

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 763**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/US2014/010553**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14703459 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2943567**

54 Título: **Uso de inhibidores de iNOS para aumentar el rendimiento viral en cultivo**

30 Prioridad:

08.01.2013 US 201361750175 P

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

29.01.2018

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
Genzyme Center 500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**PECHAN, PETER;
ARDINGER, JEFFERY;
SCARIA, ABRAHAM y
WADSWORTH, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 651 763 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

Uso de inhibidores de iNOS para aumentar el rendimiento viral en cultivo

CAMPO TÉCNICO

5 La presente divulgación se refiere generalmente a métodos de producción de virus y viriones recombinantes en cultivo. En particular, la divulgación se refiere al uso de los inhibidores de iNOS, tales como ácido aurintricarboxílico, dexametasona y ácido valproico, para aumentar el rendimiento de una variedad de virus en cultivo, que incluye virus recombinantes del herpes que pueden a su vez usarse como auxiliares para la producción de viriones de virus adeno-asociados recombinantes.

ANTECEDENTES

10 Los virus del herpes están altamente diseminados en la naturaleza y se encuentran en la mayoría de las especies de animales. Se han caracterizado al menos 100 virus del herpes, que incluyen varios de seres humanos, tales como virus del herpes simple-1 (VHS-1) y virus del herpes simple-2 (VHS-2), virus de la varicela zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y otros virus del herpes humanos tales como VHH6 y VHH7. Estos virus son responsables de una variedad de enfermedades humanas, tales como infecciones de la piel, herpes genital, 15 encefalitis viral y similares.

La infección por VHS-1 activa la defensa del hospedador y el sistema inmunitario innato induciendo vías de señalización intracelulares que conducen a la expresión de proteínas con actividades proinflamatorias y microbicidas, que incluyen citocinas e interferones (INF) (Sainz y Halford, J. Virol. (2002) 76:11541-11550; Haller et al., Virology (2006) 344:119-130; Paludan et al., Nat. Rev. Immunol. (2011) 11:143-154). La señalización de INF es uno de los mecanismos de defensa celulares más importantes para la eliminación viral (Brandner & Mueller, Hoppe-Seiler's Zeitschrift für physiologische Chemie (1973) 354:1176; De Vries et al., Gene Ther. (2008) 15:545-552). 20

Los investigadores han informado de actividad de óxido nítrico (NO) antiviral contra varios virus tales como virus de la variolovacuna, virus de la estomatitis vesicular y virus de la encefalitis japonesa, entre otros (Bi et al., J. Virol. (1995) 69:6466-6472; Harris et al., J. Virol. (1995) 69:910-915; Lin et al., J. Virol. (1997) 71:5227-5235; Pertile et al., Avian Dis. (1996) 40:342-348). NO es un molécula gaseosa libre de radicales y es un mediador de la defensa del hospedador (Croen K.D., J. Clin. Invest. (1993) 91 :2446-2452; Karupiah et al., Science (1993) 261:1445-1448; Rolph et al., Virol. (1996) 217:470-477; Amaro et al., J. Med. Virol. (1997) 51:326-331; Lane et al., J. Virol. (1997) 71:2202-2210). El VHS-1 es conocido por tanto inducir como evadir respuestas antivirales del hospedador (Mossman et al., J. Virol. (2001) 75:750-758). La infección por VHS es capaz de inducir la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), un gen que codifica una isoforma inducible de NOS que produce grandes cantidades de NO. 30

Se han usado virus del herpes y proteínas recombinantes de los mismos en la fabricación de varias vacunas. Además de los adenovirus, se ha mostrado que los virus del herpes proporcionan funciones de virus auxiliar completas para la producción de viriones de virus adeno-asociados recombinantes (Buller, R.M.L., J. Virol. (1981) 40:241-247; Mishra et al., Virology (1990) 179:632-639). El conjunto mínimo de genes de VHS-1 requeridos para la replicación y encapsidación de AAV se ha identificado como los genes tempranos UL5, UL8, UL52 y UL29 (Weindler et al., J. Virol. (1991) 65:2476-2483). Estos genes codifican componentes de la maquinaria de replicación del núcleo de VHS-1 – la helicasa, primasa y las proteínas accesorias de primasa (UL5, UL8 y UL52) y la proteína de unión a ADN monocatenario (UL29). 35

Se han usado satisfactoriamente vectores de AAV recombinante (AAVr) para lograr la transducción de alto nivel a largo plazo *in vivo*. A pesar de los avances anteriores, la producción de grandes cantidades de viriones de AAVr de alto título de calidad clínica para terapia génica continúa siendo exigente debido a las limitaciones en el cambio de escala del protocolo de cotransfección. El proceso requiere la eficiente administración celular de tres componentes: (1) un vector que incluye el gen de interés flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV; (2) un vector que incluye los genes *rep* y *cap* de AAV; y (3) genes proporcionados usando un virus auxiliar, tal como adenovirus o virus del herpes simple o usando plásmidos auxiliares libres de virus (véase, Muzyczka, N., Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1992) 158:97-129). Así, en los protocolos de fabricación de AAVr basados en VHSr, el rendimiento de AAVr está limitado por el título máximo de vectores de VHSr auxiliares. 40 45

Un vector de VHS-1 deficiente en la replicación, llamado d27.1-rc, expresa los genes *rep* y *cap* de AAV-2 (Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:986-993) y se ha manipulado a partir del virus d27-1 original (Rice et al., J. Virol. 1989 vol. 63 (8) pp. 3399-407), que no produce ICP27, una proteína requerida para la replicación de VHS-1. Aunque este vector es defectuoso en la replicación, expresa los genes tempranos del VHS-1 requeridos para la replicación y encapsidación de AAVr (Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:986-993). 50

Normalmente, un vector que lleva el molde de AAVr y el otro vector que expresa las regiones *rep* y *cap* de AAV se co-infectan en células 293 con el fin de producir viriones de AAVr. Ambos vectores de VHS-1 son deficientes en la replicación y, por tanto, solo pueden propagarse en una línea celular que complementa ICP27, V27 (Rice et al., J. Virol. 1989 vol. 63 (8) pp. 3399-407). En el protocolo de producción de AAV basado en VHS, células 293 necesitan 55

ser infectadas con VHS-1 a una multiplicidad de infección (MOI) más alta de 12. Esto representa una limitación, debido a que los rendimientos de vectores derivados de d27-1 en células V27 normalmente son aproximadamente 1×10^7 unidades formadoras de placa (UFP)/ml.

Se han investigado varios métodos y reactivos con el fin de aumentar adicionalmente los títulos de VHS-1 (véanse, por ejemplo, Wechuck et al., *Biotechnol. Prog.* (2000) 16:493-496; Ozuer et al., *Biotechnol. Prog.* (2002) 18:476-482; Erlandsson et al., *J. Endocrinol.*, (2002) 175:165-176; Otsuki et al., *Mol. Ther.* (2008) 16:1546-1555). Tanto la dexametasona como el ácido valproico inhibieron el mecanismo de defensa del hospedador representado por varios genes antivirales sensibles a interferón (IFN), aumentaron el nivel transcripcional de genes virales, y así mejoraron la propagación viral y el rendimiento de VHS-1 (Erlandsson et al., *J. Endocrinol.* (2002) 175:165-176; Otsuki et al., *Mol. Ther.* (2008) 16:1546-1555).

A pesar del conocimiento anterior, se necesitan más métodos de inhibición de la defensa del hospedador con el fin de mejorar la producción viral en cultivo. Como se ha explicado anteriormente, los investigadores han informado de la actividad de óxido nítrico (NO) antiviral contra varios virus tales como el virus de la variolovacuna, virus de la estomatitis vesicular y el virus de la encefalitis japonesa, entre otros (Bi et al., *J. Virol.* (1995) 69:6466-6472; Harris et al., *J. Virol.* (1995) 69:910-915; Lin et al., *J. Virol.* (1997) 71:5227-5235; Pertile et al., *Avian Dis.* (1996) 40:342-348. NO es un molécula gaseosa libre de radicales y es un mediador de la defensa del hospedador (Croen K.D., *J. Clin. Invest.* (1993) 91 :2446-2452; Karupiah et al., *Science* (1993) 261:1445-1448; Rolph et al., *J. Virol.* (1996) 217:470-477; Amaro et al., *J. Med. Virol.* (1997) 51:326-331; Lane et al., *J. Virol.* (1997) 71:2202-2210). Como se ha descrito anteriormente, la infección por VHS puede inducir la expresión de iNOS, un gen que codifica una isoforma inducible de NOS que produce grandes cantidades de NO.

La presencia del inhibidor de iNOS N-metil-L-arginina (L-NMA) invirtió la inhibición de la replicación viral para tres de estos virus (Karupiah et al., *Science* (1993) 261:1445-1448). Para una revisión de inhibidores de iNOS, véase, Southan et al., *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51:383-394. Se ha mostrado que otro compuesto, el ácido aurintricarboxílico (ATA), protege los macrófagos de la muerte celular inducida por el lipopolisacárido bacteriano por la regulación por disminución de la expresión de iNOS y disminuyendo así la producción de NO (Chen et al., *British Journal of Pharmacology* (2002) vol. 137 (7) pp. 1011-20). ATA es una mezcla heterogénea de polímeros acreditados con un número creciente de actividades biológicas, tales como interacción con varias enzimas que incluyen ADN polimerasas, ARN polimerasas, transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN), aminoacil-ARNt-sintetasa, ribonucleótido reductasa, ribonucleasas nucleasa, inhibición de la síntesis de proteínas, prevención de la apoptosis y bloqueo de la fragmentación de ADN en oligodendrocitos inducida por estrés oxidativo (Tscherne and Pestka, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1975) 8:479-487; Mikelens et al., *Biochemical Pharmacology* (1976) 25:821-827; Vollgraf et al., *J. Neurochem.* (1999) 73:2501-2509).

También se ha informado que el ácido aurintricarboxílico (ATA) previene la activación transcripcional mediada por IFN (Tsi et al., *Mol. Pharmacol.* (2002)101:90-101; Chen et al., *British J. Pharmacol.* (2002) 137:1011-1020). ATA se conoce como un activador de la vía de Raf/MEK/MAPK, receptor de IGF-1 y señalización de proteína cinasa C (Beery et al., *Endocrinology* (2001) 142:3098-3107; Chen et al., *J. Biol. Chem.* (2001) 276:46722-46728). Acciones antivirales, antimicrobianas y antiproliferativas de citocinas tales como interferones pueden ser debidas a su capacidad para inducir la expresión de iNOS, un gen que codifica una isoforma de óxido nítrico sintasa (NOS) que produce grandes cantidades del gas radical, NO, a partir de nitrógeno de guanidino de L-arginina (Nathan, C., *FASAB J.* (1992) 6:3051; Werner-Felmayer et al., *J. Exp. Med.* (1990) 172:1599). Se ha mostrado que el tratamiento de macrófagos con IFN- γ restringe gravemente la replicación del virus de la ectromelia (VE), virus de la variolovacuna (VV) y VHS-1.

Por una parte, el ATA también es conocido como un agente antiviral contra varios virus que incluyen VIH, virus del herpes VHH-7, SARS-CoV y otros (Cushman et al., *J. Med. Chem.* (1991) 34:329-337; Zhang et al., *Antiviral Res.* (1999) 43:23-35; Yap et al., *Computational Biol. and Chem.* (2005) 29:212-219; De Clercq, *Advents, Advances, and Adventures Med. Res. Rev.* (2011) 31:118-160). ATA, sin embargo, no bloqueó la replicación de adenovirus tipo 5 (Ad5) en células HEK-293 (He, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2004) 320:1199-1203). Además, se ha informado que ATA aumenta inesperadamente el título de un vector de adenovirus de control en células 293 mientras que al mismo tiempo tiene efectos antivirales sobre el virus de la variolovacuna (Myskiw et al., *J. Virol.* (2007) 81:3027-3032).

Sumario de la divulgación / invención

Así, la presente divulgación vence las deficiencias en el estado de la técnica tratando problemas que limitan la producción viral, tal como la baja producción de VHSr, que obstaculiza los esfuerzos por producir cantidades suficientes de VHSr para una variedad de fines, que incluyen para la producción de vacunas, además de para la producción de viriones de AAVr en cantidades necesarias para los eficientes procedimientos de terapia génica. Usando los métodos descritos en el presente documento, pueden obtenerse títulos más altos de una variedad de virus, tales como al menos un orden de magnitud más que los métodos tradicionales.

En particular, los inventores en el presente documento han descubierto que el ácido aurintricarboxílico (ATA) inhibe iNOS y aumenta la producción de VHS. Como se muestra en los ejemplos en el presente documento,

concentraciones micromolares de ATA en presencia de suero bovino fetal (FBS) aumentaron tanto el rendimiento del vector VHS-1/d27-1 en células V27 como el virus VHS-1 no mutado (wt) en células Vero, V27 y 293. Otros inhibidores de iNOS, que incluyen dexametasona y ácido valproico, también aumentaron los títulos de VHS-1 en cultivo en ciertos casos.

5 Se mostró que se reducía la expresión de iNOS inducida por VHS en muestras de VHS+ATA como se analizó por SABiosciences Microarray. Similarmente, el análisis de Affymetrix Human Genome Array confirmó que la expresión de VHS regulada por incremento en los tres genes de óxido nítrico sintasa (nNOS, iNOS y eNOS) se reguló por disminución en muestras de VHS+ATA. Affymetrix Gene Array también detectó que genes implicados en la señalización inflamatoria de IgE e IFN, y respuestas inmunitarias generales, se regularon por incremento por VHS-1 y se suprimieron después de la adición de ATA. Por otra parte, genes principalmente implicados en el ciclo celular G1/S, transducción de señales en el desarrollo de WNT estuvieron significativamente regulados por disminución por VHS y regulados por incremento después de la adición de ATA.

Estos resultados son significativos debido a la demanda de títulos de VHS-1 más altos para la producción de viriones de AAVr, además de para fines profilácticos, terapéuticos y diagnósticos. La invención a la que se refiere la presente memoria descriptiva se explica en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación de una transferencia Western que muestra que el ácido aurintricarboxílico (ATA) inhibe la expresión de iNOS en lisados de V27 infectados por d27-1.

20 Las Figuras 2A-2C muestran la lógica del protocolo de ATA-VHS (Figura 2A) y la optimización de títulos de d27-1 de VHS-1 en sobrenadantes de V27 con el fin de determinar qué concentraciones y condiciones para la adición de ATA tienen un impacto sobre los rendimientos de VHS. La Figura 2B muestra títulos virales expresados como partículas resistentes a DNasa (PRD/ml) a diversas concentraciones de ATA en placas de seis pocillos (Figura 2B) y matraces T150 (Figura 2C).

25 La Figura 3 muestra la importancia de la presencia de suero en el protocolo de ATA-VHS. La optimización adicional y la importancia de la presencia de FBS en el protocolo de ATA-VHS se mostraron en títulos de d27-1 de VHS-1 expresados como prd/ml y ufp/ml.

30 Las Figuras 4A-4B muestran el efecto de ATA sobre las cepas KOS y McIntyre de VHS no mutado en cultivo. El ATA aumentó el rendimiento de ambos tipos de virus en células Vero, sin embargo, pareció que ATA inhibía el crecimiento de KOS de VHS-1 en células 293. Por otra parte, la cepa McIntyre de VHS-1 wt alcanzó los títulos más altos después de la inducción de ATA en células 293. Además, pareció que ATA inhibía AMBOS tipos de virus VHS-1 en células HeLa.

35 Las Figuras 5A-5B muestran el efecto de ATA en reservas de VHS sobre la producción de viriones de AAVr. Los títulos de AAVr fueron ligeramente elevados si se usa la reserva de VHS preparada con ATA 20 μ M añadido durante la infección. También se mostró que ATA aumentaba el título de AAVr cuando ATA 10 μ M se añadió en cantidades conocidas directamente en medio de células 293 durante 2 h de la etapa de co-infección de VHS.

40 La Figura 6 muestra el efecto de dexametasona (Dex) sobre el título viral de VHS-1 de d27-1/GFP. Los títulos finales de VHS-1 de d27-1/GFP fueron, en general, ligeramente elevados después de los pretratamientos con dex o tratamientos en comparación con control no tratado.

