys Leu Ser Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp
 305 310 315 320
 Leu Gly Ala Val Thr Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser
 325 330 335
 Ser Pro Leu Cys Ala Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn
 340 345 350
 Met Ala Tyr Thr Tyr Leu Pro Gln Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Gln
 355 360 365
 Ala Ser Leu Leu Pro Asp Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val
 370 375 380
 Pro Ile Pro Ala Ile Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val
 385 390 395 400
 Gln Phe Ile Pro Leu Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr
 405 410 415
 Thr Gly Ala Thr Gly Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu
 420 425 430
 Ser His Gln Leu Ile Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln
 435 440 445
 Asp Leu Gln Asp Gln Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn
 450 455 460
 Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu
 465 470 475 480

ES 2 818 112 T3

Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val
 485 490 495

Arg Asn Lys Ile Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu
 500 505 510

Ser Leu Ala Ser Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro
 515 520 525

Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu
 530 535 540

Thr Ile Gly Pro Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp
 545 550 555 560

Arg Leu Asn Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr Gln Ala
 565 570 575

Leu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Gln Asp
 580 585

<210> 34
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Marcaje de Flankedccstreptag de RD114 TM

<400> 34

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
 20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln
 85 90 95

ES 2 818 112 T3

Asp Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Ala
 100 105 110

Asn Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
 115 120 125

Ser Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln
 130 135 140

Ser Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr
 145 150 155 160

Ala Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg
 165 170 175

Val Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met His
 180 185 190

Pro Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp
 195 200 205

Leu Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg
 210 215 220

Leu Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu
 245 250 255

Thr Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile
 260 265 270

Pro Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu
 275 280 285

Ser Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val
 290 295 300

Thr Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys
 305 310 315 320

Ala Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr
 325 330 335

Tyr Leu Pro Gln Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu
 340 345 350

ES 2 818 112 T3

Pro Asp Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala
 355 360 365

Ile Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Glu Cys His Pro Gln Gly
 370 375 380

Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Val
 385 390 395 400

Gln Phe Ile Pro Leu Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr
 405 410 415

Thr Gly Ala Thr Gly Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu
 420 425 430

Ser His Gln Leu Ile Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln
 435 440 445

Asp Leu Gln Asp Gln Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn
 450 455 460

Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu
 465 470 475 480

Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val
 485 490 495

Arg Asn Lys Ile Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu
 500 505 510

Ser Leu Ala Ser Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro
 515 520 525

Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu
 530 535 540

Thr Ile Gly Pro Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp
 545 550 555 560

Arg Leu Asn Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr Gln Ala
 565 570 575

Leu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Gln Asp
 580 585

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 818 112 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido mimético de biotina, long nanotag

5

<400> 35

Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido mimético de biotina, short nanotag

<400> 36

Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
1 5

20

<210> 37
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido mimético de biotina, SBP-tag

30

<400> 37

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
35

35

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Péptido mimético de biotina, streptag

<400> 38

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
1 5

45

<210> 39
<211> 565
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia de aminoácidos pRDpro

ES 2 818 112 T3

<400> 39

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
 20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln
 85 90 95

Asp Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Ala
 100 105 110

Asn Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
 115 120 125

Ser Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln
 130 135 140

Ser Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr
 145 150 155 160

Ala Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg
 165 170 175

Val Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met His
 180 185 190

Pro Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp
 195 200 205

Leu Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg

ES 2 818 112 T3

Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile
 465 470 475 480

Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Ser
 485 490 495

Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro
 500 505 510

Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro
 515 520 525

Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp Arg Leu Asn Val
 530 535 540

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Gln Tyr Gln Ala Leu Lys Ala Glu
 545 550 555 560

Glu Glu Ala Gln Asp
 565

- <210> 40
- <211> 564
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de aminoácidos RD114
- <400> 40

ES 2 818 112 T3

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
 20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp
 85 90 95

Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile

ES 2 818 112 T3

Asp Ile Asp Ile Asn Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile
 355 360 365

Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu
 370 375 380

Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly
 385 390 395 400

Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu Ile
 405 410 415

Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln
 420 425 430

Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp
 435 440 445

Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys
 450 455 460

Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Thr Asn
 485 490 495

Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 500 505 510

Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys
 515 520 525

Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp Arg Leu Asn Val Val
 530 535 540

His Ala Met Val Leu Ala Gln Gln Tyr Gln Ala Leu Lys Ala Glu Glu
 545 550 555 560

Glu Ala Gln Asp

<210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de escisión de furina

5

10

ES 2 818 112 T3

<400> 41

Arg Pro Lys Arg
1

5 <210> 42
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido señal

<400> 42

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

15 Asp His Ala Asp Ala
20

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido mimético de biotina

25 <400> 43

Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys
1 5 10

30 <210> 44
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Pedúnculo de CD8 con secuencia enlazadora

<400> 44

ES 2 818 112 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 50 55 60

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val
 65 70 75 80

Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
 85

5 <210> 45
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Anclaje de GPI con enlazador
 <400> 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser
 20 25 30

15 <210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> enlazador de CD8
 <400> 46

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15

25 Thr Ile Ala Ser
 20

30 <210> 47
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 818 112 T3

<223> Secuencia de aminoácidos de flankedccstreptag-L8

<400> 47

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu
20 25 30

Gly Arg Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
35 40 45

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
50 55 60

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
65 70 75 80

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
85 90 95

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg
100 105 110

Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
115 120

5

<210> 48

<211> 339

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de glutatión S-transferasas-L8

15

<400> 48

ES 2 818 112 T3

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys
 20 25 30

Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys
 35 40 45

Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn
 50 55 60

Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile
 65 70 75 80

Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile
 85 90 95

Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu
 100 105 110

ES 2 818 112 T3

Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser
 115 120 125

Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu
 130 135 140

Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His
 145 150 155 160

Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu
 165 170 175

Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp
 180 185 190

Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro
 195 200 205

Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu
 210 215 220

Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 245 250 255

Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
 260 265 270

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 275 280 285

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
 290 295 300

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 305 310 315 320

Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg
 325 330 335

Pro Val Val

<210> 49
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 818 112 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de RTXep-QBEND10ep-RTXep-L8

5

<400> 49

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
145 150 155

<210> 50

10

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> secuencia de aminoácidos H6-L8

<400> 50

ES 2 818 112 T3

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Ser His His His His His His Ser Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 35 40 45

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 50 55 60

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 65 70 75 80

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 85 90 95

Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro
 100 105 110

Arg Pro Val Val
 115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula productora de retrovirus que expresa una proteína de marcaje en la superficie celular, de tal manera que los vectores retrovéricos producidos por la célula se marquen con la proteína marcaje, en donde la proteína de marcaje comprende:
- 10 i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
ii) un espaciador; y
iii) un dominio de direccionamiento de membrana
- de tal manera que, cuando se incorpora a un vector retrovérico, la proteína de marcaje facilita la purificación del vector retrovérico del sobrenadante celular mediante la unión de la proteína marcadora a la estreptavidina; en donde el dominio de unión comprende un imitador de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43 que se une a la estreptavidina con una afinidad menor que la biotina, de modo que se pueda usar biotina para eluir vectores retrovéricos capturados por estreptavidina producidos por la célula; y en donde el dominio de dirección de la membrana comprende un dominio transmembrana y un endodominio.
- 15 2. Una célula productora de retrovirus que expresa una proteína de marcaje en la superficie celular, de tal manera que los vectores retrovéricos producidos por la célula se marquen con la proteína marcaje, en donde la proteína de marcaje comprende:
- 20 i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
ii) un espaciador; y
iii) un dominio de direccionamiento de membrana
- 25 de tal manera que, cuando se incorpora a un vector retrovérico, la proteína de marcaje facilita la purificación del vector retrovérico del sobrenadante celular mediante la unión de la proteína marcadora a la estreptavidina; en donde el dominio de unión comprende un imitador de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43 que se une a la estreptavidina con una afinidad menor que la biotina, de modo que se pueda usar biotina para eluir vectores retrovéricos capturados por estreptavidina producidos por la célula; en donde el dominio de unión comprende dos o más epítomos de unión a estreptavidina; y en donde el dominio de direccionamiento de la membrana comprende un anclaje de GPI.
- 30 3. Una célula productora según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el espaciador comprende un pedúnculo de CD8.
- 35 4. Una célula productora de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína de marcaje también comprende un sitio de escisión, escisión en la que liberan vectores retrovéricos unidos a la estreptavidina.
- 40 5. Una célula productora según la reivindicación 4, en donde la proteína de marcaje comprende un enlazador entre el dominio de unión y el espaciador, cuyo enlazador es o comprende el sitio de escisión.
6. Una célula productora según la reivindicación 4 o 5, en donde el sitio de escisión se escinde por trombina.
- 45 7. Una célula productora según la reivindicación 1, en donde el dominio transmembrana y el endodominio es efectivamente el mismo que el transmembrana y el endodominio de la proteína de la envoltura de un vector retrovérico.
- 50 8. Una célula productora según la reivindicación 7, que comprende el dominio transmembrana y el endodominio de la proteína de la envoltura RD-PRO.
9. Una célula productora según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID NO. 5.
- 55 10. Un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje que comprende:
- 60 i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
ii) un espaciador; y
iii) un dominio de direccionamiento de membrana
- en donde el dominio de unión comprende un mimético de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43; y en donde el dominio de dirección de la membrana comprende un dominio transmembrana y un endodominio.
- 65 11. Un vector retrovérico que comprende una proteína de marcaje que comprende:

- i) un dominio de unión que se une a la estreptavidina
- ii) un espaciador; y
- iii) un dominio de direccionamiento de membrana

- 5 en donde el dominio de unión comprende un mimético de biotina que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 43;
en donde el dominio de unión comprende dos o más epítomos de unión a estreptavidina; y en donde el dominio de direccionamiento de la membrana comprende un anclaje de GPI.
- 10 12. Una célula de empaquetamiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende genes que codifican las proteínas retrovéricas Gag, Pol y Env integradas de forma estable dentro del genoma celular.
- 15 13. Un método para fabricar una célula productora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una célula de empaquetamiento según la reivindicación 12, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica la proteína de marcaje en una célula, de tal manera que la proteína de marcaje se expresa en la superficie celular.
14. Un kit para fabricar una célula productora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que produce vectores retrovéricos, comprendiendo el kit:
- 20 (i) un ácido nucleico que codifica la proteína de marcaje; y
(ii) un genoma de vector retrovérico; y opcionalmente
(iii) ácidos nucleicos que comprenden los genes lentivéricos gag, pol y env.
- 25 15. Un método para purificar un vector retrovérico según la reivindicación 10 u 11, que comprende la etapa de captura del vector retrovérico usando estreptavidina.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la estreptavidina está inmovilizada sobre un sustrato sólido; presente en una columna que contiene la matriz de unión; o inmovilizada sobre perlas.
- 30 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, que también comprende la etapa de eluir el vector retrovérico capturado con estreptavidina con biotina.