La Figura 7 muestra el efecto del pretratamiento por ácido valproico (VA) sobre el título viral de VHS-1 de d27-1/GFP. VA a una concentración 5 mM elevó ligeramente el título de VHS-1 de d27-1/GFP, sin embargo las concentraciones por debajo y por encima de 5 mM parecieron tener un efecto inhibitor sobre el título de VHS-1 de d27-1/GFP, en comparación con el control no tratado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Fundamental Virology, 2ª Edición, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

1. DEFINICIONES

En la descripción de la presente divulgación / invención, se emplearán los siguiente términos, y pretenden definirse como se indica a continuación.

5 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un virus del herpes" incluye una mezcla de dos o más de tales virus, y similares.

10 Los términos "VHS recombinante", "VHSr" y "vector de VHSr" se refieren a formas aisladas, genéticamente modificadas, del virus del herpes simple (VHS) que contiene genes heterólogos incorporados en el genoma viral. Por el término "VHSr/rc" o "virus VHSr/rc" o "vector de función auxiliar de VHSr" indica un VHSr en el que los genes *rep* y/o *cap* de AAV han sido incorporados en el genoma de VHSr. Los términos "virus de expresión de VHSr" y "VHSr/AAV" indican un VHSr en el que las secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV han sido incorporadas en el genoma de VHSr.

15 Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Así, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, están incluidos dentro de la definición. Tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), a la secuencia nativa, mientras que la proteína mantiene la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR. Dependiendo del sistema de expresión usado, un polipéptido puede incluir o carecer de una metionina del extremo N. Adicionalmente, un polipéptido puede o puede no incluir la secuencia señal nativa, si una está naturalmente presente. Si una secuencia señal no está normalmente presente, la proteína puede producirse con una secuencia heteróloga.

20 Un polipéptido "nativo" se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula correspondiente derivada de la naturaleza. Tales secuencias nativas pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término secuencia "nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que existen de forma natural de la molécula específica (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variante que existen de forma natural (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que existen de forma natural del polipéptido.

30 Por "variante" se indica un polipéptido activo como se define en el presente documento que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia nativa de longitud completa correspondiente, un polipéptido que carece del péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin un péptido señal, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos de longitud completa como se desvela en el presente documento. Tales variantes de polipéptido incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y alternativamente al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia nativa de longitud completa correspondiente. Generalmente, los polipéptidos de variante tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, tal como al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente

al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

- 5 Variantes particularmente preferidas incluyen sustituciones que son conservativas en la naturaleza, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos -- aspartato y glutamato; (2) básicos -- lisina, arginina, histidina; (3) no polares -- alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga -- glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina
10 treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican algunas veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución conservativa similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no
15 conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 o 50 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entre 5-50, mientras que la función deseada de la molécula siga intacta.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótidos o dos de polipéptidos. Dos ADN, o dos secuencias de polipéptidos, son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias presentan al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %-85 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %-98 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud definida de las moléculas. Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o de polipéptidos especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido con nucleótido o aminoácido con aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. El porcentaje de identidad puede determinarse por una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de correspondencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Appl. Math, 2:482-489, 1981, para el análisis de péptidos. Programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas son fácilmente utilizados con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package citado anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular para una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuaciones por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método de establecimiento del porcentaje de identidad en el contexto de la presente divulgación es usar el paquete MPSRCH de programas con derecho de autor por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este paquete de aplicaciones, puede usarse el algoritmo de Smith-Waterman, donde se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuaciones (por ejemplo, penalización por abertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor "Correspondencia" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificado por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + proteínas Swiss + Spupdate + PIR. Detalles de estos programas son muy conocidos en la técnica.

Alternativamente, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación de Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para ese sistema particular. El definir condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., arriba; *DNA Cloning*, arriba; *Nucleic Acid Hybridization*, arriba.

Por el término "variante degenerada" está previsto un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácidos nucleicos de la misma, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido del que deriva la variante degenerada.

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción puede localizarse 3' con respecto a la secuencia codificante.

Por "vector" se indica cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia a los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes a células. Así, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, además de vectores virales.

Por "vector recombinante" se indica un vector que incluye una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que es capaz de expresión *in vivo*.

Por "virus recombinante" se indica un virus que ha sido genéticamente alterado, por ejemplo, mediante la adición o inserción de una construcción de ácidos nucleicos heteróloga en la partícula.

El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de ser transcrito en ARN y opcionalmente traducido y/o expresado bajo condiciones apropiadas. En un aspecto, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o de otro modo conduce a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado.

Los términos "partículas de genoma (pg)" y "equivalentes de genoma", como se usa en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas de genoma en una preparación de vector particular puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como se describen en, por ejemplo, en Clark et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1031-1039; y Veldwijk et al., Mol. Ther. (2002) 6:272-278.

Los términos "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas infecciosas de vector de AAV recombinante como se mide por el ensayo del centro infeccioso, también conocido como el ensayo del centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al., J. Virol. (1988) 62:1963-1973.

El término "unidad de transducción (ut)", como se usa en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas infecciosas de vector de AAV recombinante que resultan en la producción de un producto transgénico funcional como se mide en ensayos funcionales tal como se describen en, por ejemplo, en Xiao et al., Exp. Neurobiol. (1997) 144:1 13-124; o en Fisher et al., J. Virol. (1996) 70:520-532 (ensayo LFU).

El término "transfección" se usa para referirse a la captación de ADN foráneo por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Varias técnicas de transfección son generalmente conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Graham et al. (1973) Virology, 52 :456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu et al. (1981) Gene13:197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

El término "heterólogo", como se refiere a secuencias de ácidos nucleicos tales como secuencias codificantes y secuencias de control, indica secuencias que normalmente no se unen juntas, y/o normalmente no se asocian a una célula particular. Así, una región "heteróloga" de una construcción de ácidos nucleicos o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácidos nucleicos podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción donde la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Similarmente, una célula transformada con una construcción que normalmente no está presente en la célula se consideraría heteróloga para los fines de la presente invención. Variación alélica o eventos mutacionales que existen de forma natural no dan lugar a ADN heterólogo, como se usa en el presente documento.

Una secuencia de "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o ARN. El término captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN tales como, pero no se limitan a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo,

éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término "secuencias de control" de ADN se refiere conjuntamente a promover secuencias, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en la dirección 5', orígenes de replicación, sitio interno de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores, y similares, que proporcionan conjuntamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula de receptor. No todas estas secuencias de control necesitan siempre estar presentes, mientras que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula hospedadora apropiada.

El término "promotor" se usa en el presente documento en su sentido habitual para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en el que la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Los promotores de la transcripción puede incluir "promotores inducibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos operativamente unida al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores represibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos operativamente unida al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y "promotores constitutivos".

"Operativamente unido" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos se configuran para realizar su función usual. Así, secuencias de control operativamente unidas a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control no necesitan estar contiguas a la secuencia codificante, mientras que funcionen para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias no traducidas intermedias, pero transcritas, entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede todavía considerarse "operativamente unida" a la secuencia codificante.

Por "aislado", cuando se refiere a una secuencia de proteínas o de nucleótidos, se indica que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Así, por ejemplo, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácidos nucleicos que no codifican el polipéptido objeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

Con el fin de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular en toda la presente solicitud, tal como cuando una secuencia de nucleótidos particular se describe como que está situada "en la dirección 5'", "en la dirección 3'", "3-primaria (3')" o "5-primaria (5)" con respecto a otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la hembra "sentido" o "codificante" de una molécula de ADN que están siendo denominada en lo sucesivo como convencional en la materia.

El término "aproximadamente", particularmente en referencia a una cantidad dada, pretende englobar desviaciones de más o menos el cinco por ciento.

2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a formulaciones particulares o parámetros de proceso ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares de la invención solo, y no pretende ser limitante.

Aunque varios métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

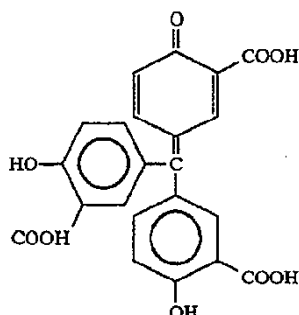
Es fundamental para la presente invención el descubrimiento de que el ácido aurintricarboxílico (ATA) en concentraciones micromolares aumenta los rendimientos de vectores de VHS-1. Este hallazgo es importante para ya sea la producción de VHS a gran escala, además de la producción de vectores de VHSr y AAVr. Además y sorprendentemente, como se muestra en los ejemplos, la presencia de ATA en reservas de VHSr-1 no influyó negativamente en el rendimiento de AAVr. Este resultado es sorprendente, ya que se muestra que ATA en cantidades milimolares y concentraciones más altas es un agente antiviral (Cushman et al., J. Med. Chem. (1991) 34:329-337; Zhang et al., Antiviral Res. (1999) 43:23-35; Yap et al., Computational Biol. and Chem. (2005) 29:212-219; De Clercq, Advents, Advances, and Adventures Med. Res. Rev. (2011) 31:118-160).

Como se ha explicado anteriormente, los investigadores han informado de actividad de óxido nítrico (NO) antiviral contra varios virus tales como virus de la variolovacuna, virus de la estomatitis vesicular y virus de la encefalitis japonesa, entre otros (Bi et al., J. Virol. (1995) 69:6466-6472; Harris et al., J. Virol. (1995) 69:910-915; Lin et al., 1997; Pertile et al., Avian Dis. (1996) 40:342-348). El NO es una molécula gaseosa libre de radicales que es un mediador de la defensa del hospedador (Croen K.D., J. Clin. Invest. (1993) 91 :2446-2452; Karupiah et al., Science (1993) 261:1445-1448; Rolph et al., Virol. (1996) 217:470-477; Amaro et al., J. Med. Virol. (1997) 51:326-331; Lane

et al., *J. Virol.* (1997) 71:2202-2210). La infección por el VHS es capaz de inducir la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), un gen que codifica una isoforma inducible de NOS que produce grandes cantidades de NO.

5 Como se muestra en el presente documento, ATA suprime la iNOS regulada por incremento por VHS y así aumenta los títulos de VHS en cultivo. Inhibidores de iNOS adicionales, que incluyen dexametasona y ácido valproico, también tienen el mismo efecto. En una realización, entonces, el uso de tales inhibidores de iNOS aumenta los títulos de virus del herpes recombinante en cultivo, permitiendo la producción de significativamente más virus que los producidos en ausencia del inhibidor particular. Los virus producidos por el método pueden usarse en una variedad de contextos, que incluyen para fines profilácticos, terapéuticos y diagnósticos, además de para producir construcciones recombinantes en cantidad suficiente para usar en la preparación de viriones recombinantes para administración génica y terapia génica.

15 El ácido aurintricarboxílico (ATA), ácido 5-((3-carboxi-4-hidroxifenil)(3-carboxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno)metil)-2-hidroxibenzoico, es una mezcla heterogénea de polímeros aromáticos negativamente cargados no sulfatada que se forma cuando se trata ácido salicílico con formaldehído, ácido sulfúrico y nitrito de sodio (véanse Cushman, et al., (1991) *J. Med. Chem.*,34:329-337; Cushman, et al., *J. Med. Chem.* 34:337-342). El ácido aurintricarboxílico tiene la fórmula:



20 Se describió que la mezcla heterogénea de ATA inhibía las interacciones proteína-ácido nucleico (Gonzalez et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1979) 562:534-545); interaccionaba con receptores esteroides en la captación nuclear y los niveles de unión nuclear (Mellon, W. S., *Biochem. Pharmacol.* (1984) 33:1047-1057; Moudgilet al., *J. Steroid Biochem.* (1985) 23:125-132); inhibía la ADN polimerasa (Nakaneet al., *Eur. J. Biochem.* (1988) 177:91-96); y actuaba de un inhibidor de RNasa (Skidmore et al., *Biochem. J.* (1989) 263:73-80).

Puede usarse ATA para adición a virus en cultivo en la forma de ácido o puede proporcionarse como una sal, tal como sal de trisodio de ácido aurintricarboxílico; sal de calcio; sal de amonio, etc.

25 Sustancias adicionales que encontrarán uso con los presentes métodos incluyen dexametasona (Dex) y ácido valproico (VA). Se ha mostrado que Dex inhibe la expresión de iNOS en células mesangiales de rata a niveles transcripcionales y post-transcripcionales (Kunz et al., *Biochem. J.* (1994) 304:337-340; Kunz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93:255-259). También se ha mostrado que Dex potencia la replicación de ADN de oriL de VHS-1 en células PC12. Se ha mostrado que el valproato de sodio, la sal de sodio de VA, estimula la replicación de VHS-1, citomegalovirus humano, HIF-1, virus del herpes-8 humano, virus del sarampión y virus de la poliomielitis de tipo 1 (Motamedifar et al., *Iran. J. Med. Sci.* (2006) 31:28-32; Kuntz-Simon et al., *J. Gen. Virol* (1995) 76:1409-1415; Moog et al., *J. Gen. Virol* (1996) 77:1993-1999; Ylisastigui et al., *AIDS* (2004) 18:1101-1108; Shaw et al., *AIDS* (2000) 14:899-902; Kabiri et al. *Iran J. Med. Sci.* (2001) 26:55-61). Además, se ha mostrado que el ácido valproico inhibe iNOS (Guo et al., *Surgery* (2007) 142:156-162). Al igual que con ATA, pueden usarse VA, o sus sales, tales como sales de sodio, calcio, amonio, etc., en los presentes métodos.

40 Aunque el uso de ATA, Dex y VA para producir vectores de VHSr-1 a títulos más altos se ejemplifica en el presente documento, estos inhibidores de iNOS pueden usarse para aumentar el título de una variedad de virus en cultivo, tales como, pero no se limitan a, virus de las familias Adenoviridae, Picornaviridae (por ejemplo, virus de la poliomielitis, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubeola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Poxviridae; Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; los diversos virus de la hepatitis, tales como VHA, VHB y VHC; virus del papiloma y rotavirus; retrovirus; etc. Véanse, por ejemplo *Virology*, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2ª Edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus. Estos virus, o inmunógenos derivados de los mismos, pueden usarse en la producción de vacunas y diagnósticos. Además, algunos de estos virus, y en particular, el virus del herpes, puede usarse para producir vectores recombinantes para la producción de viriones recombinantes para su uso en las técnicas de administración génica descritas a continuación.

Así, pueden usarse ATA, Dex y VA para aumentar el rendimiento de cualquiera de los virus del herpes que son miembros de la familia herpesviridae. Estos incluye virus del herpes equino, virus del herpes bovino (VHB) y virus del herpes simple (VHS) humano tipos 1 y 2, tales como VHB-1, VHB-2, VHS-1 y VHS-2, virus de la varicela zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), VHH6 y VHH7, entre otros. Los virus del herpes pueden derivar de cualquiera de muchas cepas. Por ejemplo, cuando el virus producido usando la invención es VHS, el virus puede derivar de, por ejemplo, VHS-1 o VHS-2, y puede ser de cualquier de las diversas cepas de VHS, tales como cepa de VHS-1 KOS, cepa de VHS-1 McIntyre, cepa de VHS-1 Patton, cepa de VHS-2 333, cepa de VHS-2 G, y similares. Además, los virus producidos puede ser cualquiera de los virus no mutados, o derivados de los mismos, que incluyen virus recombinantes y recombinantes entre tipos que contienen ADN de VHS-1 y VHS-2. Los derivados preferentemente tienen al menos el 70 % de homología de secuencias con cualquiera de los genomas de VHS-1 o VHS-2 o porciones de los mismos, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 o el 95 %. Un derivado puede tener la secuencia de un genoma de VHS-1 o VHS-2 modificado por sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El genoma de VHS-1 o VHS-2 puede alternativamente o adicionalmente ser modificado por una o más inserciones y/o deleciones y/o por una extensión en cualquiera o ambos extremos.

Otros derivados incluyen cepas que ya tienen mutaciones en genes, particularmente mutaciones en genes que producen la atenuación del virus. Ejemplos de tales virus incluyen la cepa 1716 (MacLean et al., J. Gen. Virol. (1991) 72:632-639), cepas R3616 y R4009 (Chou y Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci USA (1992) 89: 3266-3270) y R930 (Chou et al., J. Virol. (1994) 68:8304-8311), todas las cuales tienen mutaciones en ICP34.5, cepa d120 que tiene una deleción en ICP4 (DeLuca et al., J. Virol. (1985) 56:558-570), cepa d27-1 (Rice y Knipe, J. Virol. (1990) 64:1704-1715) que tiene una deleción en ICP27, o cepa d92 que tiene deleciones en tanto ICP27 como ICP4 (Samaniego et al., J. Virol. (1995) 69:5705-5715). La terminología usada en describir los diversos genes del VHS es como se encuentra en, por ejemplo, Coffin y Latchman (1996), en: Genetic Manipulation of the Nervous System (DS Latchman Ed.) pp 99-114: Academic Press, London.

Como es fácilmente evidente, cualquier VHSr adecuado para el fin previsto puede usarse en la invención. En ciertas realizaciones, el VHSr usado en la invención es defectuoso en la replicación. Para la producción de viriones de AAVr, se prefiere la infección de células productoras con VHSr que es incapaz de replicación debido a que, a diferencia de los métodos que implican el uso de adenovirus, el VHSr no llega a ser un contaminante significativo del producto de AAVr. Esto puede servir para aumentar el rendimiento final de viriones de AAVr eliminando etapas de purificación asociadas a la eliminación del adenovirus. En una realización particular de la invención, el VHSr se construye a partir de un mutante de VHS-1 en el que la incapacidad para replicarse es debida a una deleción en el gen ICP27. También puede usarse cualquier otro mutante adecuado del VHS que presente un fenotipo defectuoso en la replicación para construir el VHSr.

Una cepa de VHS-1 mutante recombinante particularmente preferida para la producción de AAVr usando los métodos objeto es la cepa d27-1 de VHS-1. Esta cepa puede prepararse como se describe en, por ejemplo, Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:973 985 y la patente de EE.UU. N.º 7.091.029, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Como se ha explicado anteriormente, este vector mutante no produce ICP27 y se usa ventajosamente para producir viriones de AAVr, ya que se sabe que la célula hospedadora que corta y empalma el ARN mensajero es inhibida por ICP27. ICP27 también puede efectuar corte y empalme apropiado de los mensajeros *rep* y *cap* de AAV-2. Este vector es defectuoso en la replicación y muestra citotoxicidad reducida en comparación con el VHS-1 no mutado (wt). El virus d27-1 muestra varias otras características que son ventajosas para su uso como un virus auxiliar para la producción de viriones de AAVr. Primero, expresa los genes tempranos que se sabe que se requieren para la producción de AAVr (Weindler et al., J. Virol. (1991) 65:2476-2483). Además, d27.1 expresa en exceso ICP8, la proteína de unión a ADN monocatenario que es el producto de UL29, uno de los genes de VHS-1 esenciales para la replicación y encapsidación de AAV (Weindler et al., J. Virol. (1991) 65:2476-2483).

El genoma de AAV es una molécula de ADN monocatenaria lineal que contiene aproximadamente 4681 nucleótidos. El genoma de AAV generalmente comprende un genoma interno no de repetición flanqueado en cada extremo por repeticiones terminales invertidas (ITR). Las ITR tienen aproximadamente 145 pares de bases (pb) de longitud. Las ITR tienen múltiples funciones, que incluyen proporcionar orígenes de replicación de ADN, y señales de encapsidación para el genoma viral. La porción no repetida interna del genoma incluye dos marcos de lectura abiertos grandes, conocidos como los genes de replicación (*rep*) y de cápside (*cap*) de AAV. Los genes *rep* y *cap* codifican proteínas virales que permiten que el virus se replique y se encapside en un virión. En particular, una familia de al menos cuatro proteínas virales se expresa a partir de la región de *rep* de AAV, Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40, llamados según su peso molecular aparente. La región *cap* de AAV codifica al menos tres proteínas, VP1, VP2 y VP3.

Por "región codificante de *rep* de AAV" se indica la región reconocida en la materia del genoma de AAV que codifica las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha mostrado que estos productos de expresión de Rep poseen muchas funciones, que incluyen el reconocimiento, unión y corte del origen de replicación de ADN de AAV, actividad de ADN helicasa y modulación de la transcripción a partir de promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Rep son conjuntamente requeridos para la replicación del genoma de AAV. Para una descripción de la región codificante de *rep* de AAV, véanse, por ejemplo, Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol.158:97-129; y Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801.

Homólogos adecuados de la región codificante de *rep* de AAV incluyen el gen *rep* del virus del herpes 6 humano (VHH-6) que también se sabe que media en la replicación del ADN de AAV-2 (Thomson et al. (1994) Virology 204:304-311).

5 Por "región codificante de *cap* de AAV" se indica la región reconocida en la materia del genoma de AAV que codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, u homólogos funcionales de las mismas. Estos productos de expresión Cap suministran las funciones de encapsidación que son conjuntamente requeridas para encapsidar el genoma viral. Para una descripción de la región codificante de *cap* de AAV, véase, por ejemplo, Muzyczka, N. y Kotin, R.M. (arriba).

10 Normalmente, se usarán dos vectores de VHSr para producir viriones de AAVr. Uno es un vector de función auxiliar de VHSr en el que los genes *rep* y/o *cap* de AAV han sido incorporados en el genoma de VHSr. El otro es un vector de expresión de VHSr en el que las secuencias de ITR de AAV han sido incorporadas en el genoma de VHSr y flanquean un gen de interés.

15 Así, en una realización, el inhibidor de iNOS puede usarse para aumentar el rendimiento de un primer vector de VHSr que contiene los genes *rep* y/o *cap* de AAV. Realizaciones del primer vector de VHSr del método incluyen, pero no se limitan a, construcciones de gen basadas en el gen *cap* encontrado en diversos serotipos de AAV que incluye AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 y AAV-6, AAV-7 y AAV-8, AAV caprino y bovino (véase, por ejemplo, publicación de EE.UU. N.º 20080292595, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), y variantes de los mismos. También están dentro del alcance de la invención los genes *rep* y *cap* de serotipos de AAV novedosos, y aquellos modificados por recombinación o mutación de serotipos existentes. Los genes *rep* y *cap* del vector de función auxiliar de AAV pueden derivar de cualquiera de los serotipos de AAV conocidos, como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, el vector de función auxiliar de VHSr puede tener un gen *rep* derivado de AAV-2 y un gen *cap* derivado de AAV-6; un experto en la materia reconocerá que son posibles otras combinaciones de genes *rep* y *cap*, siendo la característica definitoria la capacidad de soportar la producción de viriones de AAVr.

25 En ciertas realizaciones, los genes *rep* y *cap* de AAV en el vector de función auxiliar de VHSr pueden ser accionados por sus promotores nativos. Los promotores p5 y p19 de AAV-2 controlan la expresión de Rep 78 y 68 y Rep 52 y 40, respectivamente. El promotor p40 controla la expresión de VP1, VP2 y VP3. Además, pueden usarse promotores heterólogos para conducir la expresión de los genes de AAV. Ejemplos de otros promotores que pueden usarse en los métodos desvelados incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano de SV40, promotor del CMV, promotor de timidina cinasa de VHS-1 (tk de VHS-1), promotor inducible de la metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario de ratón y promotor de β -actina de pollo.

30 La construcción de gen puede insertarse en cualquier sitio o sitios del genoma del VHS adecuados para la integración de los genes *rep* y *cap*. En ciertas realizaciones, el vector se construye por recombinación homóloga de los genes *rep* y *cap* de AAV en el locus de timidina cinasa (*tk*) del virus VHSr-1, como se describe en Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:986-993 y la patente de EE.UU. N.º 7.091.029, incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad.

35 Como se explicó en el presente documento, el vector de función auxiliar de VHSr codifica las secuencias de "función auxiliar de AAV" (es decir, *rep* y *cap*), que funcionan en *trans* para la replicación y encapsidación productivas de AAV. Preferentemente, el vector de función auxiliar de VHSr soporta la eficiente producción de viriones de AAVr sin generar ningún virión de AAV wt detectable (es decir, viriones de AAV que contienen genes *rep* y *cap* funcionales). Un ejemplo de un vector tal es d27.1rc de VHSr-1. El vector y métodos de producción de los mismos se describen en el presente documento en los ejemplos, además de en Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:986-993; y la patente de EE.UU. N.º 7.091.029, incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 El segundo vector de VHSr se llama un vector de expresión de VHSr y contiene ITR de AAV con uno o más genes de interés conducidos por uno o más promotores. En algunas realizaciones, el gen de interés se inserta entre un par de ITR. El gen heterólogo normalmente está funcionalmente unido a un promotor heterólogo (constitutivo, específico de células, o inducible) capaz de conducir la expresión génica en las células diana del paciente en condiciones apropiadas. También pueden incluirse señales de terminación, tales como sitios de poliadenilación.

45 Las secuencias de nucleótidos de regiones ITR de AAV son conocidas. Véanse, por ejemplo, Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Berns, K.I. "Parvoviridae and their Replication" en Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Las ITR de AAV usadas en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos no mutada, y pueden alterarse, por ejemplo, por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, las ITR de AAV pueden derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV, que incluyen, sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 y AAV-8, AAV caprino y bovino (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20080292595, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), y variantes de los mismos. Además, ITR de 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión no necesitan ser necesariamente idénticas o derivar del mismo serotipo de AAV o cepa aislada, mientras que funcionen como era previsto, es decir, para permitir la supresión y rescate de la secuencia de interés de un genoma de célula hospedadora o vector, y para permitir la

integración de la molécula de ADN en el genoma de célula de receptor cuando productos del gen *rep* de AAV están presentes en la célula.

Pueden escindirse ITR de AAV del genoma viral o de un vector de AAV que contiene las mismas y fusionarse 5' y 3' de una construcción de ácidos nucleicos seleccionada usando técnicas de ligación estándar, tales como aquellas descritas en Sambrook et al., arriba. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ligaciones en Tris-Cl 20 mM a pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, 33 µg/ml de BSA, NaCl 10 mM-50 mM, y o bien ATP 40 µM, 0,01-0,02 unidades (Weiss) de ADN ligasa T4 a 0 °C (para la ligación de "extremos cohesivos") o ATP 1 mM, 0,3-0,6 unidades (Weiss) de ADN ligasa T4 a 14 °C (para la ligación de "extremos romos"). Se realizan ligaciones de "extremos cohesivos" intermoleculares normalmente a concentraciones de 30-100 µg/ml de ADN total (concentración final total 5-100 nM). Vectores de AAV que contienen ITR se han descrito en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.139.941. En particular, se describen en ella varios vectores de AAV que están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") con los Números de acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

La secuencia de polinucleótidos seleccionada está operativamente unida a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma a las células de un sujeto. Tales elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas al gen seleccionado. Alternativamente, pueden emplearse secuencias de control heterólogas. Secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes de mamífero o virales. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotor de enolasa específico de neurona, un promotor de GFAP, el promotor temprano del SV40, promotor LTR de virus del tumor mamario de ratón; promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (VHS), un promotor del citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de la región del CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína murina, también encontrarán uso en el presente documento. Tales secuencias promotoras están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA), Invivogen (San Diego, CA) y otros.

El gen de interés puede ser un gen que probablemente sea de valor terapéutico. Ejemplos de genes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, α -1 antitripsina, factor VIII, factor IX, GAA, eritropoyetina y PEDF. Cuando se desea seleccionar o identificar expresión transgénica satisfactoria, el gen de interés puede ser un gen indicador. Se conocen muchos ejemplos de genes usados como indicadores o para selección, y pueden usarse en la invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes que codifican β -galactosidasa, neomicina, fosforo-transferasa, cloranfenicol acetil transferasa, timidina cinasa, luciferasa, beta-glucuronidasa, aminoglucósido, fosfotransferasa, higromicina B, xantina-guanina fosforibosilo, luciferasa, DHFR/metotrexato y proteína verde fluorescente (GFP).

El virus de expresión VHSr-1 pueden producirse muy similarmente a como se ha descrito anteriormente, concretamente, por recombinación homóloga del gen tk de VHS-1, como se describe en, por ejemplo, Conway et al., Gene Ther. (1999) 6:986-993 y la patente de EE.UU. N.º 7.091.029, incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una vez producidos, los vectores de VHSr, o cualquier otro virus de interés, se propagan en cultivo en una línea celular apropiada. Para virus del herpes, tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células 293, células HeLa, y similares, disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Si se usa el vector de d27.1 de VHS-1, este virus normalmente se cultivará en la línea celular V27 que complementa ICP27 (Rice et al., J. Virol. (1990) 64:1704-1715). Puede usarse cualquier medio adecuado para el virus en cuestión, con o sin suero, tal como suero bovino fetal, tal como, pero no se limita a, medio RPMI 1640, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio F12 o una mezcla del último (medio DF). Si está presente suero, el cultivo puede incluir, por ejemplo 2 % al 20 % de suero, más normalmente 5 % al 15 % de suero, 7 % al 12 % de suero, o cualquier número dentro de estos intervalos, tal como 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, y similares. Además, si se usa suero, puede estar presente en el cultivo inicial, y/o en medios frescos posteriores añadidos a los cultivos.

La cantidad del inhibidor de iNOS que va a añadirse en el método según la invención puede variarse y es a un cierto grado dependiente del inhibidor particular usado, el medio usado y el virus que va a cultivarse. Por ejemplo, cuando se cultivan virus del herpes en células Vero, la concentración de ATA en el cultivo inicial, si está presente, normalmente será 5 µM a 500 µM, preferentemente 10 µM a 250 µM, tal como 20 µM a 100 µM, es decir, 30 µM a 75 µM, tal como 30...,35...,40...,45...,50...,55...,60...,65...,70...,75, etc., o cualquier número entero dentro de estos intervalos establecidos. Similarmente, la concentración de dexametasona si está presente en el cultivo inicial normalmente será 0,1 µM a 500 µM, preferentemente 0,5 µM a 250 µM, tal como 1 µM a 100 µM, es decir, 5 µM a 75 µM, tal como 1... 5... 15... 10... 20... 25... 30..., 35..., 40..., 45...,50..., 55..., 60..., 65..., 70...,75, etc., o cualquier número entero dentro de estos intervalos establecidos. Si se usa ácido valproico, la concentración inicial será 0,1 mM a 500 mM, preferentemente 0,5 mM a 250 mM, tal como 1 mM a 100 mM, es decir, 5 mM a 75 mM, tal como 1... 5... 15... 10... 20... 25... 30... 35... 40... 45... 50... 55... 60... 65... 70... 75, etc., o cualquier número entero dentro de estos intervalos establecidos.

En ciertas realizaciones, células de virus infectadas se cultivan inicialmente en medio como se ha descrito anteriormente durante 0,5 horas a 24 horas, tal como 0,75 horas a 12 horas, 1 hora a 5 horas, 1 hora a 2 horas, o

cualquier número de horas o fracciones de las mismas dentro de estos intervalos. El inhibidor de iNOS y/o suero puede o puede no estar presente en el cultivo inicial. Posteriormente, se añade medio fresco y los cultivos se incuban durante 24 a 120 horas, tal como 48 a 96 horas, 50 a 80 horas, 60 a 75 horas, 70 a 74 horas, o cualquier número de horas o fracciones de las mismas dentro de estos intervalos. El inhibidor de iNOS y/o suero puede o puede no estar presente en el cultivo de subsecuencia, con la condición de que el inhibidor de iNOS esté presente en uno cualquiera o ambos del cultivo inicial y el cultivo posterior.

En algunas realizaciones, el inhibidor de iNOS en el cultivo inicial está presente a una concentración más alta que en el cultivo posterior. Así, por ejemplo, si el inhibidor de iNOS es ATA, puede estar presente en una cantidad de 30 a 75 μM en el cultivo inicial y luego 5 a 25 μM en el cultivo posterior. Alternativamente, el inhibidor puede estar presente solo en el cultivo inicial o el posterior.

Como se muestra en los ejemplos más adelante, un método particularmente preferido que usa ATA incluye la presencia de ATA 50 μM en el cultivo inicial, con una reducción en la cantidad de ATA en el cultivo posterior a 20 μM . Además, en el caso de ATA, es preferible incluir suero al mismo tiempo que está presente ATA. Así, si ATA se añade al cultivo inicial, es ventajoso añadir suero bovino fetal (FBS) al medio. Asimismo, si ATA se añade al cultivo posterior, la adición de FBS es necesaria para obtener rendimientos virales más altos.