Construcción	Código	Señal	Secuencia	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11885 - Long nanotag	MP11885	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	DYEAWLDERVPLVET	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11886 - Short nanotag	MP11886	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	DYEAWLGAR	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11887 - Strep-tag II	MP11887	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	WVSHIQFEK	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11888 - SBP-tag	MP11888	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	MDEKTTGMRGGHWEGLAGELERARLEHHPQGQREP	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11889 - flanked ccstreptag	MP11889	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	ECHPQGPPCEGRK	Pedúnculo de CD8 con enlazador
MP11890 - Ccstreptag	MP11890	MGTSLLCWMALCLLGADHADA	CHPQGPPC	Pedúnculo de CD8 con enlazador

(B) Pedúnculo de CD8 con secuencia de enlazador:
 [SGGGSPAPRPTPTPTASQPLSRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDYMWAPLAGTCGVLLSLVILYCNHRNRRRVCKCPRPW]

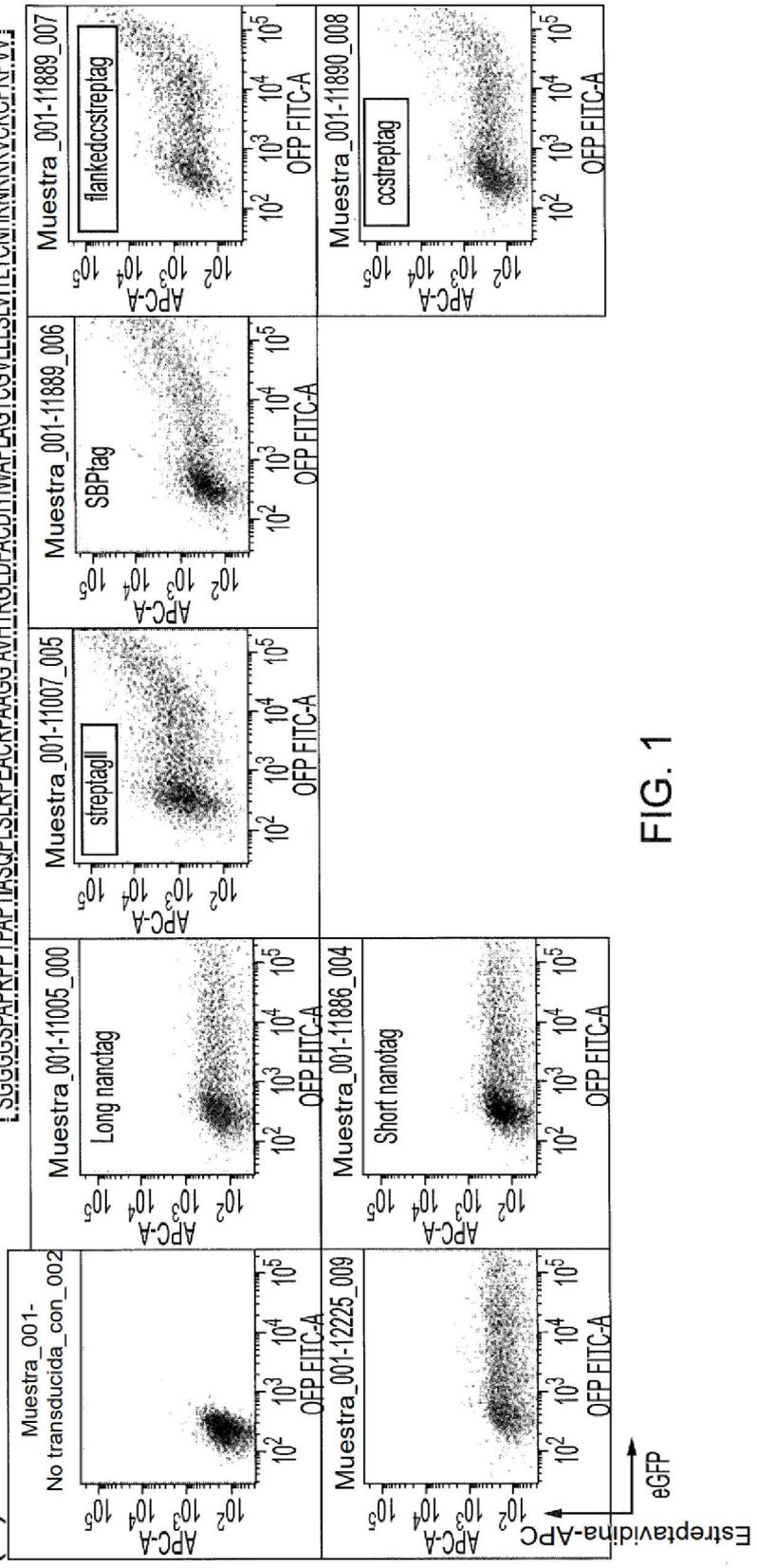


FIG. 1

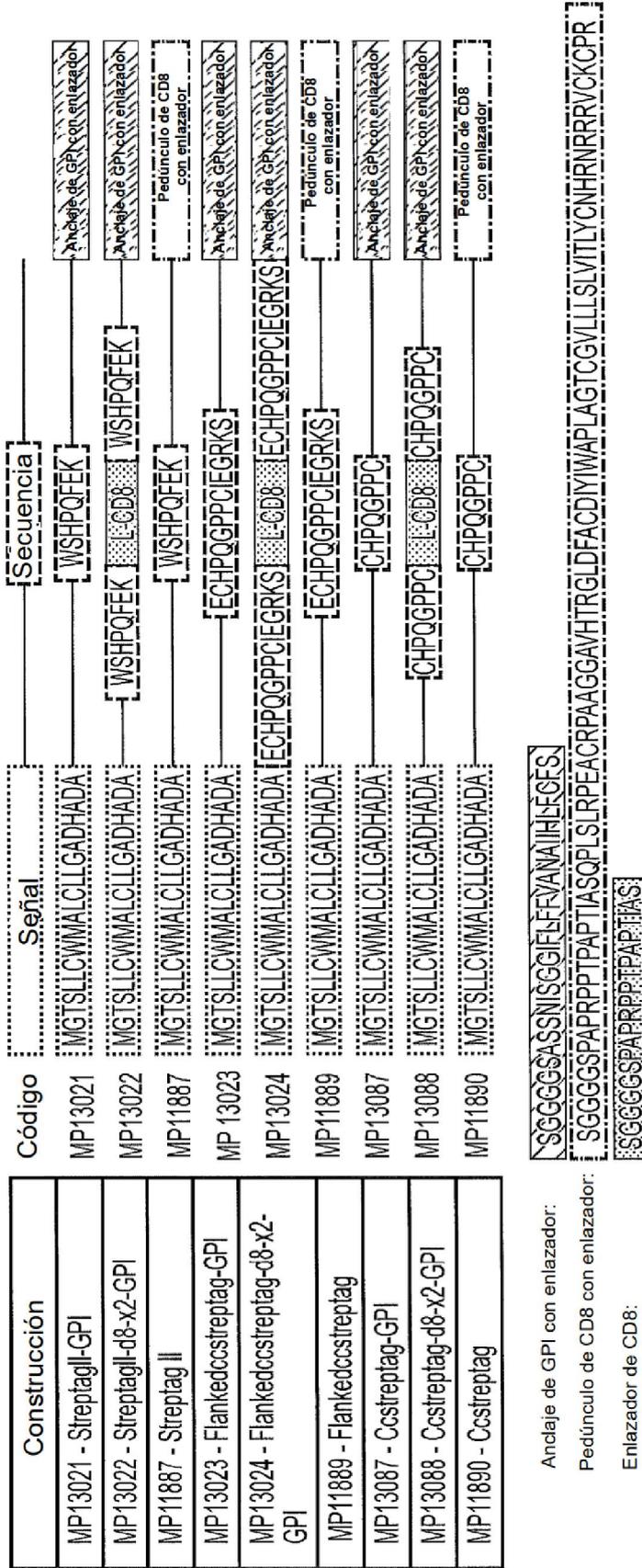


FIG. 2

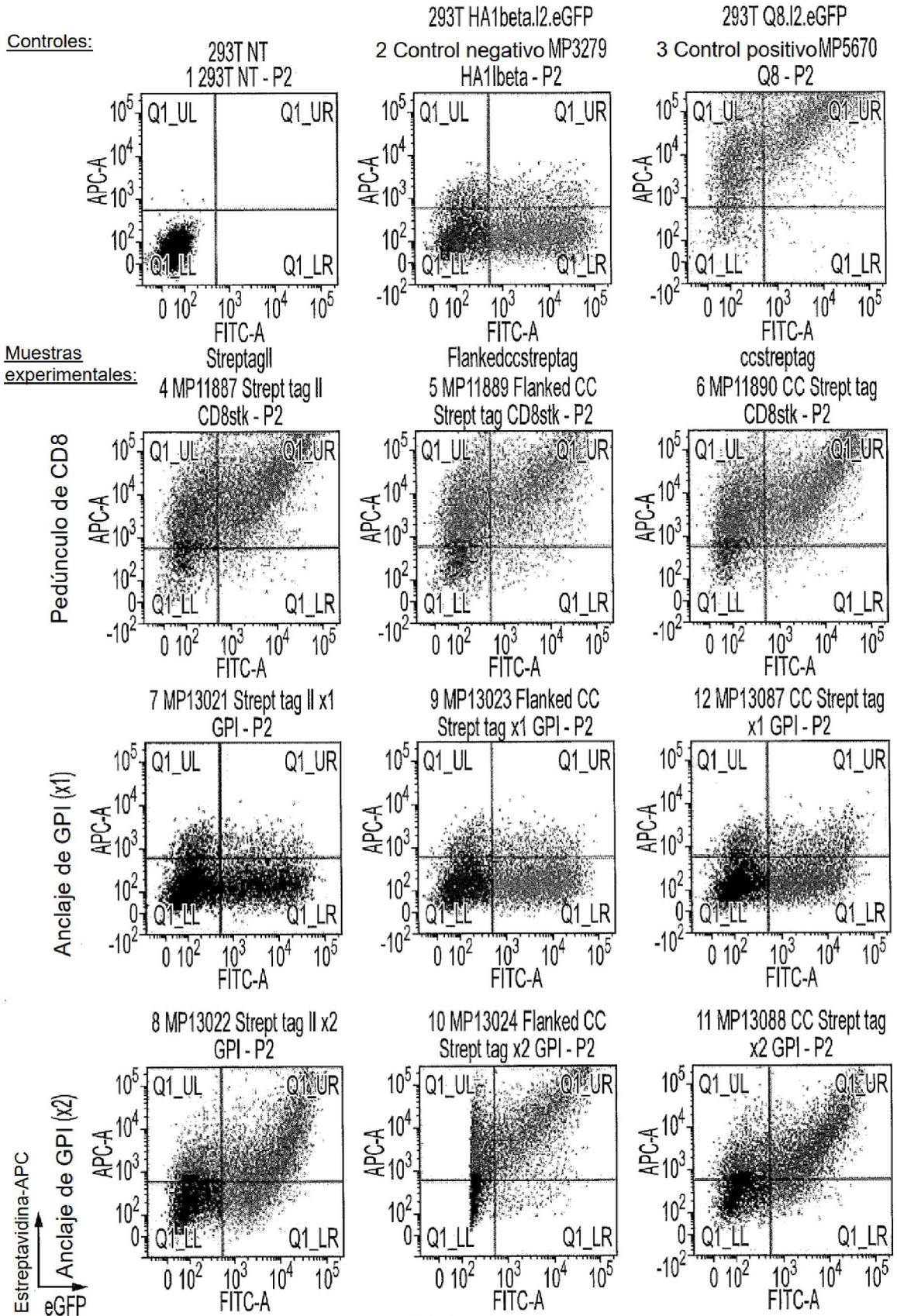
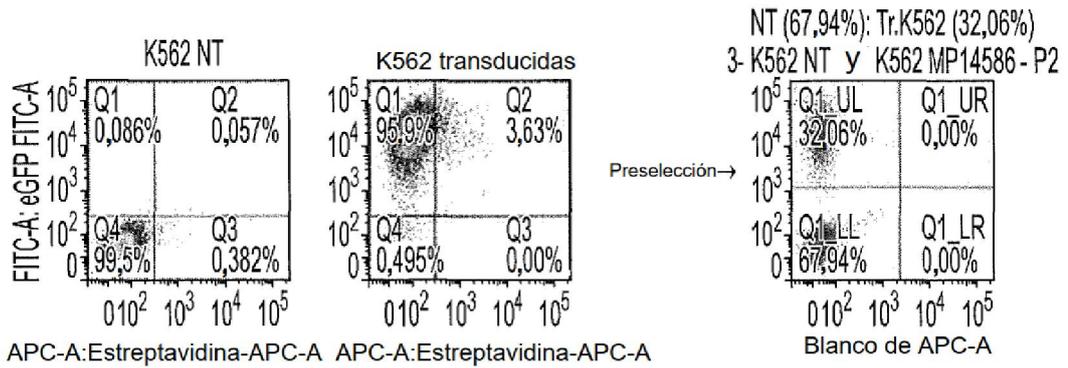
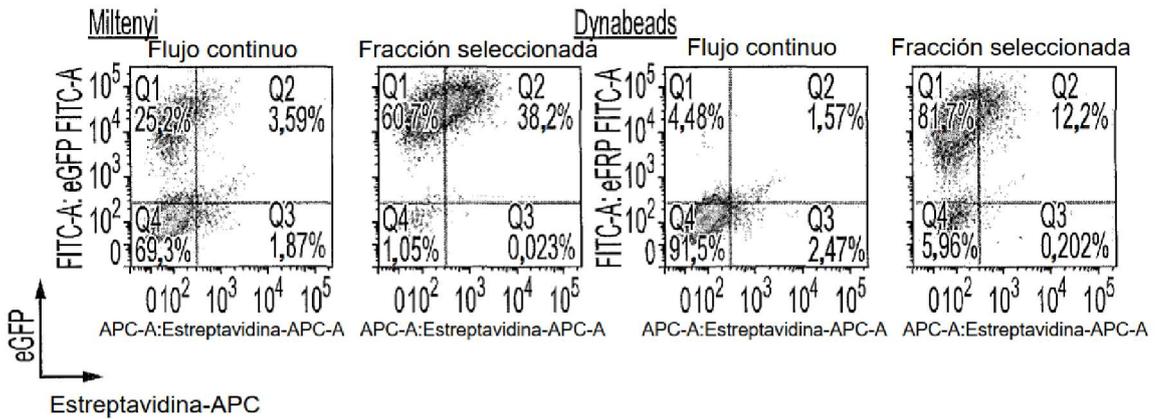


FIG. 3

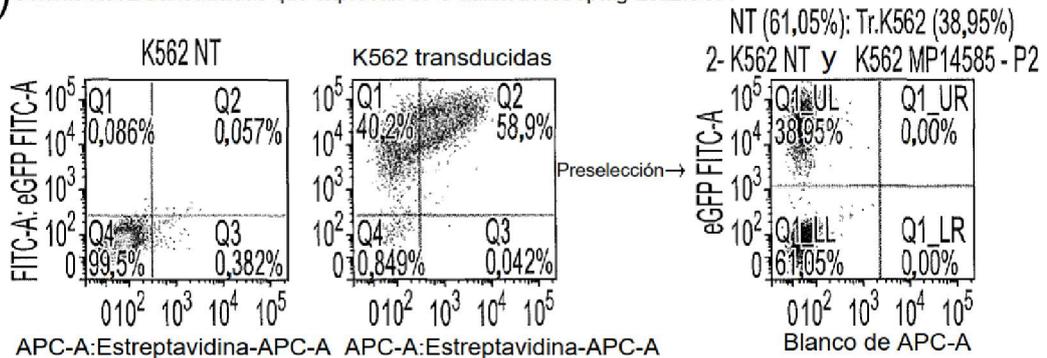
(A) Células K562 transducidas que expresan SFG-flankedccstreptag-d8-x2-GPI.I2.eGFP