Los virus se cultivan entonces para obtener un título de virus deseable. Por ejemplo, en el caso de los vectores de d27-1 de VHS-1 descritos en el presente documento, ATA aumenta los rendimientos de d27-1 en sobrenadantes de células V27 3-5 veces y los títulos pueden ser al menos 1×10^8 UFP/ml o 4×10^8 PRD/ml. Similarmenete, ATA también aumenta 1 log los rendimientos de cepas de virus VHS-1 no mutados (wt) McIntyre y KOS, y los títulos de 293 o Vero pueden ser hasta 1×10^9 PRD/ml. Los virus se recogen entonces para uso adicional.

Para los fines de la invención, células hospedadoras adecuadas para producir viriones de AAVr incluyen microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que pueden ser, o haber sido, usadas como receptores de una molécula de ADN heteróloga y que son capaces de crecer en, por ejemplo, cultivo en suspensión, matraces, placas, un biorreactor, o similares. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Así, una "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una célula que ha sido transducida con una secuencia de ADN exógeno. Si se producen virus recombinantes del herpes en un tipo de células para su uso en la preparación de viriones de AAVr, los vectores recogidos se transfectan entonces en otra célula hospedadora adecuada. Células 293, originadas a partir de una línea celular humana estable (fácilmente disponible mediante, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo con el Número de acceso ATCC CRL1573) son células hospedadoras preferidas para producir viriones de AAVr. Particularmente, la línea celular humana 293 es una línea celular humana de riñón embrionario que ha sido transformada con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5 (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36:59), y expresa los genes E1a y E1b adenovirales (Aiello et al. (1979) Virology 94:460). La línea celular 293 se transfecta fácilmente, y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que producir viriones de AAVr.

Se introducen funciones auxiliares de AAV en la célula hospedadora transduciendo la célula hospedadora con una construcción de función auxiliar de VHSr ya sea antes de, o simultáneamente con, el uso del vector de expresión de VHSr. Las construcciones auxiliares de VHSr son así usadas para proporcionar al menos expresión transitoria de genes *rep* y/o *cap* de AAV para complementar funciones de AAV ausentes que son necesarias para la infección de AAV productiva. Construcciones auxiliares de AAV carecen de ITR de AAV y no pueden ni replicarse ni encapsidarse ellas mismas.

Tras la replicación de AAV recombinante, pueden purificarse viriones de AAVr de la célula hospedadora usando una variedad de métodos de purificación convencionales, tal como cromatografía en columna, gradientes de CsCl, y similares. Por ejemplo, puede usarse una pluralidad de etapas de purificación en columna, tales como purificación en una columna de intercambio aniónico, una columna de afinidad y/o una columna de intercambio catiónico. Véase, por ejemplo, la publicación internacional N.º WO 02/12455.

Los viriones de AAVr resultantes que contienen la secuencia de nucleótidos de interés pueden entonces usarse para administración génica usando técnicas muy conocidas en la técnica y descritas en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.173.414 y 5.139.941; publicaciones internacionales N.º WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski et al., Molec. Cell. Biol. (1988) 8:3988-3996; Vincent et al., Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. Current Topics in Microbiol. and Immunol. (1992) 158:97-129; Kotin, R.M. Human Gene Therapy (1994) 5:793-801; Shelling y Smith, Gene Therapy (1994) 1:165-169; y Zhou et al., J. Exp. Med. (1994) 179:1867-1875.

2. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación están ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se han hecho esfuerzos por garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe permitirse, por supuesto, algún error experimental y desviación.

Materiales y métodos**Células**

Se obtuvieron células V27 derivadas de Vero (Rice et al., J. Virol. (1989) 63:3399-3407) y células 293 derivadas de células renales embrionarias humanas (HEK) (Graham et al., J. Gen. Virol. (1977) 36:59-74) de Applied Genetic Technologies Corporation (AGTC, Alachua, FL), las células Vero y HeLa se compraron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Todas las células se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; HyClone, South Logan, UT) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS; HyClone) y cualquiera de Geneticin (50 mg/ml; Invitrogen) para células V27 o 1 % de penicilina/estreptomina (Cellgro Mediatech, Manassas, VA) para las otras células.

10 Producción de VHS-1

Se obtuvieron la cepa KOS de VHS-1 wt y los derivados deficientes en ICP27 de la cepa KOS de VHS-1 wt: vectores d27-1 (Rice y Knipe, J. Virol. (1990) 64:1704-1715), VHSr-rep2/cap2 y VHSr-EGFP (Kang et al., Gene Ther. (2009) 16:229-239) y su línea celular V27 que complementa ICP27 productora de AGTC (Alachua, FL). La cepa MacIntyre de VHS-1 wt, comprada de Advanced Biotechnologies Inc. (ABI, Columbia MD) y la cepa KOS de VHS-1 wt fueron propagadas en líneas de células Vero, 293 o HeLa. Se recogieron partículas infecciosas de vector 72 h después de la infección por recuperación de sobrenadante de cultivo. Se determinaron los títulos de reservas de VHS-1 en partículas resistentes a DNasa/ml (PRD/ml) por ensayo Taqman. Se cuantificaron genomas virales dentro de medio de cultivo en bruto mediante tratamiento en presencia de DNasa I (50 U/ml final; Promega) a 37 °C durante 60 min, seguido de digestión con proteinasa K (Invitrogen) (1 U/ml) a 50 °C durante 60 min, y luego se desnaturalizaron a 95 °C durante 30 min. Se usó el plásmido linealizado pZero 195 UL36 (obtenido de AGTC, Inc., Alachua, FL) para generar curvas patrón. El conjunto de cebador-sonda fue específico para la secuencia de UL36 del genoma de vector (VHS-UL36 F: 5'- GTTGGTTATGGGGGAGTGTGG (SEQ ID NO: 1); VHS-UL36 R: 5'- TCCTTGTCTGGGGTGTCTTCG (SEQ ID NO: 2); sonda de VHS-UL36: 5'- 6FAM - CGACGAAGACTCCGACGCCACCTC-TAMRA (SEQ ID NO: 3). La amplificación del producto de PCR se logró con los siguientes parámetros de ciclado: 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, y 60 °C durante 60 s.

Experimentos de ATA

Se generó disolución madre de ATA (Sigma -A1895 Calidad práctica de ácido aurintricarboxílico, ≥85 % (valoración), polvo) como concentración de 500 µM en disolución acuosa 100 mM de bicarbonato sódico. Se diluyó adicionalmente disolución madre de ATA en DMEM +/- 10 % de suero bovino fetal (FBS, Hyclone, Waltham, MA) en intervalos de concentración de ATA 12-60 µM (8,5-21 µg de ATA /ml). La infección de VHS-1 a multiplicidad de infección de 0,15 (MOI=0,15) (normalmente 6x10⁵ células en una placa de 6 pocillos) se realizó en 40 % (2/5 vol) del volumen de medio final total durante 1-2 h y el medio restante (60 % o 3/5 del volumen final total) se añadió durante la etapa de dilución. Las células se incubaron entonces 72 horas y el sobrenadante se recogió para realizar ensayos de títulos de unidades formadoras por mililitro (UFP/ml) y de PRD/ml.

Experimentos de dexametasona (Dex)

Se disolvió dexametasona (Sigma -D4902) a 2 mg/ml en alcohol absoluto. Éste se diluyó con DMEM para lograr una concentración de 1 M y se guardó a -20 °C.

Se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6x10⁵ células/pocillo. Se añadió dexametasona para lograr una concentración de 1 µM en el medio de siembra. Éste se mezcló bien y se añadió a los pocillos.

Se aspiró el medio y se añadió reserva de d27-1 de VHS-1 infeccioso a MOI 0,15 (=densidad de semillas de célula x 0,15/ título de ufp de reserva de VHS) por 1 ml de DMEM (sin aditivos). Se añadió 1 ml de inóculo infeccioso por pocillo. Éste se incubó durante 1-2 horas en estufa de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, tiempo después del cual se añadió 1,5 ml de DMEM-10 % de FBS. Los cultivos se devolvieron a la estufa de incubación durante 70-74 horas.

Se recogió medio libre, se agitó con vórtex, se centrifugó a 1.100 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo dispensador, se agitó con vórtex, se separó en alícuotas y congelaron reservas a -80 °C.

Experimentos de ácido valproico (VA)

Se disolvió ácido valproico (Sigma -P4543) a concentración de 1 M en agua. Se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6x10⁵ células/pocillo. Se añadieron cantidades conocidas de ácido valproico 1 M en 1 ml de DMEM-10 % de FBS para lograr una concentración de 5 µM. Éste se agitó bien con vórtex y se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron durante seis horas, se aspiraron y se añadió reserva de d27-1 de VHS-1 infeccioso a MOI 0,15 (=densidad de semillas de célula x 0,15/ título de ufp de reserva de VHS) por 1 ml de DMEM (sin aditivos).

Se añadió 1 ml de inóculo infeccioso por pocillo y se incubó durante 1-2 horas en estufa de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, tiempo después del cual se añadió 1,5 ml de DMEM-10 % de FBS. Las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 70-74 horas. Se recogió medio libre, se agitó con vórtex y se centrifugó a 1.100 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo dispensador, se agitó con vórtex y se separó en alícuotas. Se congelaron reservas a -80 °C.

Producción de AAVr

Se co-infectaron simultáneamente células 293 (2,5 x10⁶) con tanto vectores VHSr-rep2/cap2 como VHSr-EGFP como se describe por Kang et al., Gene Ther (2009) 16:229-239. 2-4 h después de la infección, se intercambié medio infeccioso con DMEM + 10 % de FBS equivalente al doble del volumen de cultivo de preinfección. En el momento de la recogida, el sedimento de células se congeló a -80 °C. Se cuantificaron los títulos de PRD por reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en tiempo real en un ciclador térmico de bloque de 96 pocillos (Applied Biosystems; sistema de PCR en tiempo real 7500). Se sometieron muestras en bruto a tres ciclos de congelación y descongelación, luego se incubaron en presencia de Benzonase (250 U/ml), MgCl₂ 2 mM, 1 % de Tween 80 (Calbiochem) de calidad de proteína de concentración final y se incubó a 37 °C durante 60 min, seguido de digestión con 0,25 % de tripsina (Gibco) a 50 °C durante 60 min. Finalmente, tratamiento con DNasa I (50 U/ml; Promega) a 37 °C durante 30 min, y luego se desnaturalizó a 95 °C durante 20 min. Se usó el plásmido linealizado pDC67+SV40 para generar curvas patrón. El conjunto de cebador-sonda fue específico para la secuencia de poli(A) de virus simio 40 (SV40): AAVr-F: 5'- AGCAATAGCATCACAAATTTACAAA-3' (SEQ ID NO: 4); AAVr-R: 5'- GCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT-3' (SEQ ID NO: 5); AAVr-Sonda: 5' 6-FAM-AGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 6). La amplificación del producto de PCR se logró con los siguientes parámetros de ciclado: 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s.

Matriz de genoma humano

Se cultivaron células 293 confluentes (2,4x10⁶ células en un matraz de 75 cm²) en DMEM + 10 % de FCS durante aproximadamente 20 h y luego se infectaron con una unidad formadora de placa por célula (UFP/célula) de la cepa MacIntyre de VHS-1 durante 90 min. Se añadió ATA a una concentración de 20 µM (final) 90 min después de la infección. Las células infectadas se recogieron 24 h después de la infección. Se aisló ARN total de calidad y cantidad suficiente de la suspensión usando RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se realizó el perfilado de expresión del genoma completo en Affymetrix Human U133 Plus 2.0 Array por Asuragen, Inc. Se proporcionaron 3 µg de ARN total como material de entrada.

En general, la calidad del ARN evaluado en el bioanalizador tuvo valores de RIN de >9. La hibridación de matrices y los factores de aumento de escala estuvieron dentro del paso del intervalo de control de calidad. Después del barrido, se procesaron archivos de CEL de expresión sin procesar con Affymetrix Expresión Consol vs.1.1.2 (affymetrix.com). Cada archivo de CEL se procesó con Robust Multichip Analysis (RMA) y se exportó una tabla resumen como un archivo de texto. Toda la genómica aguas abajo y los análisis estadísticos se hicieron con JMP Genomics (versión 5) (jmp.com/software/genomics). Primero, se aplicó una etapa de filtrado para filtrar la baja expresión, específicamente, aquellos valores inferiores a 6 en modo log₂ en al menos 2 de las 8 muestras. De las 54.675 sondas totales Affy U133 Plus2, quedaron 41.569 (76 %) después del corte. También se observó que dos muestras de control positivo, cerebro humano y ARN de referencia universal humano reunido, respectivamente, se hibridaron bien. Para futuros análisis, se excluyeron estas dos muestras.

El análisis de componentes principales reveló dos poblaciones distintas, muestras tratadas con y sin VHS. La primera separación de componentes principales (91,7 %) se explica, por tanto, por el efecto de VHS frente al vehículo. Los datos se normalizaron a la mediana a través de cada sonda para tener una mediana de la señal de 0. Se realizó ANOVA para encontrar transcritos diferenciales significativos entre VHS frente al vehículo, ATA frente al vehículo, VHS+ATA frente al vehículo y VHS+ATA frente a VHS solo. No se incluyeron correcciones de pruebas múltiples, y se consideraron genes significativos menos del valor de p de 0,01.

Se usó un mapa auto-organizado para examinar patrones de expresión entre Vehículo, VHS1 y VHS1+ATA. Se deseó encontrar transcritos específicos que fueran tanto regulados por incremento como regulados por disminución por el tratamiento de ATA. Se encontró una agrupación distinta de genes que mostró algo de estimulación en presencia de VHS, y la corrección de ATA devolvió estos genes al nivel inicial de vehículo. Similarmente, también se encontró una agrupación de genes que fue reprimida por VHS en comparación con el vehículo, y posteriormente se activó mediante tratamiento con ATA. Éstos se llamaron Agrupaciones A y B, respectivamente (véanse las Tablas 1 y 2). Continuó el análisis para interrogar las funciones biológicas de estas agrupaciones usando el software GeneGO (genego.com).

Matriz de PCR RT² Profiler™ (SABiosciences- QIAGEN)

Se infectaron 6x10⁵ células 293 (de AGTC) con la cepa McIntyre de VHS-1 wt a MOI 1 en presencia de DMEM y 10 % de FBS con o sin ATA 50 µM y 1-2 horas y se diluyó al 40 % con DMEM y 10 % de FBS (concentración de ATA final de 20 µM). Se recogieron muestras de ARN total por triplicado 24 h después de usar Qiagen RNeasy mini kit y

se trataron con DNasa sobre columna y se eluyeron. Se combinaron muestras por triplicado de ARN eluidas y se realizaron lecturas de DO de fotospectrómetro en el eluato a 260 y 280 nm para determinar la concentración. Se convirtió ARN de muestra en ADNc molde usando el kit de primera hebra SABiosciences RT2. El ADNc se usó entonces en la matriz de PCR de la vía de señalización humana de JAK / STAT (PAHS-039A).