9 días tras la selección →



(B) Células K562 transducidas que expresan SFG-flankedccstreptag-L8.I2.eGFP



9 días tras la selección →

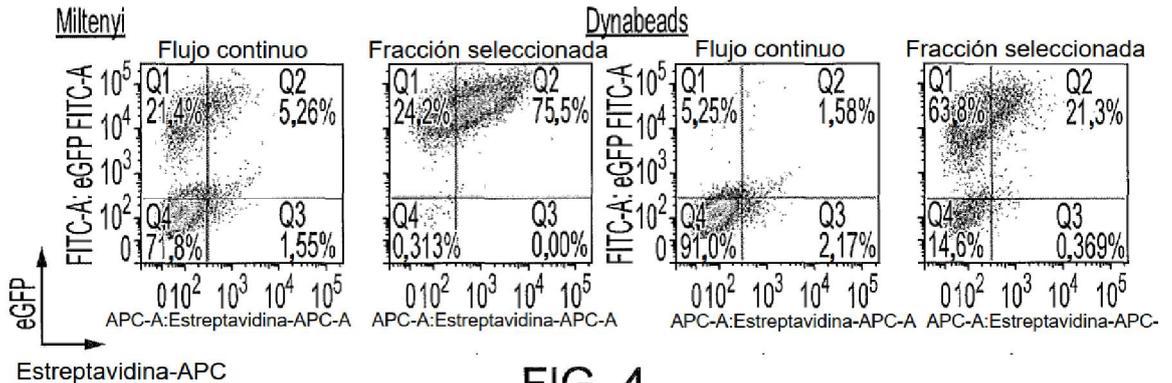


FIG. 4

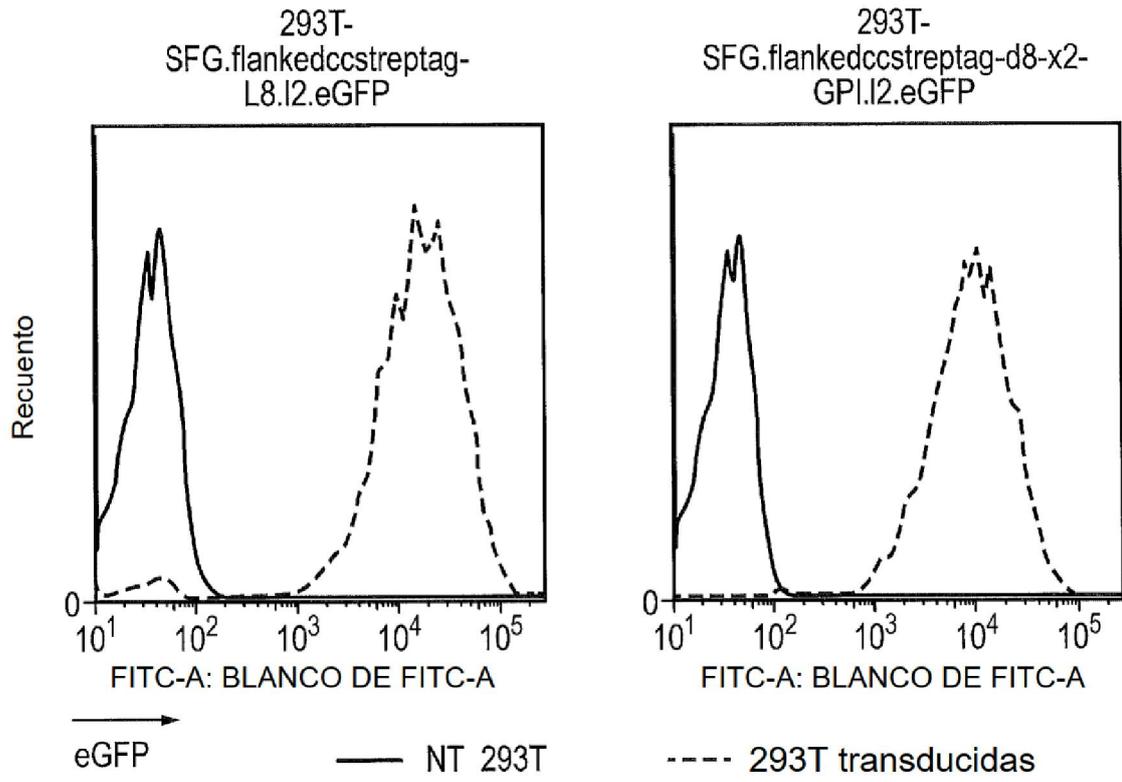


FIG. 5

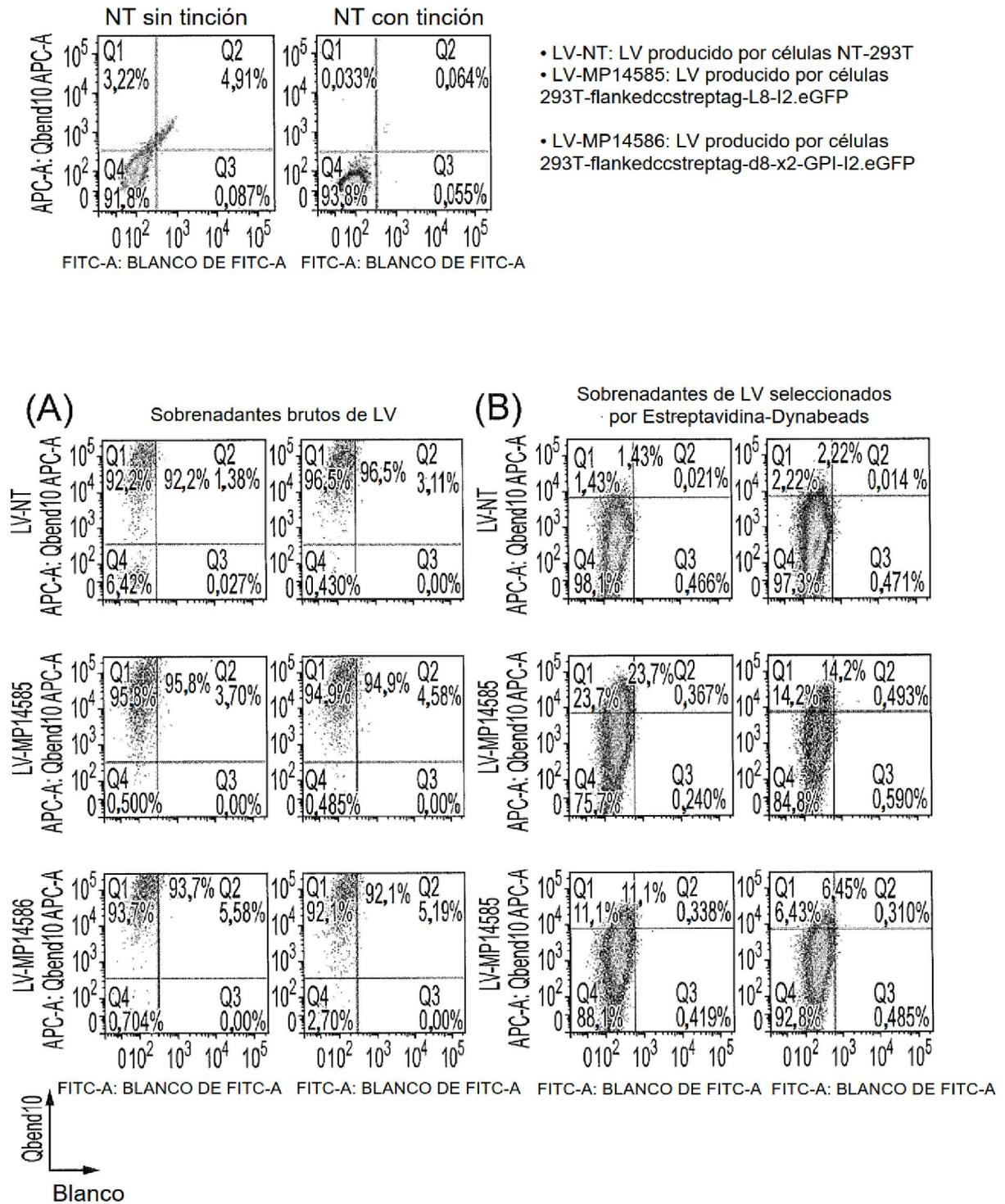


FIG. 6

A) Secuencia de aminoácidos de Flankedccstreptag-L8:

MGTSLLCWMALCLLGADHADA~~ECHPQGP~~PCIEGRK~~SGGGGS~~PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

~~Péptido señal~~ - ~~Flankedccstreptag~~ - ~~Enlazador~~ - Pedúnculo de CD8

B) Secuencia de aminoácidos de glutatión S-transferasas-L8 (GST-L8):

MGTSLLCWMALCLLGADHADAMSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCCKERAELISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWQATFGGGDHPKSDLEVLFOGPLG~~SGGGGS~~PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

~~Péptido señal~~ - ~~GST~~ - ~~Enlazador~~ - Pedúnculo de CD8

C) Secuencia de aminoácidos de RTXep-QBEND10ep-RTXep-L8 (RQR8-L8):

MGTSLLCWMALCLLGADHADA~~CPYSNPSLC~~SGGGGS~~ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA~~CPYSNPSLC~~SGGGGS~~PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

~~Péptido señal~~ - ~~Epítipo de Rituximab~~ - ~~Enlazador~~ - Qbend10 - ~~Enlazador~~ - Epítipo de Rituximab - ~~Enlazador~~ - Pedúnculo de CD8

D) Secuencia de aminoácidos de H6-L-8

MGTSLLCWMALCLLGADHADA~~SHHHHHHS~~SGGGGS~~PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRVV~~

~~Péptido señal~~ - ~~HexaHis~~ - ~~Enlazador~~ - Pedúnculo de CD8

FIG. 7

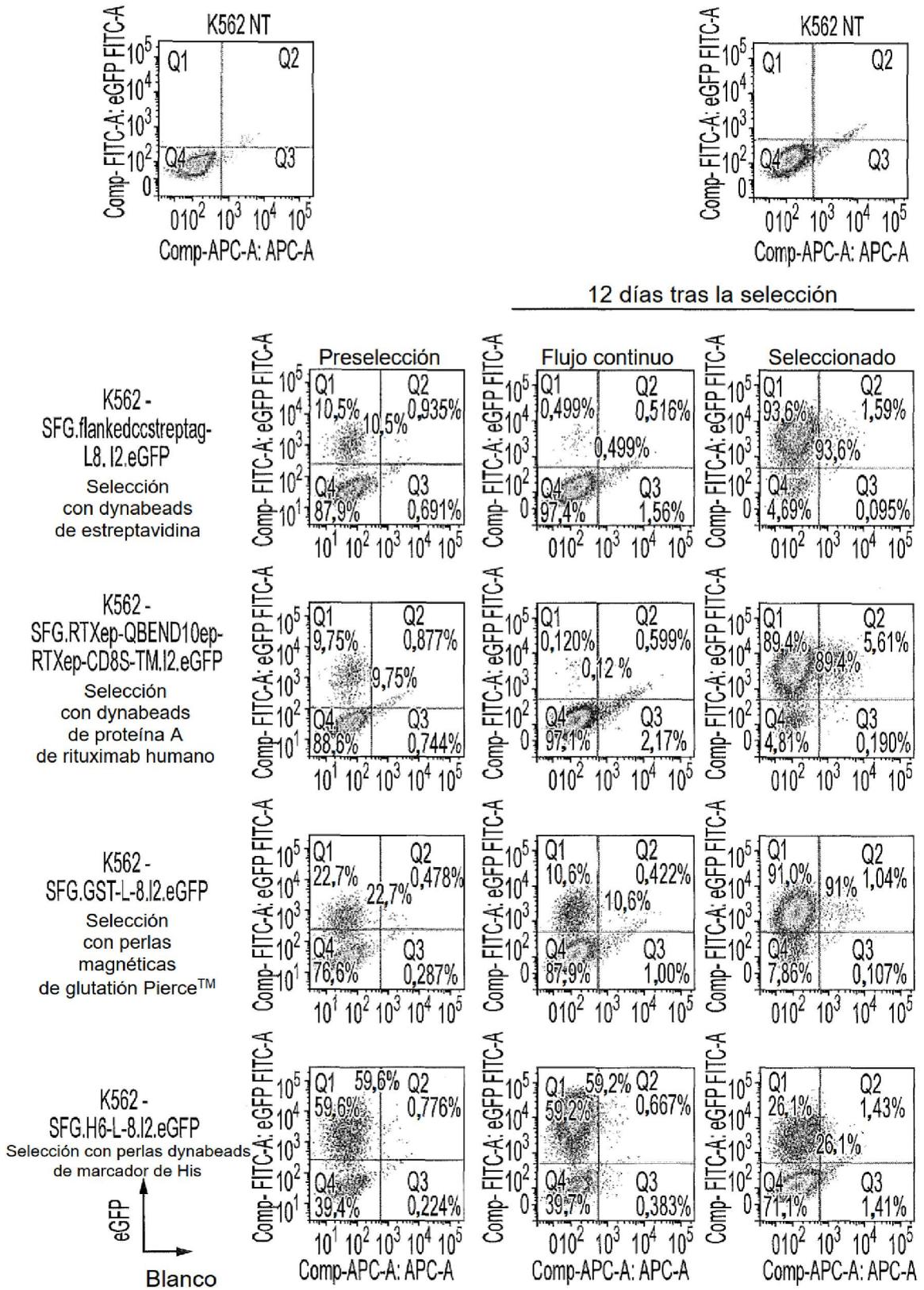


FIG. 8

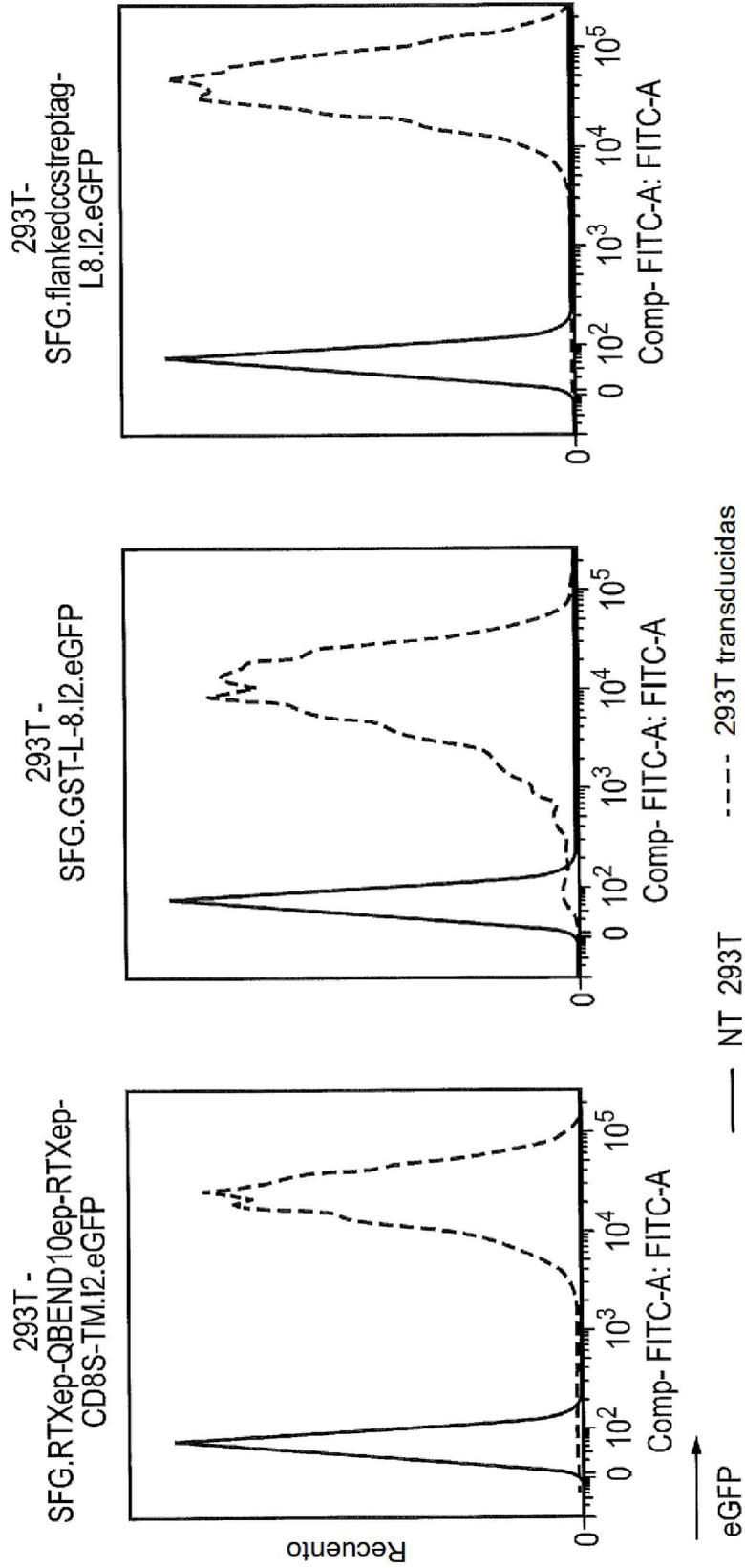


FIG. 9

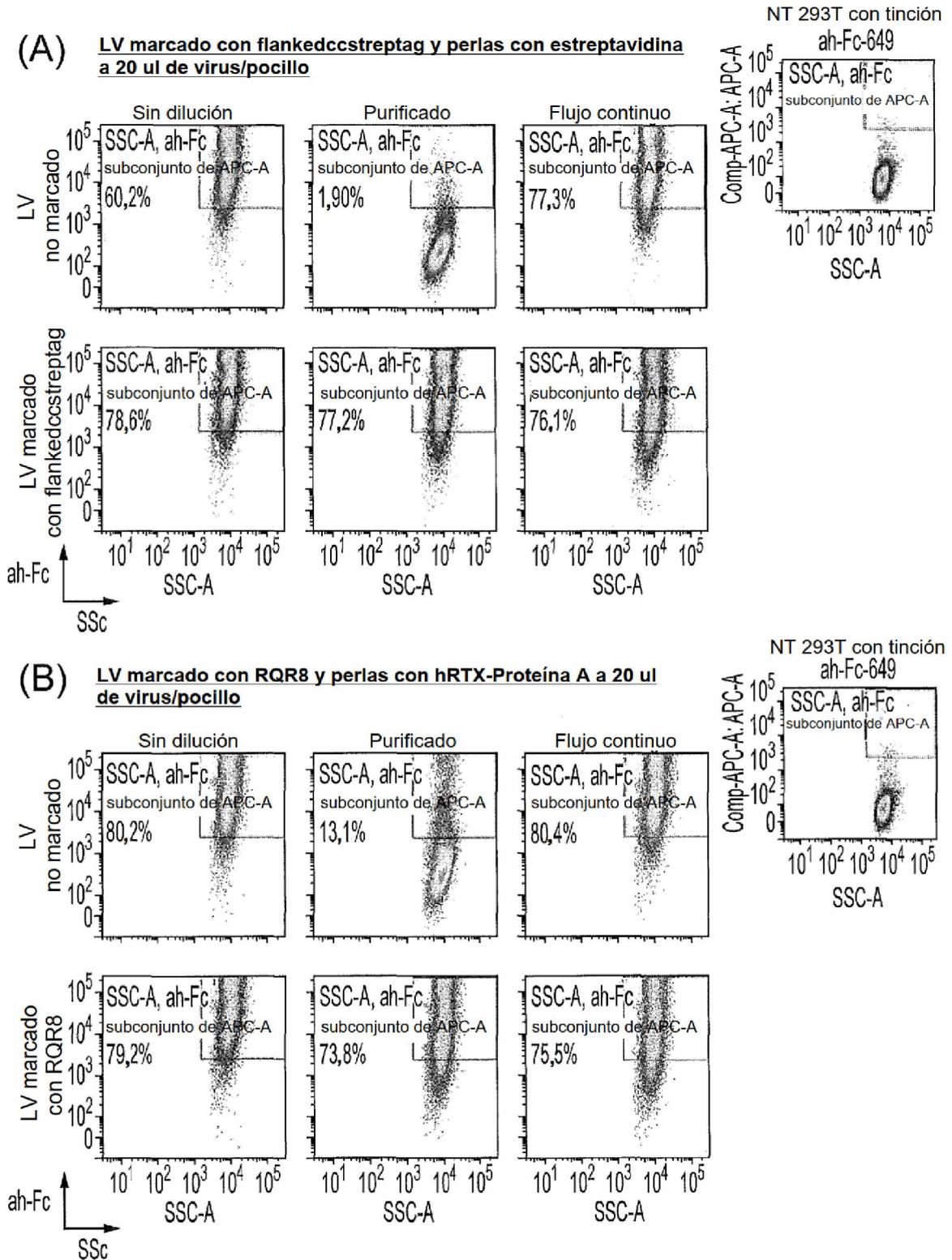


FIG. 10

(C) GST-LV y perlas con glutatión a 20 ul de virus/pocillo

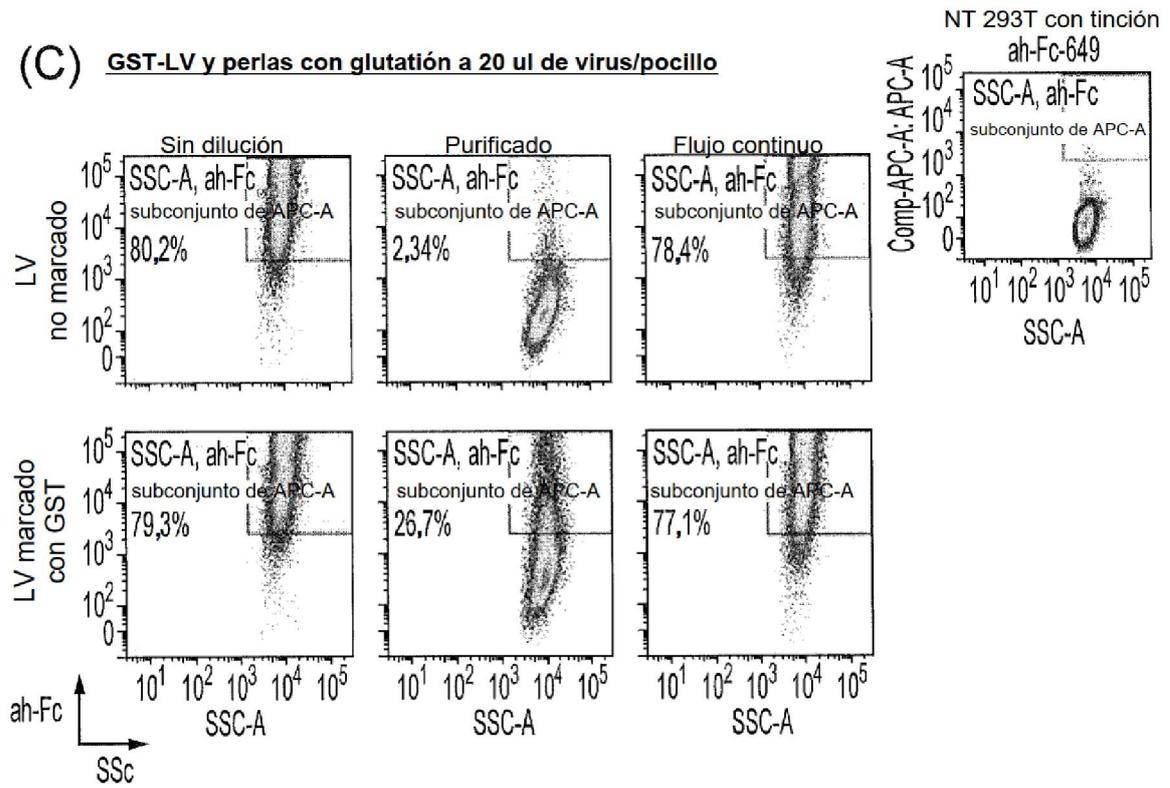


FIG. 10 (continuación)