5 Ejemplo 1

Inhibición de niveles de iNOS inducida por VHS en células V27 usando ATA

Se infectaron células V27 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Hyclone, Waltham, MA) con el vector de d27.1 de VHS-1 a una MOI de 1 y se trataron con ATA 30 μ M (Sigma, St. Louis, MO), con o sin 10 % de suero bovino fetal (FBS). También se realizaron experimentos de control sin ATA. Se obtuvieron lisados celulares de V27 10 24 horas después de la infección (h.d.i.) y se realizaron transferencias Western en los lisados y la proteína iNOS se detectó usando pAb anti-iNOS/NOS tipo II de conejo purificado (BD Biosciences, Cat N.º 610332). Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como se muestra, la infección por VHS indujo la expresión de iNOS en aquellos cultivos que no incluyeron ATA (carriles 4 y 5). La expresión de iNOS se inhibió en presencia de ATA 30 μ M (carriles 2 y 3). La presencia o ausencia de 10 % de FBS no tuvo un efecto sobre la expresión de iNOS. 15

Ejemplo 2

Optimización del protocolo de ATA-VHS

Con el fin de probar si ATA podría aumentar el rendimiento del vector de d27-1 de VHSr-1 (d27-1) en células V27, se aplicó ATA al medio durante las etapas de infección (Etapa 1) o dilución (Etapa 2) (Figura 2A). La infección de d27-1 a MOI=0,15 se realizó en 2/5 del volumen del medio final y los 3/5 restantes del medio se añadieron durante la etapa de dilución. 20

El tratamiento con ATA retrasó la formación de placas de VHS-1 o la lisis de células en monocapas de células V27. El efecto citopático (CPE) en el momento de la recogida, 72 horas después de la infección (hdi), fue entre el 20-60 % en comparación con el 100 % de CPE en ausencia de ATA. El tratamiento con ATA durante la etapa de infección por VHS-1 (ATA en la Etapa 1) mostró un aumento de los títulos de d27-1 en sobrenadantes de células V27 recogidas 25 72 hdi (Figura 4B). La concentración de ATA óptima cuando se añadió durante la etapa de infección (ATA I) fue 50 μ M y ésta se diluyó además a la concentración final (c.f.) de ATA 20 μ M durante la etapa de dilución añadiendo los 3/5 restantes de vol de medio. En este caso, el ATA aumentó los títulos de d27-1 en el sobrenadante en el momento de la recogida (72 h.d.i.) aproximadamente 10 veces: de $4,0 \pm 0,3 \times 10^7$ PRD/ml o $1,4 \pm 0,2 \times 10^7$ UFP/ml a $3,7 \pm 0,2 \times 10^8$ PRD/ml o $1,2 \pm 0,3 \times 10^8$ UFP/ml (Figura 4B). 30

Con el fin de determinar qué concentraciones y condiciones para la adición de ATA tienen impacto sobre los rendimientos de VHS, se realizaron los siguientes experimentos. Se añadió ATA a concentraciones variables a cultivos de V27 infectados con los vectores de d27-1 de VHS-1 en cualquiera de placas de seis pocillos (Figura 2B) o matraces T150 (Figura 2C) en dos etapas del siguiente modo. En la Etapa 1 del protocolo, se infectaron células V27 con 0,15 MOI del vector de VHSr en 2/5 del volumen final de DMEM con 10 % de FBS y concentraciones de ATA 0-60 μ M. Las células se cultivaron durante 1-2 horas a 37 °C para completar la Etapa 1. En la Etapa 2, la concentración de ATA se redujo a un intervalo entre 12-24 μ M mediante la adición de 3/5 de volumen del medio final. Las células se cultivaron durante 70-74 horas a 37 °C y se recogió el sobrenadante. Se expresaron títulos virales como partículas resistentes a DNasa (PRD/ml) o unidades formadoras de placa (ufp/ml) por ml y se 35 40 determinaron como se ha descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en ambas Figuras 2B y 2C y concentraciones de ATA óptimas están en negrita. Como puede apreciarse, en tanto las placas de seis pocillos (Figura 2B) como los matraces de T150 (Figura 2C), cultivos con ATA añadido en cualquiera de la Etapa 1 o Etapa 2 tuvieron títulos de VHS significativamente más altos que aquellos sin ATA. Además, los títulos más altos se observaron a concentraciones de ATA de 50 μ M en la Etapa 1, se redujeron a 20 μ M en la Etapa 2 (Figura 2B), aunque todas las concentraciones de ATA produjeron títulos virales más altos que aquellos cultivos que carecieron de ATA. 45

Se realizaron experimentos adicionales para determinar condiciones óptimas y el efecto de la presencia o ausencia de FBS sobre el título de VHS. La presencia de suero, específicamente, 10 % de suero bovino fetal (FBS), en medio que contenía ATA fue el parámetro más importante para el rendimiento de títulos de VHS-1 inducidos por ATA. Una complementación de ATA en medio libre de suero durante la etapa de dilución (ATA en Etapa 2) causó la reducción del título de virus, donde el título de "PRD" se redujo por debajo del nivel de control y el título de UFP/ml estuvo por debajo de la detección (Figura 3). También se observó un efecto incluso más espectacular en medio libre de suero cuando ATA, a partir de una concentración 3 μ M, se complementó durante la Etapa 1 de infección y tanto los títulos de PRD/ml como de UFP/ml estuvieron por debajo del límite de detección. 50

En este experimento, se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6×10^5 células/pocillo. Se preparó 2x disolución de infección de VHS del siguiente modo: se añadió la reserva de d27.1 de 55

VHS-1 a DMEM (sin FBS) a 2x título tal que las células se infectaran a MOI final de 0,15. Se prepararon varias combinaciones de 2x disolución de ATA que contenían o bien ATA 100 μ M o bien 40 μ M en DMEM y sin FBS o con 20 % FBS.

5 Se mezcló 2x disolución de infección de VHS con volúmenes iguales de o bien DMEM +/- 20 % de FBS o 2x disolución de ATA deseada +/- 20 % de FBS, se agitó con vórtex y se añadió 1 ml de inóculo infeccioso por pocillo en la Etapa 1. Si los pocillos contuvieron ATA en la Etapa 1, la concentración fue 50 μ M y todos los pocillos se incubaron durante 1-2 h. En la Etapa 2, se añadieron combinaciones adicionales de 1,5 ml de DMEM +/- ATA 40 μ M y +/- 20 % de FBS. Si los pocillos contuvieron ATA tanto en la Etapa 1 como la Etapa 2, la concentración de ATA final fue 20 μ M. Las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 70-74 horas, tiempo después del cual se recogió medio libre, se agitó con vórtex y se centrifugó a 1.100 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo dispensador, se agitaron con vórtex, se separaron en alícuotas y las reservas se congelaron a -80 °C.

Ejemplo 3

Importancia de la presencia de suero en el protocolo de ATA-VHS

15 Se realizaron experimentos adicionales para determinar condiciones óptimas y el efecto de la presencia o ausencia de FBS sobre el título de VHS. La presencia de suero, específicamente, 10 % de suero bovino fetal (FBS), en medio que contiene ATA fue el parámetro más importante para el rendimiento del título de VHS-1 inducido por ATA. Una complementación de ATA en medio libre de suero durante la etapa de dilución (ATA en la Etapa 2) causó la reducción del título de virus, donde el título de "PRD" se redujo por debajo del nivel de control y el título de UFP/ml estuvo por debajo de la detección (Figura 3). Se observó un efecto incluso más dramático en medio libre de suero cuando ATA, a partir de una concentración 3 μ M, se complementó durante la Etapa 1 de infección (datos no mostrados) y tanto los títulos de PRD/ml como de UFP/ml estuvieron por debajo del límite de detección.

25 En este experimento, se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6×10^5 células/pocillo. Se preparó 2x disolución de infección de VHS del siguiente modo: se añadió reserva de d27.1 de VHS-1 a DMEM (sin FBS) a 2x título tal que las células se infectaran a MOI final de 0,15. Se prepararon varias combinaciones de 2x disolución de ATA que contenían o bien ATA 100 μ M o bien 40 μ M en DMEM y sin FBS o con 20 % de FBS. Se mezclaron volúmenes iguales de 2x disolución de infección de VHS de o bien DMEM +/- 20 % de FBS o bien la 2x disolución de ATA deseada +/- 20 % de FBS, se agitó con vórtex y se añadió 1 ml de inóculo infeccioso por pocillo en la Etapa 1. Si los pocillos contuvieron ATA en la Etapa 1, la concentración fue 50 μ M y todos los pocillos se incubaron durante 1-2 h. En la Etapa 2, se añadieron combinaciones adicionales de 1,5 ml de DMEM +/- ATA 40 μ M y +/- 20 % de FBS. Si los pocillos contuvieron ATA tanto en la Etapa 1 como la Etapa 2, la concentración de ATA final fue 20 μ M. Las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 70-74 horas, tiempo después del cual se recogió medio libre, se agitó con vórtex y se centrifugó a 1.100 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo dispensador, se agitaron con vórtex, se separaron en alícuotas y las reservas se congelaron a -80 °C.

Ejemplo 4

Efecto de ATA sobre los títulos de VHS no mutado en cultivo

40 La Figura 4A muestra los títulos de sobrenadante de ambas cepas de VHS-1 wt, KOS y McIntyre, en líneas celulares permisivas para la propagación de VHS-1 wt: células 293, células HeLa y Vero. Se propagaron cepas de VHS-1 wt KOS y McIntyre en células 293, HeLa y Vero usando el protocolo de ATA-VHS donde ATA 50 μ M se añadió en la Etapa 1 y la concentración final después de la Etapa 2 se diluyó a ATA 20 μ M. Los sobrenadantes que contenían el virus se recogieron después de tres días como se ha descrito anteriormente. ATA aumentó el rendimiento de ambos tipos de virus en células Vero. La cepa McIntyre de VHS-1 wt alcanzó los títulos más altos después de la inducción de ATA en células 293, sin embargo, ATA pareció inhibir el crecimiento de KOS de VHS-1 en células 293. Finalmente, ATA también pareció inhibir ambos tipos de virus VHS-1 en células HeLa. ANOVA bilateral; prueba de Bonferroni; - ATA frente a + ATA: ***: $p < 0,001$, ns: $p > 0,05$; n=4 experimentos independientes.

50 Para los cálculos estadísticos, se realizó un estudio mayor con un conjunto de diez experimentos independientes (n=10) en placas de 6 pocillos con o sin ATA añadido durante la etapa de infección (Etapa 1) comparando d27-GFP deficiente en la replicación y también la cepa McIntyre de VHS-1 wt con el fin de investigar si ATA podría aumentar el título en la cepa de VHS-1 wt también (Figura 4B). Se añadió ATA a 50 mM a monocapas confluentes de células, células V27 para d27-1 o células 293 para McIntyre de VHS-1 wt, durante la etapa de infección (Etapa 1) y las células se infectaron con vectores a MOI=0,15 mientras que ATA se diluyó 1 h después a una concentración final de 20 mM. Después de la adición de ATA, el título de d27-1 aumentó significativamente 6,1 veces de $5,4 \times 10^7$ PRD/ml o $1,1 \times 10^8$ PRD/ml (** $P < 0,01$) y McIntyre de VHS-1 wt aumentó significativamente 9,1 veces de $3,3 \times 10^8$ PRD/ml o $1,0 \times 10^9$ PRD/ml (** $P < 0,001$) como se analizó por ANOVA bilateral y la prueba de Bonferroni (Figura 4B).

Ejemplo 5Efecto de ATA en reservas de VHS sobre la producción de viriones de AAVr

Con el fin de determinar si la presencia de ATA durante la producción de VHS afectó el rendimiento de viriones de AAVr producidos usando vectores de VHS, se realizó el siguiente experimento que muestra títulos de AAVr afectados por el resto de ATA presente de reservas de VHSr-1 producidas en células 293 (Figura 5A). El vector AAVr-GFP se produjo por co-infección de vectores VHSr-rep2/cap2 y VHSr-EGFP en placas de 60 mm en células 293 usando reservas de VHSr-1 que contenían ATA preparadas en diferentes concentraciones, concentraciones de ATA (véase 12 μM o 20 μM) (véase Material y métodos). El título de PRD/ml de AAVr aumentó ligeramente 1,3 veces si se usa la reserva de VHSr-rep2/cap2 que se preparó con ATA 20 μM añadido durante la infección (Etapa 1 de ATA) frente al control "Sin ATA" ($*p<0,05$), donde la concentración de ATA durante la producción de AAVr fue aproximadamente 3 μM . No se detectó aumento de títulos de AAVr significativo si se usa la reserva de VHSr-rep2/cap2 que se preparó con ATA 12 μM (Figura 5A). ANOVA unilateral; prueba de Tukey: $*p<0,05$; ATA 20 μM frente a Sin ATA; n=4 experimentos independientes.

En otro experimento, se mostró que ATA aumentó el título de AAVr cuando se añadieron cantidades conocidas de ATA 10 μM directamente a medio de células 293 durante 2 h de la etapa de co-infección de VHSr-rep2/cap2 y VHSr-EGFP. Este efecto no se observó cuando las concentraciones de ATA fueron más altas de 20 μM (Figura 5B).

Ejemplo 6Mecanismo de acción de ATA

Con el fin de iluminar el mecanismo de acción de ATA por matriz de genoma humano y el hecho de que Vero y V27 son líneas celulares derivadas de mono, se probó la propagación de VHS-1 wt en varias líneas celulares humanas (Figuras 4A-4B). Se compararon una propagación de dos cepas de VHS-1 no mutadas (VHS-1 wt), KOS y McIntyre, en tres líneas celulares: riñón embrionario humano 293 (células 293), células HeLa de cáncer de cuello uterino humano y células Vero epiteliales de riñón de mono verde africano. Los experimentos se llevaron a cabo en medio que contenía 10 % de FBS siguiendo el esquema del protocolo de ATA I, donde se complementó ATA 50 μM durante la etapa de infección y adicionalmente se diluyó a concentración 20 μM de ATA (véase Material y métodos). En células 293 derivadas de ser humano, solo el título de virus de McIntyre de VHS-1 wt aumentó significativamente por ATA, de $1,4 \times 10^8$ PRD/ml a $1,2 \times 10^9$ PRD/ml ($***p<0,001$). En células Vero, ATA aumentó significativamente los títulos solo en la cepa KOS de VHS-1 wt de $1,7 \times 10^8$ PRD/ml hasta $9,1 \times 10^8$ PRD/ml ($***p<0,001$; ambas estadísticas: ANOVA bilateral, prueba de Bonferroni; n=4). Sorprendentemente, en células HeLa, ATA pareció inhibir la propagación de tanto las cepas KOS como McIntyre de VHS-1.

Para identificar los distintivos del gen de respuesta a célula a infección por McIntyre de VHS-1 wt, se hizo el perfilado transcripcional usando la matriz Affymetrix Human U133 Plus 2.0 con células 293 que fueron o bien tratadas con vector vacío, tratadas con ATA (ATA), infectadas por McIntyre de VHS-1 wt (VHS) o bien tratadas con ATA e infectadas por McIntyre de VHS-1 wt (VHS y ATA) durante 24 h. Los cambios en la expresión génica inducidos por la infección o tratamiento con ATA se identificaron referenciando el nivel de expresión génica para cada sonda con el correspondiente en la muestra de células no infectadas. La infección por VHS-1 sola tuvo fuerte impacto sobre el perfil de expresión génica de células 293 cuando se compara con el perfil génico de células sin tratar.

Primero, se aplicó una etapa de filtración para filtrar la baja expresión y de las 54.675 sondas totales Affy U133 Plus2, quedaron 41.569 (76 %) sondas después del corte. El análisis de componentes principales reveló dos poblaciones distintas, muestras tratadas con y sin VHS. Se realizó ANOVA para encontrar transcritos diferenciales significativos entre VHS frente al vehículo, ATA frente al vehículo, VHS+ATA frente al vehículo y VHS+ATA frente a VHS solo. Se consideraron genes significativos inferiores a un valor de p de 0,01. Se usó un mapa auto-organizado para examinar patrones de expresión entre Vehículo, VHS-1 y VHS-1+ATA. Se encontró una agrupación distinta de genes, Agrupación A y B (Tablas 1 y 2), que mostró cambios en los perfiles transcripcionales producidos por VHS-1 y su corrección por ATA que devolvió estos genes al nivel de referencia de vehículo.

Las funciones biológicas de estas agrupaciones se analizaron en GeneGo. La Agrupación A (Tabla 2) representó 58 sondas que mostraron regulación por incremento en VHS-1 y supresión después de la adición de ATA. Estos genes estuvieron principalmente implicados en la señalización inflamatoria de IgE e IFN, y respuesta inmunitaria general. La Agrupación B (Tabla 1) representó 152 sondas que mostraron regulación por disminución por VHS-1 y su posterior regulación por incremento de ATA devolviéndolos al nivel de referencia de vehículo. Los genes en esta agrupación estuvieron principalmente implicados en el ciclo celular G1/S, transducción de señales en PTEN y desarrollo de WNT. Por ejemplo, ATA en presencia de VHS-1 reguló por incremento los genes CDC25A, CDKN1A, CDKN1C, CCNK, CNNM2 de las vías de progresión del ciclo celular y genes de la vía de Ras/Raf/MEK, tales como FOXC1, FOXD3, FOXO3 (véase la Tabla 1).