1- Las partículas lentivíricas se marcan con uno de los siguientes epítomos:

2- En presencia de los respectivos marcadores, los ligandos se unen a la perla (agarosa, sephadex o magnética) o a la columna:

3- Las partículas lentivíricas marcadas se pueden purificar y concentrar a partir de sobrenadante celular mediante interacciones epítipo-ligando

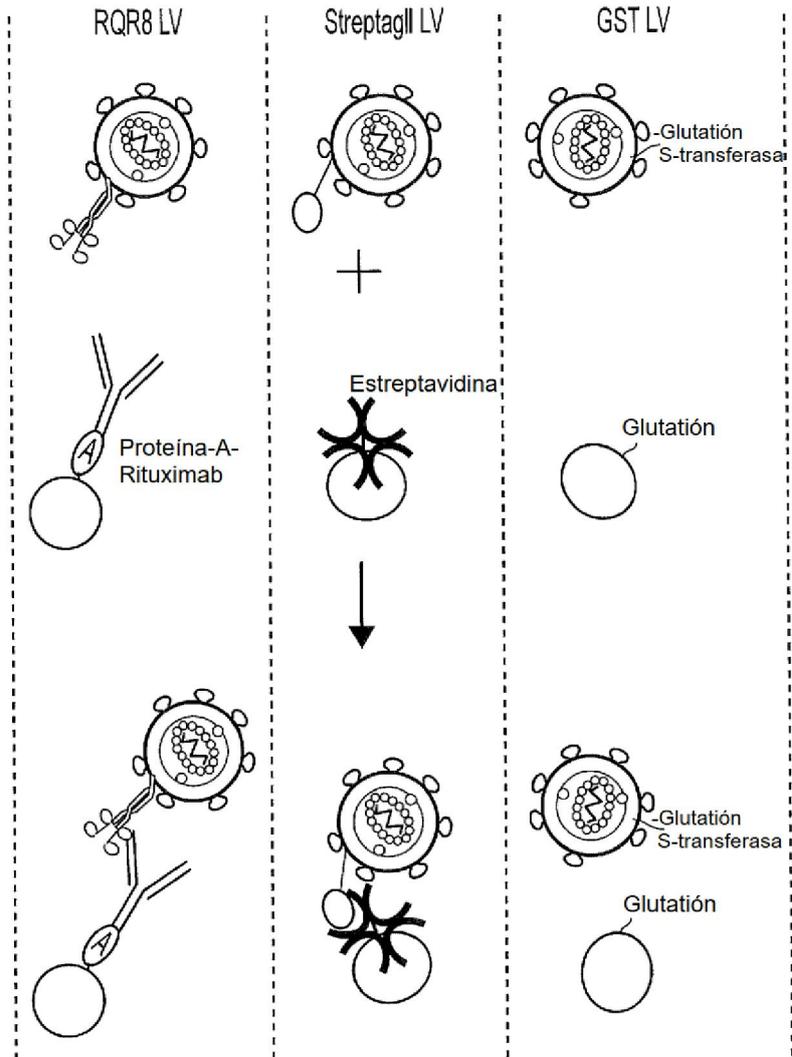
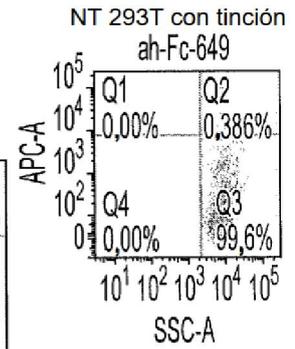
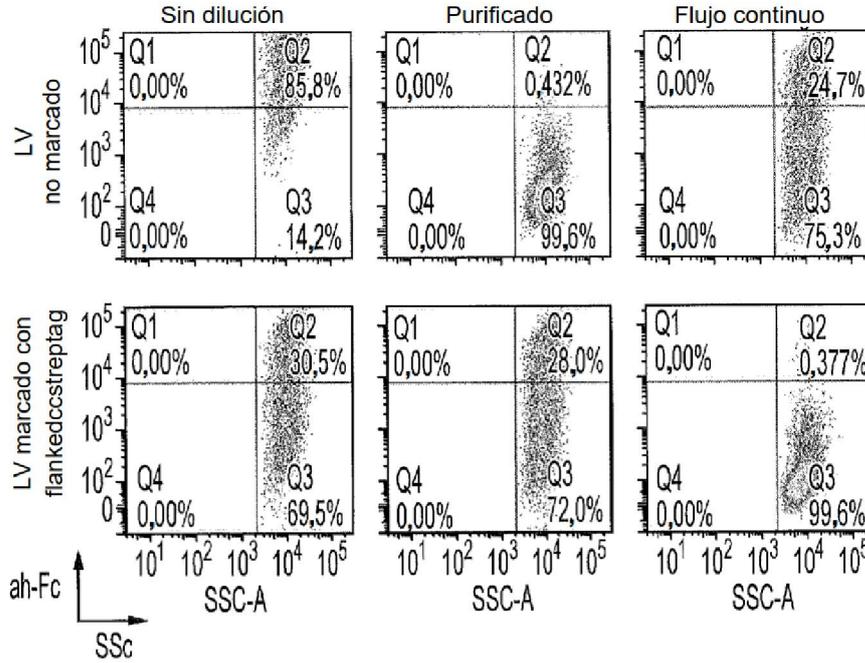


FIG. 11

(A) LV marcado con flankedccstreptag y perlas con estreptavidina a 50 ul de virus/pocillo



(B) LV marcado con flankedccstreptag y perlas con estreptavidina a 50 ul de virus/pocillo

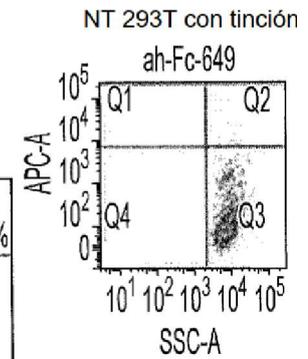
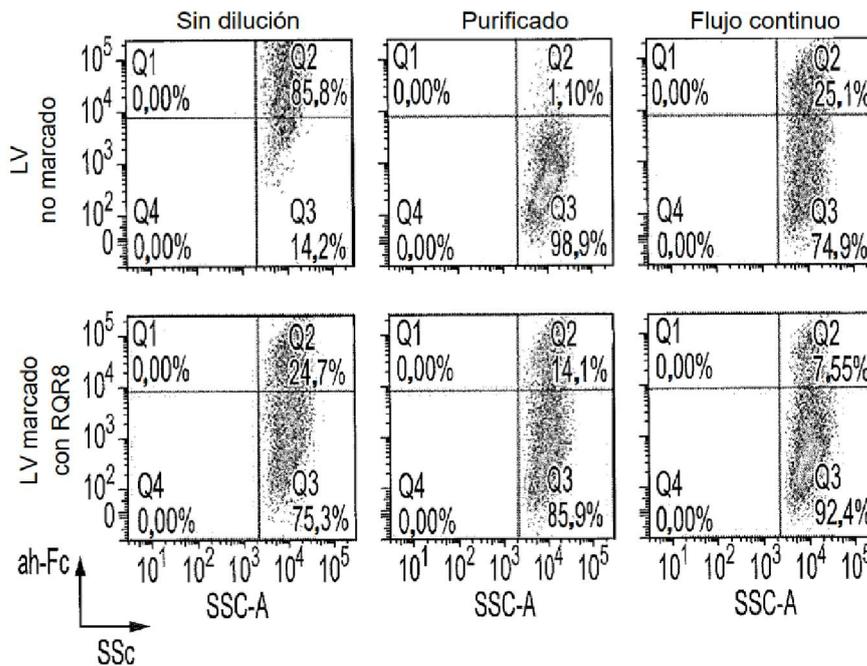
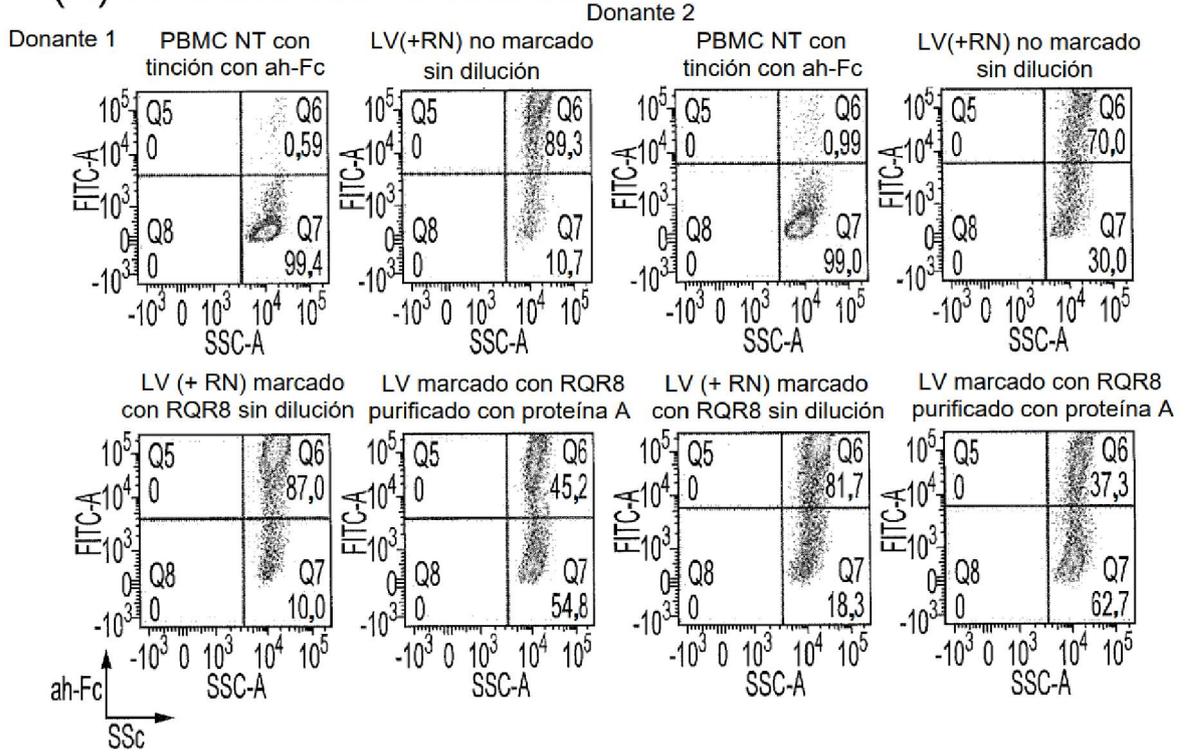


FIG. 12

(A) Transducción de LV marcado con RQR8 en PBMC



(B) Transducción de LV marcado con Flankedccstreptag en PBMC +/- efecto magnético

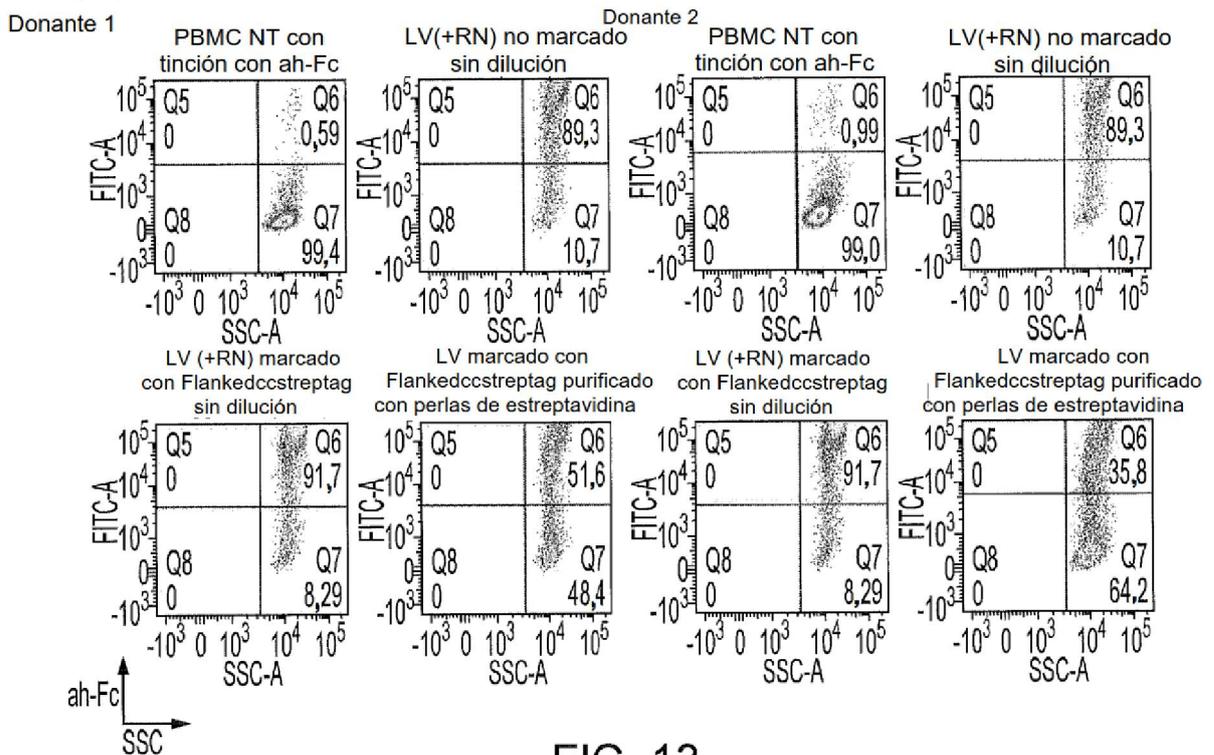


FIG. 13

(a) marcaje con RQR8 de RD114 SU (SEQ ID NO: 31)

MKLPTGMVILCSLIIVRAECPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGG
GGGSGFDDPRKAIALVQKQHGKPCCECSGGQVSEAPPNSIQQVTCPGKTAYLMTNQKWKCRVTPKNLTP
SGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRANNKTYTATLLKIRSGSLNEVQILQNPQLLQSPCRGS
INQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVTWVQKRLEQIHKAMHPELQYHPLALPKVRDDLSLDARTFDI
LNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQIIPLLVQPMQFSNSS
CLSSPFINDTEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQNWTGLCVQASLLPD
IDIIPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQV
LSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDGLLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIRTLQEELQKR
RESLASNPLWTGLQGFLP YLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFINDRLNVSQNYPIVQYQALK
AEEEEAQD

(b) marcaje con RQR de RD114 TM (SEQ ID NO: 32)

MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHGKPCCECSGGQVSEAPPNSIQQVTCPGKTAYLMTN
QKWKCRVTPKNLTPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRANNKTYTATLLKIRSGSLNEVQIL
QNPQLLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVTWVQKRLEQIHKAMHPELQYHPLALPK
VRDDLSLDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQIIP
PLLVQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQ
NWTGLCVQASLLPDIDIIPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRCPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNV
STNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGSAVQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQV
LSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDGLLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIRTLQ
EELQKRRESLASNPLWTGLQGFLP YLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFINDRLNVSQNYPIVQ
YQALKAEAAAAQD

(c) marcaje con Flankedccstreptag de RD114 SU (SEQ ID NO: 33)

MKLPTGMVILCSLIIVRAEECHPOGPPCIEGRKSGGGGGFDDPRKAIALVQKQHGKPCCECSGGQVSEA
PPNSIQQVTCPGKTAYLMTNQKWKCRVTPKNLTPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRANNK
YYTATLLKIRSGSLNEVQILQNPQLLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVTWVQKRL
EQIHKAMHPELQYHPLALPKVRDDLSLDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPPLAIP
TPSLTYSLADSLANASCQIIPLLVQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLC
ALNGSVFLCGNNMAYTYLPQNWTGLCVQASLLPDIDIIPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAG
LGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQVLSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDGLLLTAEQ
GICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIRTLQEELQKRRESLASNPLWTGLQGFLP YLLPLLGPLLTLILLI
TIGPCVFSRLMAFINDRLNVSQNYPIVQYQALKAEAAAAQD

(d) marcaje con Flankedccstreptag de RD114 TM (SEQ ID NO: 34)

MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHGKPCCECSGGQVSEAPPNSIQQVTCPGKTAYLMTN
QKWKCRVTPKNLTPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRANNKTYTATLLKIRSGSLNEVQIL
QNPQLLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVTWVQKRLEQIHKAMHPELQYHPLALPK
VRDDLSLDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQIIP
PLLVQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQ
NWTGLCVQASLLPDIDIIPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRECHPOGPPCIEGRKSGGGGSAVQFIPLLAG
LGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQVLSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDGLLLTAEQ
GICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIRTLQEELQKRRESLASNPLWTGLQGFLP YLLPLLGPLLTLILLI
TIGPCVFSRLMAFINDRLNVSQNYPIVQYQALKAEAAAAQD

FIG. 14

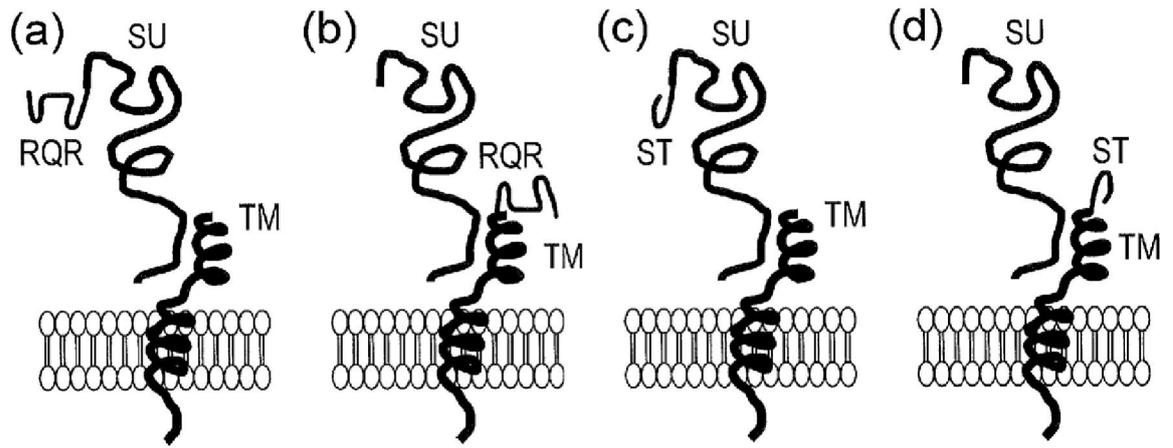


FIG. 15

secuencia de aminoácidos de prDpro (SEQ ID NO: 39)

MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHKGKPECCSGGQVSEAPPNSIQQVTCPG
KTAYLMTNQKWKCRVTPKNLTPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRANNKTYITA
TLLKIRSGSLNEVQILQNPNOQLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVWTV
QKRLEQIHKAMHPELQYHPLALPKVRDDLSDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLC
LKLGTPTPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQIIPPLLQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQID
LGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQNWTLGCVQASLLPDIDIIPG
DEPVPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDV
QVLSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRNKI
RTLQEELQKRRESLASNPLWTGLQGFLPYLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFIND
RLNVSONYPIVQQYQALKAEEEAQQD

secuencia de aminoácidos de RD114 (SEQ ID NO: 40)

MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHKGKPECCSGGQVSEAPPNSIQQVTCPG
KTAYLMTNQKWKCRVTPKISPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRRINKTYITAT
LLKIRSGSLNEVQILQNPNOQLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDGGGPLDTKRVWTVQ
KRLEQIHKAMTPELQYHPLALPKVRDDLSDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCL
KLGTPPTPLAIPTPSLTYSLADSLANASCQIIPPLLQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQIDL
GAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQNWTRLGCVQASLLPDIDINPGD
EPVPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQ
VLSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRNKIR
TLQEELQKRRESLATNPLWTGLQGFLPYLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFSRLMAFINDR
LNVVHAMVLAQQYQALKAEEEAQQD

FIG. 16

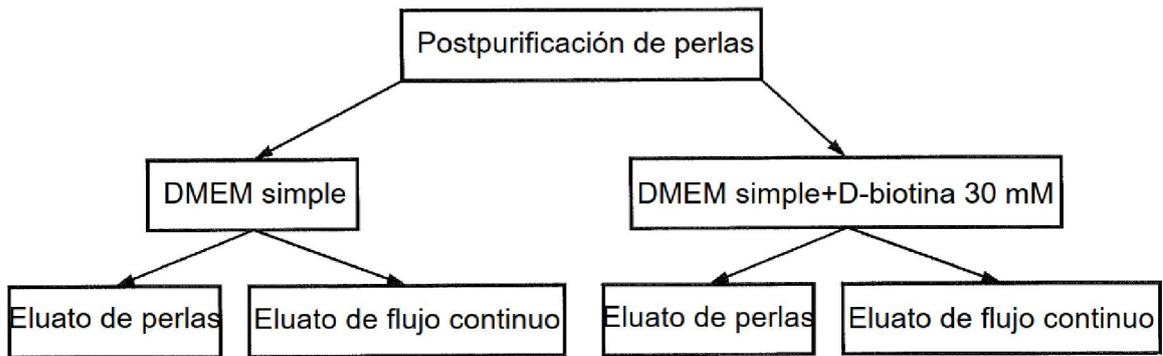
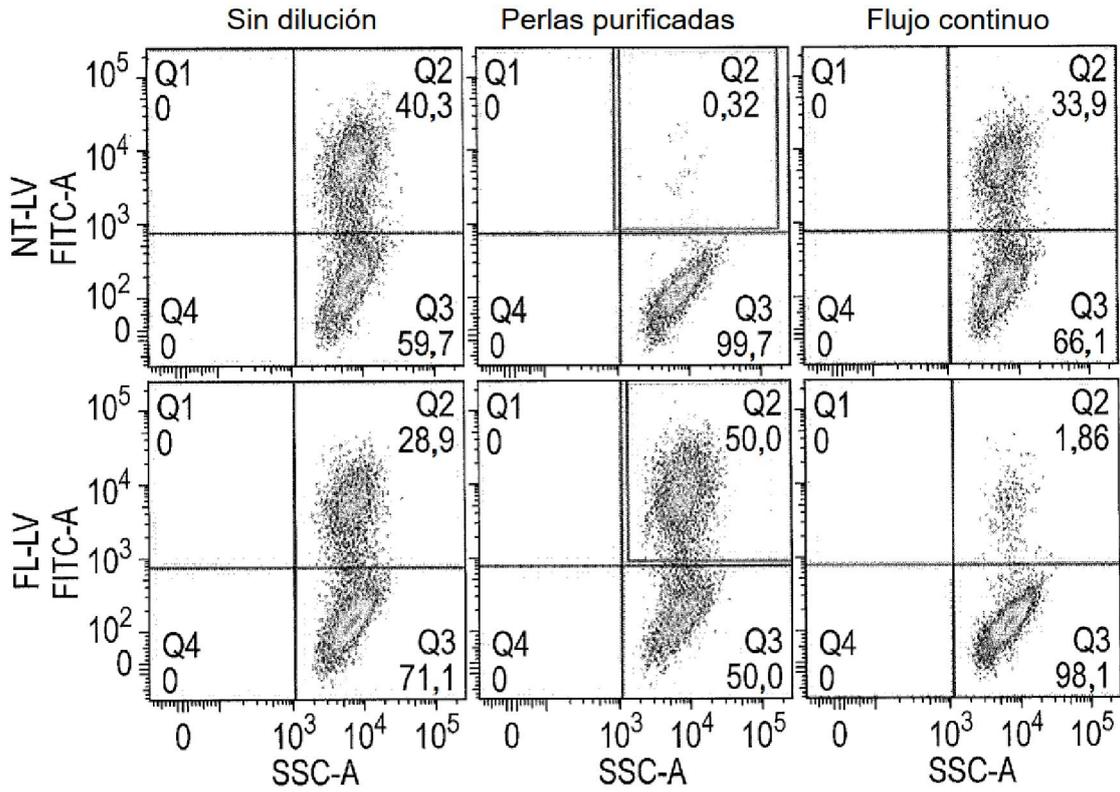
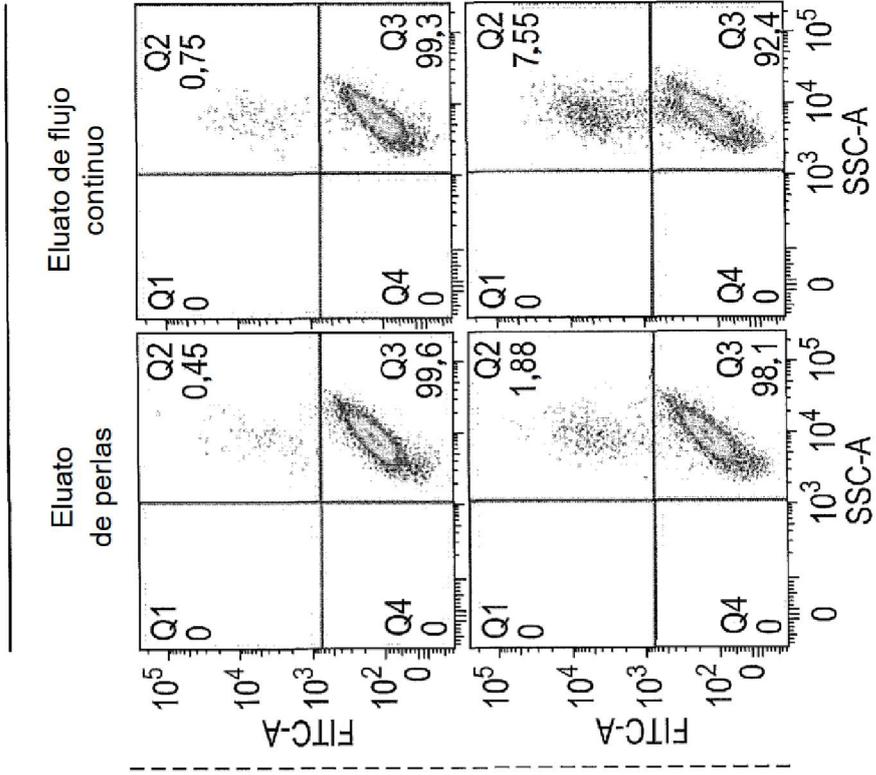


FIG. 17

Postpurificación de FL-LV unido a perlas
de estreptavidina + DMEM simple con D-biotina 30 mM
2 horas a 4 °C



Postpurificación de FL-LV unido a perlas
de estreptavidina + DMEM simple
2 horas a 4 °C

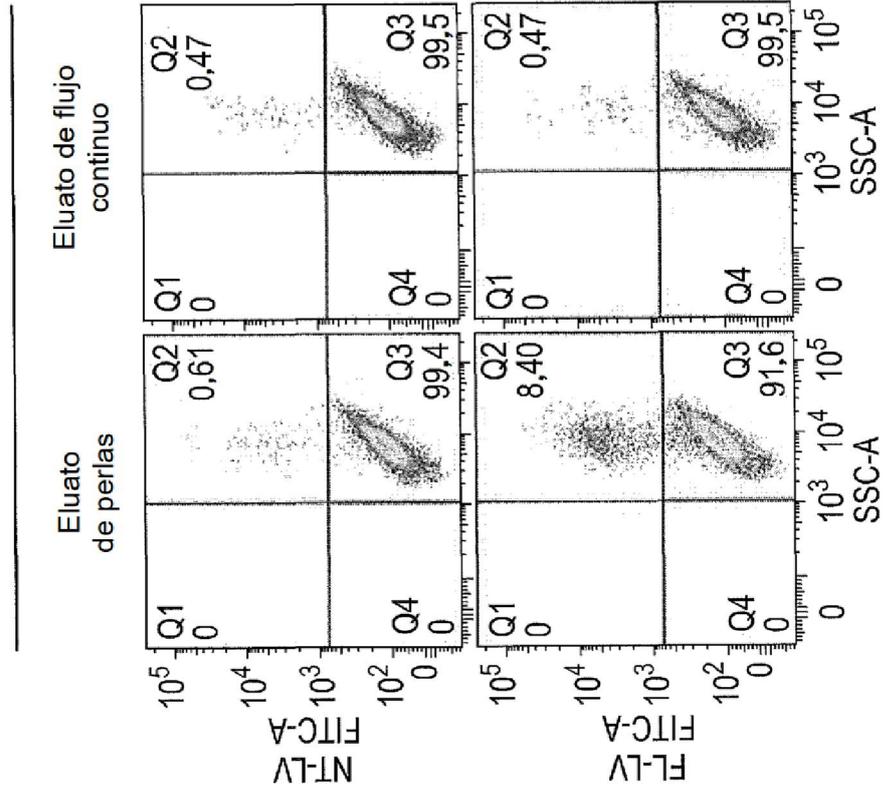


FIG. 18