Las Tablas 3A y 3B muestran la reducción de la expresión de nNOS, iNOS y eNOS en muestras de ATA + VHS como se analizó por Affymetrix Gen Array y reducción de la expresión de iNOS en muestras de VHS + ATA como se analizó por Qiagen SAB Jak-Sta RT-PCR Microarray.

Ejemplo 7Efecto de dexametasona sobre los rendimientos de VHS

5 Con el fin de determinar si el inhibidor de iNOS dexametasona también aumentó los rendimientos de VHSr en cultivo, se realizó el siguiente experimento (Figura 6). Muestra el efecto de dexametasona (Dex) sobre el título viral de VHS-1 de d27-1/GFP. Los títulos finales de VHS-1 de d27-1/GFP fueron, en general, ligeramente elevados después de los tratamientos con Dex o tratamientos en comparación con control no tratado.

10 Se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6×10^5 células/pocillo y al día siguiente se añadieron diferentes concentraciones de dexametasona (Dex) a los pocillos bien antes de la infección por VHS-1 (pretratamiento) o bien durante la infección (tratamiento) en 2/5 de medio DMEM-10 % de FBS. Después de 1-2 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 3/5 vol. de DMEM-10 % de FBS. Los cultivos se devolvieron a la estufa de incubación y se recogió el sobrenadante después de 70-74 horas. Los datos se muestran como valor medio de títulos \pm D.E. en ufp/ml (n=2).

Ejemplo 8Efecto del ácido valproico sobre los rendimientos de VHS

15 Con el fin de determinar si el inhibidor de iNOS ácido valproico también aumentó los rendimientos de VHSr en cultivo, se realizó el siguiente experimento. La Figura 7 muestra el efecto del pretratamiento por ácido valproico (VA) sobre el título viral de VHS-1 de d27-1/GFP. VA a concentración 5 mM elevó ligeramente el título de VHS-1 de d27-1/GFP, sin embargo las concentraciones por debajo y por encima de 5 mM parecen tener un efecto inhibitorio sobre el título de VHS-1 de d27-1/GFP, en comparación con control no tratado.

20 Se sembraron células V27 en placas de seis pocillos el día antes de la infección a 6×10^5 células/pocillo y al día siguiente se añadieron diferentes concentraciones de VA a los pocillos. Las placas se incubaron durante 6 h, se aspiraron y se añadieron 2/5 vol de medio que contenían reserva de d27-1 de VHS-1 infeccioso y se incubaron durante 1-2 horas a 37 °C, 5, tiempo después del cual se añadió 3/5 vol de medio DMEM-10 % de FBS. Los cultivos se devolvieron a la estufa de incubación y el sobrenadante se recogió después de 70-74 horas.

25 Como se muestra en los ejemplos anteriores, ATA en concentraciones micromolares aumenta el rendimiento del vector de VHS-1. Este hallazgo es importante para tanto la producción de VHS a gran escala, además de la producción de vectores de VHSr y AAVr. Además y sorprendentemente, la presencia de ATA en reservas de VHSr-1 no influyó negativamente en el rendimiento de AAVr. Este resultado es sorprendente, ya que se sabe que ATA en cantidades milimolares y concentraciones más altas es un agente antiviral (Cushman et al., J. Med. Chem. (1991) 34:329-337; Zhang et al., Antiviral Res. (1999) 43:23-35; Yap et al., Computational Biol. and Chem. (2005) 29:212-219; De Clercq, Advents, Advances, and Adventures Med. Res. Rev. (2011) 31:118-160). En medio libre de suero los inventores también han observado un posible efecto antiviral de ATA a concentraciones micromolares, pero no en presencia de suero (10 % de FBS).

35 También como se muestra en el presente documento, el tratamiento con ATA retrasó la formación de placas de VHS-1 y la lisis celular en monocapas de células V27 y el efecto citopático (CPE), que evidencia las propiedades antiapoptóticas. El mecanismo de acción de ATA en el aumento del rendimiento de VHS-1 parece implicar cambios en factores requeridos para la producción y reducción de VHS-1 de la respuesta inmunitaria antiviral innata celular responsable de una eliminación viral. A partir del análisis Human Genome Array anterior, se descubrió que la infección por VHS-1 sola tiene un fuerte impacto sobre el perfil de expresión génica de células 293 y el efecto de ATA se observó principalmente en células tratadas con tanto VHS-1 como ATA. Los genes implicados en el ciclo celular G1/S, transducción de señales en PTEN y desarrollo de WNT estuvieron significativamente regulados por disminución por VHS-1 y regulados por incremento después de la adición de ATA.

45 Genes principalmente implicados en la señalización inflamatoria de IgE e IFN, y respuesta inmunitaria general, se regularon por incremento por VHS-1 y se suprimieron después de la adición de ATA. En presencia de VHS-1, ATA reguló por incremento los genes CDC25A, CDKN1A, CDKN1C, CENK, CNNM2 de las vías de progresión del ciclo celular y los genes de la vía de Ras/Raf/MEK, que incluyen FOXC1, FOXD3, FOXO3.

El hallazgo de que ATA puede aumentar el rendimiento de VHS-1 es importante debido a la necesidad de rendimientos más altos de vectores de VHS-1 para la producción a gran escala para terapia génica y otras aplicaciones.

50 Así, se describen métodos de aumento de los rendimientos virales usando inhibidores de iNOS. Aunque se han descrito realizaciones preferidas de la invención objeto en algún detalle, se entiende que pueden hacerse variaciones obvias sin apartarse del alcance de la invención como se define en el presente documento.

Tabla 1. Lista de genes de la Agrupación B: Genes suprimidos por VHS y regulados por incremento por VHS+ATA

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
230304_at	---	---	2,1691	0,0001
225806_at	JUB	jub, homólogo de ajuba (<i>Xenopus laevis</i>)	2,126171	0,0004
202935_s_at	SOX9	SRY (región Y determinante del sexo)- caja 9	1,855105	0,000046
204790_at	SMAD7	Miembro 7 de la familia de SMAD	1,797951	0,0029
214633_at	SOX3	SRY (región Y determinante del sexo)- caja 3	1,797254	0,000007
210512_s_at	VEGFA	factor de crecimiento endotelial vascular A	1,754719	0,000021
216652_s_at	DR1	regulador por disminución de la transcripción 1, unión a TBP (cofactor 2 negativo)	1,74529	0,0036
205932_s_at	MSX1	homeocaja 1 de msh	1,726634	6,90E-06
209348_s_at	MAF	homólogo oncogénico de fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf (aviar)	1,685705	0,0073
217028_at	CXCR4	receptor 4 de quimiocina (motivo C-X- C)	1,652962	0,0093
218251_at	MID1IP1	proteína 1 de interacción con MID1 (homólogo G12 específico de gastrulación (pez cebra))	1,642017	0,0064
1553764_a_at	JUB	jub, homólogo de ajuba (<i>Xenopus laevis</i>)	1,623019	0,0017
214446_at	ELL2	factor de elongación, ARN polimerasa II, 2	1,602283	0,0001
227718_at	PURB	proteína de unión a elemento rico en purina B	1,59314	0,0019
219624_at	BAG4	atanogen 4 asociado a BCL2	1,578527	0,0007
225642_at	KTI12	homólogo de KTI12, asociado a cromatina (<i>S. cerevisiae</i>)	1,566082	0,0002
203705_s_at	FZD7	homólogo frizzled 7 (<i>Drosophila</i>)	1,54382	0,0002
222696_at	AXIN2	axina 2	1,526076	0,0066
202007_at	NID1	nidógeno 1	1,521713	0,0029
226858_at	CSNK1E	caseína cinasa 1, épsilon	1,51752	0,0002
57739_at	DND1	homólogo 1 de extremo muerto (pez cebra)	1,515518	0,0005
1558290_a_at	PVT1	oncogén Pvt1 (no codificante de proteína)	1,515288	0,0016

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
215694_at	SPATA5L1	1 similar a 5 asociada a la espermatogénesis	1,51283	0,0012
206302_s_at	NUDT4 /// NUDT4P1	nudix (resto X unido a nucleósido difosfato)-tipo motivo 4 /// nudix (resto X unido a nucleósido difosfato)-tipo motivo 4 pseudogén 1	1,49443	0,0073
218486_at	KLF11	factor 11 similar a Kruppel	1,493386	0,0006
201695_s_at	NP	nucleósido fosforilasa	1,492386	0,0004
203002_at	AMOTL2	2 similar a angiomotina	1,489062	0,0093
227195_at	ZNF503	proteína 503 de dedo de cinc	1,478008	0,0094
238012_at	DPP7	dipeptidil-peptidasa 7	1,471194	0,0003
209905_at	HOXA9	homeocaja A9	1,46661	0,0003
209188_x_at	DR1	regulador por disminución de la transcripción 1, unión a TBP (cofactor 2 negativo)	1,4541	0,0001
221168_at	PRDM13	13 que contiene dominio PR	1,448075	0,0043
213338_at	TMEM158	proteína transmembranaria 158	1,436626	0,0001
209098_s_at	JAG1	jagged 1 (síndrome de Alagille)	1,433177	0,0001
206300_s_at	PTH1H	hormona similar a hormona paratiroidea	1,430301	0,0004
220018_at	CBLL1	1 similar a secuencia transformante retroviral ecotrópica Cas-Br-M (murina)	1,427214	0,00003
226284_at	ZBTB2	2 que contiene dominio de dedo de cinc y de BTB	1,421748	6,50E-06
213348_at	CDKN1C	inhibidor de cinasas 1C dependiente de ciclina (p57, Kip2)	1,413731	0,0001
209565_at	RNF113A	proteína 113A de dedo anular	1,413412	7,80E-06
239696_at	---	---	1,413287	0,0006
212696_s_at	RNF4	proteína 4 de dedo anular	1,408882	0,0034
214651_s_at	HOXA9	homeocaja A9	1,404355	0,000042
217741_s_at	ZFAND5	dedo de cinc, dominio 5 tipo AN1	1,401465	0,0003
229309_at	ADRB1	adrenérgico, beta-1-, receptor	1,398788	0,0008
228953_at	WHAMM	homólogo de proteína WAS asociado a actina, membranas de golgi y microtúbulos	1,392654	0,0013
1554522_at	CNNM2	ciclina M2	1,389108	0,0049
204913_s_at	SOX11	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 11	1,385923	0,0004

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
231901_at	C19orf52	marco de lectura abierto 52 del cromosoma 19	1,378798	0,0034
224314_s_at	EGLN1	homólogo 1 de EGL-nueve (C. elegans)	1,375757	0,0001
209099_x_	JAG1	jagged 1 (síndrome de Alagille)	1,374203	0,0029
205555_s_at	MSX2	homeocaja 2 de msh	1,368114	0,00003
216035_x_at	TCF7L2	2 similar a factor de transcripción 7 (específico de linfocitos T, HMG-caja)	1,368112	0,0003
225824_at	CCNK	ciclina K	1,363977	0,0076
209201_x_at	CXCR4	receptor 4 de quimiocina (motivo C-X-C)	1,360311	0,0001
235147_at	FU32063	LOC150538 hipotética	1,357503	0,0008
204527_at	MIO5A	miosina VA (cadena pesada 12, mioxina)	1,356721	0,0017
242963_at	SGMS2	esfingomielina sintasa 2	1,356199	0,0008
218247_s_at	MEX3C	homólogo C de mex-3 (C. elegans)	1,3496	0,0001
207654_x_at	DR1	regulador por disminución de la transcripción 1, unión a TBP (cofactor 2 negativo)	1,348295	9,30E-06
209357_at	CITED2	transactivador de la interacción Cbp/p300, con dominio del extremo carboxi rico en Glu/Asp, 2	1,347165	0,0002
202241_at	TRIB1	homólogo 1 de Tribbles (Drosophila)	1,340674	0,0009
209372_x_at	TUBB2A /// TUBB2B	tubulina, beta 2A /// tubulina, beta 2B	1,339095	0,0001
205541_s_at	GSPT2	transición 2 de fase G1 a S	1,33517	0,005
1568815_a_at	DDX50	polipéptido 50 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	1,329483	0,0043
204805_s_at	H1FX	familia de histona H1, miembro X	1,324347	0,0013
213152_s_at	SFRS2B	factor de corte y empalme, rico en arginina/serina 2B	1,322967	6,70E-06
225699_at	C7orf40	marco de lectura abierto 40 del cromosoma 7	1,321373	0,0014
218295_s_at	NUP50	nucleoporina 50 kDa	1,318229	0,0014
224739_at	PIM3	oncogén pim-3	1,31654	0,0001
214911_s_at	BRD2	2 que contiene bromodominio	1,313049	0,0015
208938_at	PRCC	carcinoma de células renales papilares (asociado a la translocación)	1,304724	0,000041

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
206907_at	TNFSF9	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 9	1,295621	0,0032
202284_s_at	CDKN1A	inhibidor 1A de cinasas dependientes de ciclina (p21, Cip1)	1,28534	0,0001
206915_at	NKX2-2	homeocaja 2 de NK2	1,280773	0,000021
215087_at	C15orf39	marco de lectura abierto 39 del cromosoma 15	1,277596	0,0013
202219_at	SLC6A8	familia 6 de los transportadores de soluto (transportador de neurotransmisores, creatina), miembro 8	1,273131	0,0006
202704_at	TOB1	transductor de ERBB2, 1	1,272848	0,0016
213038_at	RNF19B	proteína 19B de dedo anular	1,27284	0,0022
213150_at	HOXA10	homeocaja A10	1,272477	0,008
204383_at	DGCR14	gen 14 de la región crítica del síndrome de DiGeorge	1,268562	0,000043
1553613_s_at	FOXC1	caja C1 de forkhead	1,26852	0,0003
218398_at	MRPS30	proteína ribosómica mitocondrial S30	1,266043	0,0057
202166_s_at	PPP1R2	proteína fosfatasa 1, subunidad 2 reguladora (inhibidora)	1,264115	0,00003
235004_at	RBM24	proteína 24 de motivo de unión a ARN	1,260011	0,0086
223742_at	MRPL4	proteína ribosómica mitocondrial L4	1,251284	0,000049
211756_at	PTH1H	hormona similar a hormona paratiroidea	1,24883	0,0016
209211_at	KLF5	factor 5 similar a Kruppel (intestinal)	1,241821	0,0003
225796_at	PXK	serina/treonina cinasa que contiene dominio PX	1,239504	0,0002
225434_at	DEDD2	2 que contiene dominio efector de muerte	1,23754	0,000044
208686_s_at	BRD2	2 que contiene bromodominio	1,229145	0,0001
217821_s_at	WBP11	proteína 11 de unión al dominio WW	1,218077	0,0002
244519_at	ASXL1	1 similar a peine sexual adicional (Drosophila)	1,208056	0,000044
208415_x_at	ING1	familia de inhibidores del crecimiento, miembro 1	1,184054	0,0017
216511_s_at	TCF7L2	2 similar a factor de transcripción 7 (específico de linfocitos T, caja HMG)	1,174677	0,0024
235959_at	---	---	1,172362	0,0008
243707_at	---	---	1,171741	0,0005

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
227852_at	RP9	retinitis pigmentosa 9 (dominante autosómico)	1,171328	0,0002
1555772_a_at	CDC25A	homólogo A del ciclo 25 de la división celular (S. pombe)	1,170244	0,0051
221841_s_at	KLF4	factor 4 similar a Kruppel (intestino)	1,16333	0,0006
214789_x_at	SFRS2B	factor de corte y empalme, 2B rico en arginina/serina	1,162135	0,0001
216997_x_at	TLE4	potenciador similar a transducina de la separación 4 (homólogo de E(sp1), Drosophila)	1,159916	0,0001
205780_at	BIK	destructor que interacciona con BCL2 (inductor de la apoptosis)	1,158085	0,0001
212075_s_at	CSNK2A1	caseína cinasa 2, polipéptido alfa 1	1,156022	0,0049
228820_at	XPNPEP3	X-prolil aminopeptidasa (aminopeptidasa P) 3, supuesta	1,152448	0,0008
209653_at	KPNA4	carioferina alfa 4 (importina alfa 3)	1,146903	0,0004
209457_at	DUSP5	fosfatasa 5 de especificidad doble	1,144663	0,0016
224671_at	MRPL10	proteína ribosómica mitocondrial L10	1,144585	0,0061
200618_at	LASP1	proteína 1 de LIM y SH3	1,140405	0,0097
228931_at	COQ4	homólogo de coenzima Q4 (S. cerevisiae)	1,136018	0,0008
224583_at	COTL1	1 similar a coactosina (Dictyostelium)	1,128103	0,001
238738_at	PSMD7	subunidad 26S de proteasoma (prosome, macropaina), no ATPasa, 7	1,128031	0,0062
202501_at	MAPRE2	proteína asociada a microtúbulos, familia RP/EB, miembro 2	1,12791	0,0046
214321_at	NOV	gen expresado en exceso en nefroblastoma	1,123481	0,0004
202936_s_at	SOX9	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 9	1,12181	0,0054
222163_s_at	SPATA5L1	1 asociada a 5 de espermatogénesis	1,116794	0,0013
241612_at	FOXD3	caja D3 de forkhead	1,11263	0,0041
202431_s_at	MYC	homólogo de oncogén viral de mielocitomatosis v-myc (aviar)	1,105333	0,0007
215933_s_at	HHEX	homeocaja hematopoyéticamente expresada	1,105321	0,0002
204132_s_at	FOXO3 FOXO3B	caja O3 de forkhead /// pseudogén de caja O3B de forkhead	1,100606	0,0007
201041_s_at	DUSP1	fosfatasa 1 de especificidad doble	1,09043	0,0004

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
230233_at	---	---	1,087609	0,0005
215223_s_at	SOD2	superóxido dismutasa 2, mitocondrial	1,087493	0,0001
225689_at	C3orf39	marco de lectura abierto 39 del cromosoma 3	1,080337	0,003
223132_s_at	TRIM8	8 que contiene motivo tripartito	1,073976	0,0065
203313_s_at	TGIF1	homeocaja 1 de factor inducido por TGFB	1,073363	0,0008
201461_s_at	MAPKAPK2	proteína cinasa 2 activada por proteína cinasa activada por mitógeno	1,070375	0,0088
236174_at	---	---	1,069052	0,0013
223679_at	CTNNB1	catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88 kDa	1,060314	0,0044
204039_at	CEBPA	CCAAT/proteína de unión a potenciador (C/EBP), alfa	1,052213	0,01
234302_s_at	ALKBH5	alkB, homólogo 5 de reparación de la alquilación (E. coli)	1,049599	0,0043
223290_at	PDXP	piridoxal (piridoxina, vitamina B6) fosfatasa	1,048187	0,0022
226644_at	MIB2	homólogo 2 de mindbomb (Drosophila)	1,041356	0,0011
206363_at	MAF	homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoponeurótico v-maf (aviar)	1,037386	0,0008
1555639_a_at	RBM14	proteína 14 de motivo de unión a ARN	1,035626	0,0003
222527_s_at	RBM22	proteína 22 de motivo de unión de ARN	1,027056	0,0008
213419_at	APBB2	unión a proteína de precursor de amiloide beta (A4), familia B, miembro 2	1,025879	0,0009
213360_s_at	POM121 /// POM121C	glucoproteína de membrana POM121 (rata) /// glucoproteína C de membrana POM121	1,023715	0,0013
225832_s_at	DAGLB	diacilglicerol lipasa, beta	1,001586	0,0001
212445_s_at	NEDD4L	similar a 4 regulada por disminución por el desarrollo expresada por células de precursor neural	0,997235	0,0022
224562_at	WASF2	familia de proteínas WAS, miembro 2	0,996687	0,0043
223389_s_at	ZNF581	proteína de dedo de cinc 581	0,99618	0,0004
231721_at	JAM3	molécula 3 de adhesión de unión	0,989941	0,0001
203140_at	BCL6	LLC de linfocitos B /linfoma 6	0,984695	0,0004
213823_at	HOXA11	homeocaja A11	0,974615	0,0036

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS+ATA frente a VHS	Valor de p para la estimación de VHS+ATA frente a VHS
1552275_s_at	PXK	serina/treonina cinasa que contiene dominio PX	0,973552	0,0002
52731_at	AMBRA1	autofagia/regulador 1 de beclin-1	0,970744	0,000027
238624_at	---	---	0,970064	0,0005
210479_s_at	RORA	receptor A huérfano relacionado con RAR	0,965295	0,0006
220941_s_at	C21orf91	marco de lectura abierto 91 del cromosoma 21	0,943651	0,0013
203234_at	UPP1	uridina fosforilasa 1	0,932337	0,0009
202102_s_at	BRD4	4 que contiene bromodominio	0,930432	0,0034
217775_s_at	RDH11	retinol deshidrogenasa 11 (all-trans/9-cis/11-cis)	0,92863	0,0029

Tabla 2. Lista de genes de la Agrupación A: Genes regulados por incremento por VHS y regulados por disminución por VHS+ATA

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS1_ATA frente_ VHS1	Valor de p para la estimación de VHS1_ATA frente_ VHS1
243160_at	---	---	-1,01645	0,0022
205247_at	NOTCH4	homólogo 4 de Notch (Drosophila)	-0,93759	0,0007
219256_s_at	SH3TC1	repeticiones 1 de dominio SH3 y tetratricopéptido	-0,91997	0,0021
221631_at	CACNA1I	canal de calcio, dependiente de voltaje, tipo T, subunidad alfa 1I	-0,90394	0,0018
1569961_at	---	---	-0,89195	0,0013
220277_at	CXXC4	dedo 4 de CXXC	-0,85343	0,0054
229611_at	LMLN	similar a leishmanolisina (familia de metalopeptidasa M8)	-0,85329	0,0005
232341_x_at	HABP4	proteína 4 de unión a hialurona	-0,84077	0,0071
242219_at	---	---	-0,83521	0,0028
233767_at	HHLA1	1 que se asocia a HERV-H LTR	-0,8339	0,0017
236925_at	LOC728288	LOC728288 hipotética	-0,81812	0,008
231905_at	C20orf96	marco de lectura abierto 96 del cromosoma 20	-0,80575	0,0041
233313_at	---	---	-0,80466	0,0011

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS1_ATA_frente_VHS1	Valor de p para la estimación de VHS1_ATA_frente_VHS1
1563507_at	---	---	-0,79441	0,0043
232456_at	C10orf71	marco de lectura abierto 71 del cromosoma 10	-0,78722	0,0067
203468_at	CDK10	cinasa 10 dependiente de ciclina	-0,77888	0,0035
237456_at	---	---	-0,77558	0,0085
216127_at	PDIA2	familia A de la proteína disulfuro isomerasa, miembro 2	-0,76924	0,0049
207977_s_at	DPT	dermatopontina	-0,76077	0,0065
224510_s_at	CLPB	homólogo de peptidasa B caseinolítica de ClpB (E. coli)	-0,75625	0,006
208267_at	TRPV5	canal de cationes de potencial de receptor transitorio, subfamilia V, miembro 5	-0,73228	0,0091
221868_at	PAIP2B	proteína 2B que interacciona con la proteína de unión a poli(A)	-0,7284	1,10E-06
1559439_s_at	C21orf58	marco de lectura abierto 58 del cromosoma 21	-0,7256	0,0051
1552960_at	LRRC15	15 que contiene repetición rica en leucina	-0,72214	0,0049
204413_at	TRAF2	factor 2 asociado al receptor de TNF	-0,69678	0,0039
213888_s_at	TRAF3IP3	proteína 3 de interacción con TRAF3	-0,69063	0,0043
1553945_at	GPHB5	hormona beta 5 de glucoproteína	-0,67838	0,0003
221312_at	GLP2R	receptor de péptido 2 similar a glucagón	-0,67682	0,0097
1554783_s_at	ARHGEF2	factor 2 de intercambio del nucleótido guanina Rho/Rac (GEF)	-0,67352	0,0005
205567_at	CHST1	sulfotransferasa 1 de hidrato de carbono (sulfato de queratán Gal-6)	-0,67335	0,0009
232473_at	PRPF18	homólogo del factor 18 de procesamiento de pre-ARNm PRP18 (S. cerevisiae)	-0,66869	0,0064
1565583_at	LOC100291336	Proteína hipotética LOC100291336	-0,66137	0,0086
243638_at	---	---	-0,65654	0,0041

ES 2 651 763 T3

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS1_ATA_frente_VHS1	Valor de p para la estimación de VHS1_ATA_frente_VHS1
208608_s_at	SNTB1	sintrofina, beta 1 (proteína A1 asociada a distrofina, 59 kDa, componente 1 básico)	-0,65372	0,005
1556202_at	SRGAP2	proteína 2 activante de Rho GTPasa SLIT-ROBO	-0,64525	0,0034
206266_at	GPLD1	fosfolipasa D1 específica de glucosilfosfatidilinositol	-0,64321	0,0015
234659_at	---	---	-0,63414	0,007
204708_at	MAPK4	proteína cinasa 4 activada por mitógeno	-0,633	0,0045
236604_at	BAHCC1	1 que contiene dominio de BAH y superenrollado	-0,63262	0,0083
242129_at	SIN3B	homólogo B de SIN3, regulador de la transcripción (levadura)	-0,63025	0,0018
233029_at	OBSCN	obscurina, calmodulina citoesquelética y RhoGEF que interacciona con titina	-0,62959	0,0049
203398_s_at	GALNT3	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)	-0,62709	0,0016
242701_at	TBRG1	regulador 1 del factor de crecimiento transformante beta	-0,62074	0,0032
235083_at	LOC151009	LOC151009 hipotética	-0,61926	0,004
206372_at	MYF6	factor 6 miogénico (herculina)	-0,6146	0,0018
1567611_at	---	---	-0,61369	0,0061
236252_at	---	---	-0,61329	0,0041
206286_s_at	TDGF1 TDGF3	factor de crecimiento 1 derivado de teratocarcinoma // factor de crecimiento 3 derivado de teratocarcinoma, pseudogén	-0,61123	0,0012
1563263_at	PLCG2	Fosfolipasa C, gamma 2 (fosfatidilinositol-específica)	-0,60753	0,0003
214742_at	AZI1	1 inducida por 5-azacitidina	-0,60464	0,0089
244656_at	RASL10B	similar a RAS, familia 10, miembro B	-0,6032	0,0072
1555665_at	---	---	-0,59953	0,0088
224291_at	CACNG6	canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad 6 gamma	-0,59548	0,0068
235616_at	TSHZ2	homeocaja 2 de dedos de cinc teashirt	-0,59219	0,0037

Sonda_Conjunto_ID	Símbolo del gen	Título del gen	Estimación de de VHS1_ATA_frente_VHS1	Valor de p para la estimación de VHS1_ATA_frente_VHS1
237461_at	NLRP7	familia de NLR, 7 que contiene dominio de pirina	-0,58969	0,0068
223693_s_at	RADIL	dominios de asociación a Ras y DIL	-0,58969	0,0052
208454_s_at	PGCP	glutamato carboxipeptidasa de plasma	-0,58916	0,001
216426_at	TCEB1	factor B de elongación de la transcripción (Sill), polipéptido 1 (15 kDa, elongina C)	-0,58852	0,002

Tabla 3A. Reducción de la expresión de nNOS, iNOS y eNOS en muestras de VHS+ATA analizadas por Affymetrix Gen Array; NOS1=nNOS, NOS2=iNOS, NOS3=eNOS

Sonda_Conjunto_ID	Pub_ID	Símbolo	ATA	VHS	VHS + ATA	p-Val ATA	p-Val VHS	p-Val VHS+ATA
240911_at	AI733341	NOS1	1,02	1,71	1,5	0,872	0,009	0,024
207310_s_at	U31466	NOS1	1	2,79	1,67	0,981	0,003	0,033
AF049656	---	NOS2	-1,03	2,05	1,72	0,706	0,002	0,007
205581_s_at	NM_000603	NOS3	1,24	2,45	1,94	0,234	0,005	0,013

5 **Tabla 3B. Reducción de la expresión de iNOS en muestras de VHS+ATA analizadas por Jak-Sta TA-PCR Microarray de SABiosciences (QIAGEN)**

Catálogo de RT2	Pub_ID	Símbolo	ATA	VHS	VHS + ATA	p-Val ATA	p-Val VHS	p-Val VHS+ATA
240911_at	AI733341	NOS1	1,02	1,71	1,5	0,872	0,009	0,024

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de virus del herpes, método que comprende cultivar dicho virus del herpes en un cultivo celular que comprende ácido aurintricarboxílico y suero, en el que el ácido aurintricarboxílico está presente en una cantidad que aumenta el rendimiento del virus del herpes.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho virus del herpes es un virus del herpes simple-1 (VHS-1).
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho VHS-1 es un VHS-1 no mutado.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho VHS-1 es un vector de VHS-1 recombinante.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho vector de VHS-1 recombinante es un vector de d27.1 de VHS-1.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho virus se cultiva en células 293, o Vero.
- 10 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho virus se cultiva en células V27.
8. Un método de cultivo de un vector de d27.1 de VHS-1 que comprende:
 - (a) infectar células V27 con un vector de d27.1 de VHS-1; y
 - (b) cultivar dichas células V27 infectadas en un cultivo celular que comprende ácido aurintricarboxílico, ácido valproico o dexametasona en una cantidad que aumenta el título viral de d27.1 de VHS-1 y que comprende además suero.
- 15 9. El método de la reivindicación 8, en el que el cultivo celular comprende ácido aurintricarboxílico.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el suero es suero bovino fetal.
11. Uso de ácido aurintricarboxílico para aumentar el rendimiento de virus del herpes producido en cultivo celular, en el que dicho cultivo celular comprende además suero, y en el que: dicho virus del herpes se cultiva en células Vero o células 293.
- 20 12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicho cultivo celular comprende células Vero.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que dichas células Vero son células V27.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho virus es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.
- 25 15. Un cultivo celular que comprende ácido aurintricarboxílico, suero, un virus del herpes y células 293, o Vero, en el que el ácido aurintricarboxílico está presente en una cantidad que aumenta el rendimiento del virus del herpes producido en dicho cultivo celular.
16. El cultivo celular de la reivindicación 15 que comprende células V27.
- 30 17. El cultivo celular de la reivindicación 15 o 16, en el que dicho virus del herpes es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.

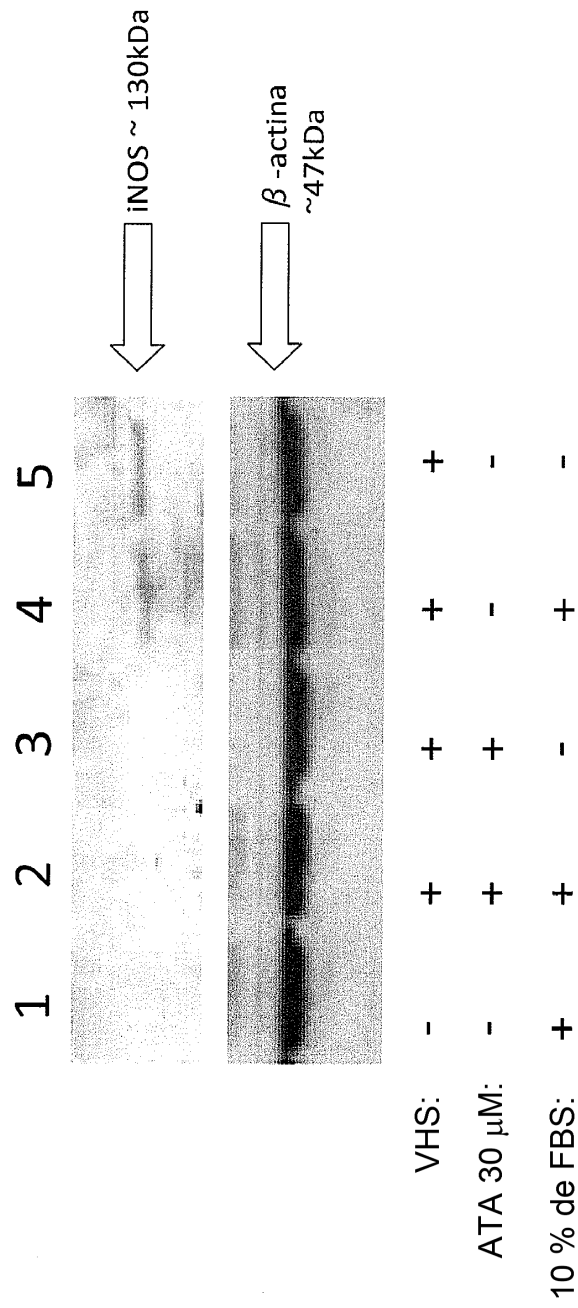


Fig. 1

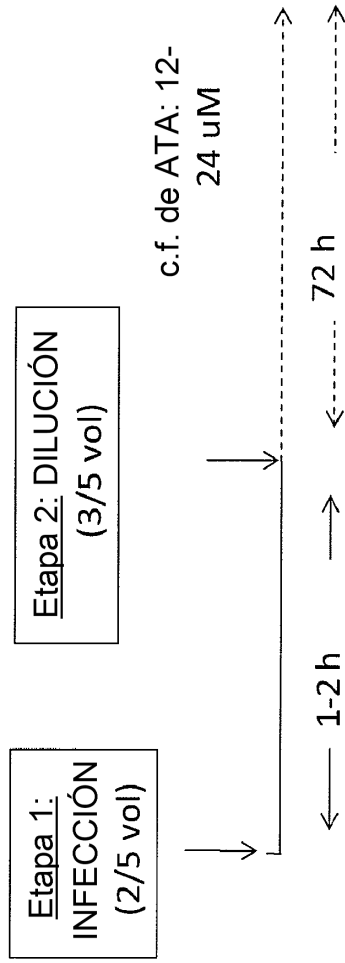


Fig. 2A

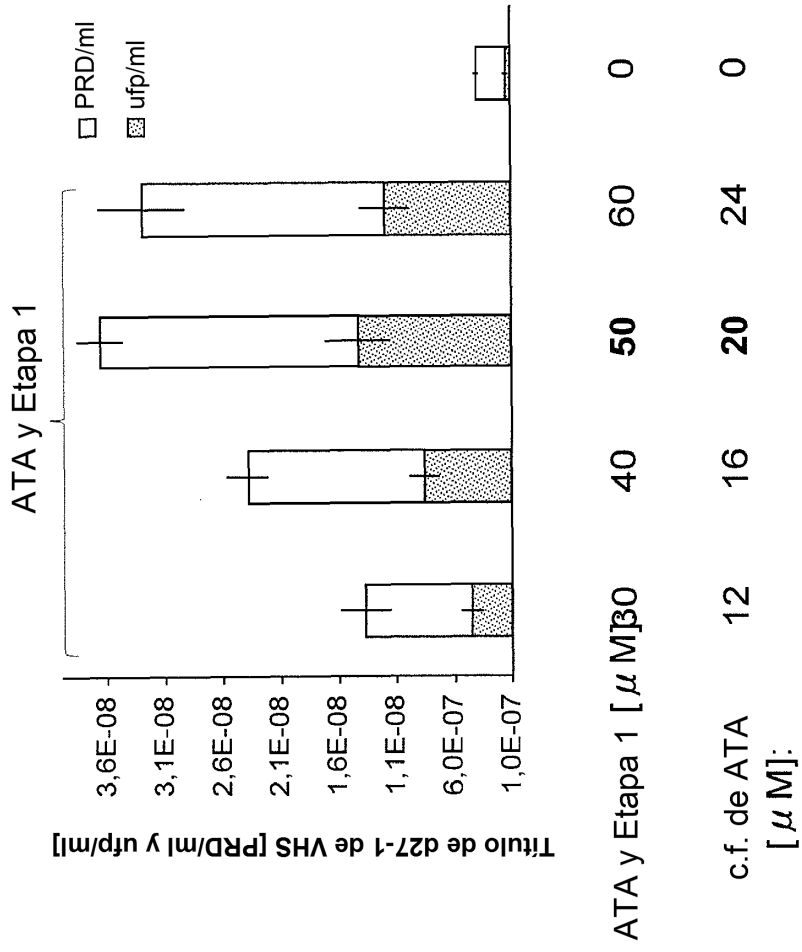


Fig. 2B

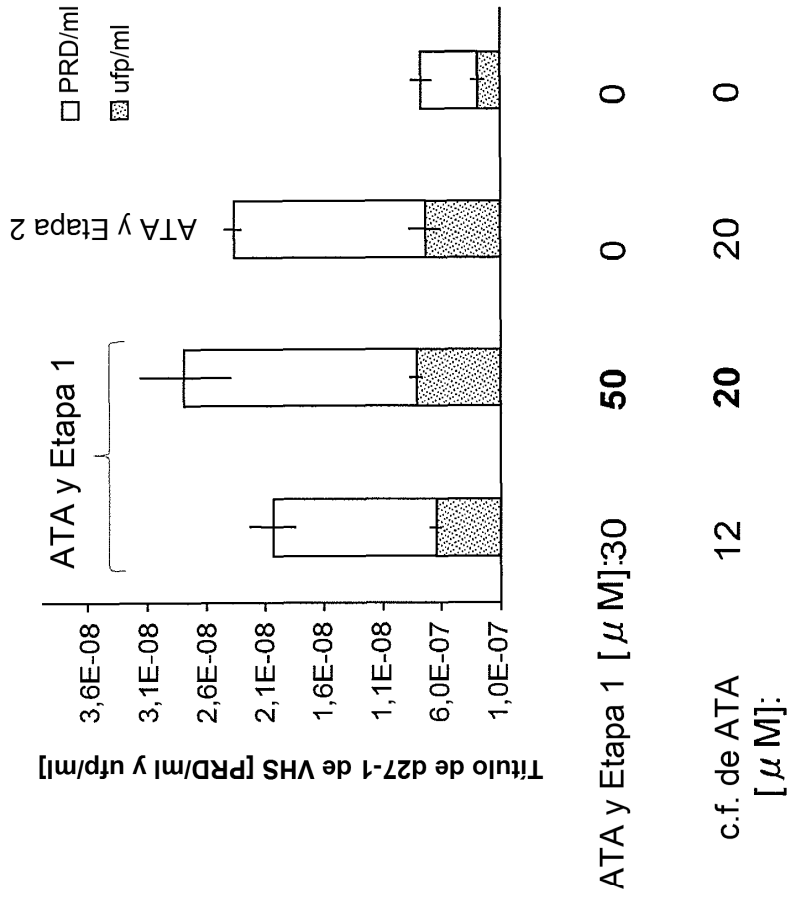


Fig. 2C

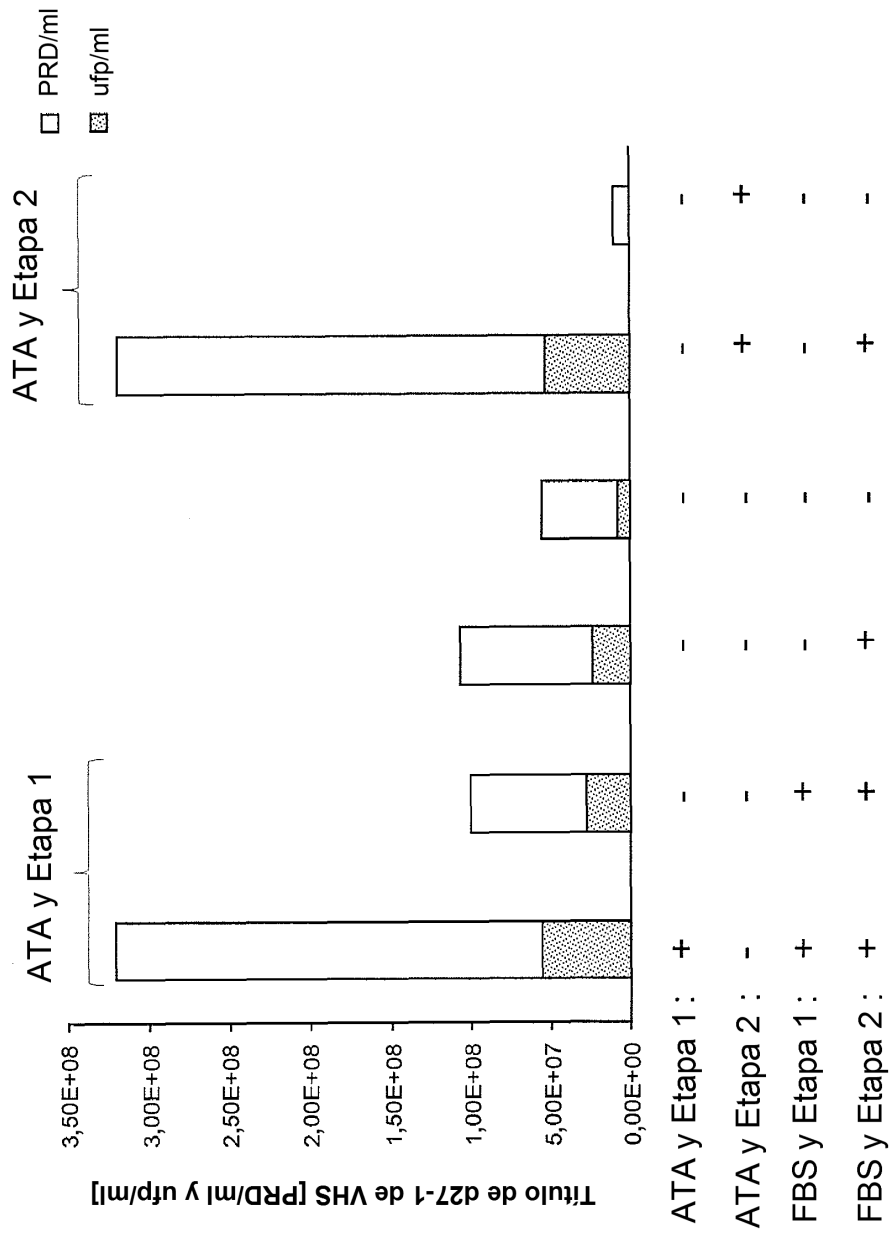


Fig. 3

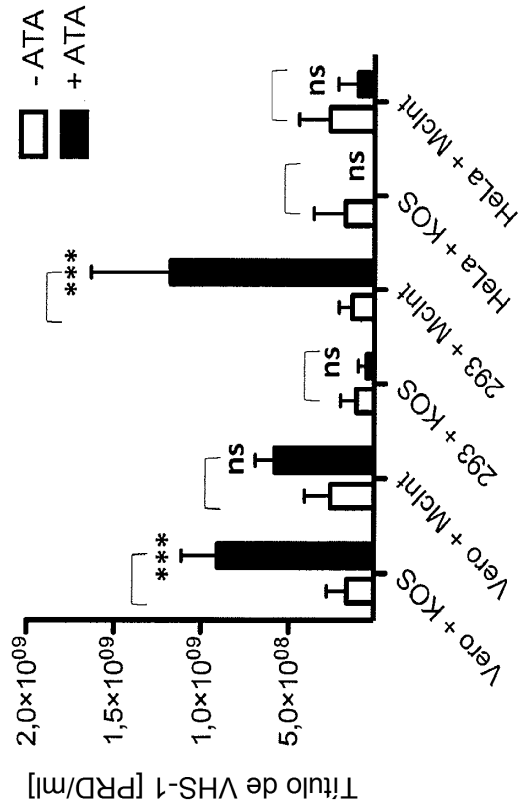
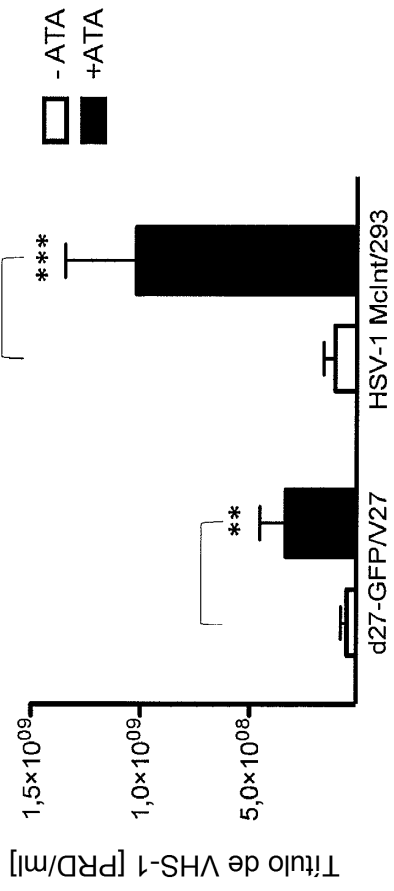


Fig. 4A



Vector de VHS-1 / células	Control: - ATA [PRD/ml]	+ATA [PRD/ml]	Relación
d27-GFP / células V27	$(5,4 \pm 2,7) \times 10^7$	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8$	6,1 x
McIntyre de VHS-1 wt / células 293	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^8$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	9,1 x

Fig. 4B

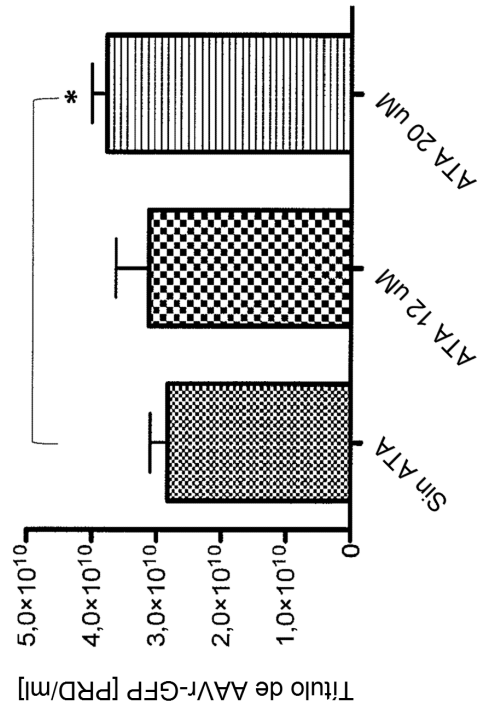
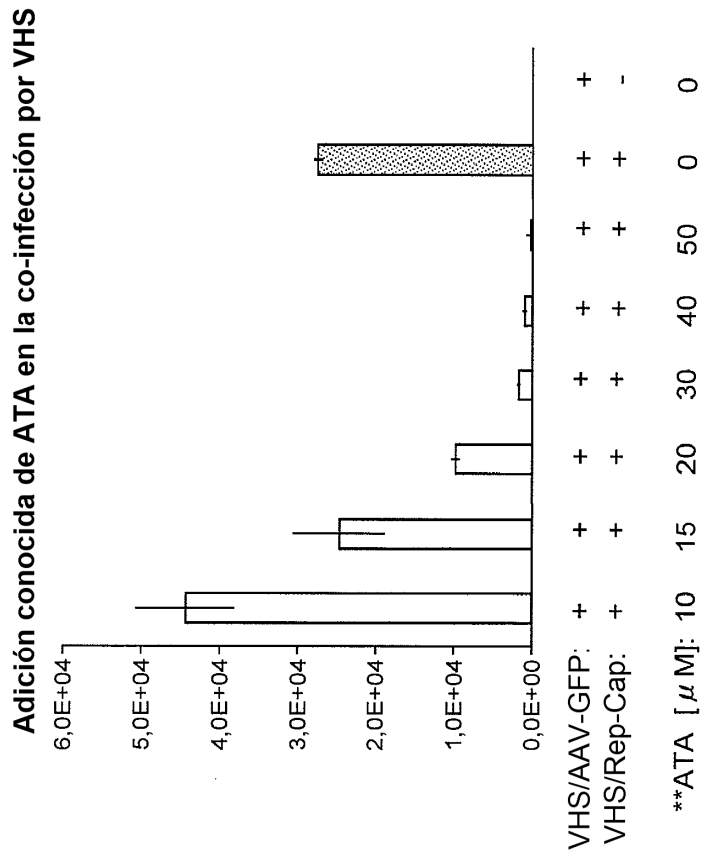


Fig. 5A



**ATA: Concentración de ATA en células 293 durante 2 h de co-infección por VHS.

Fig. 5B

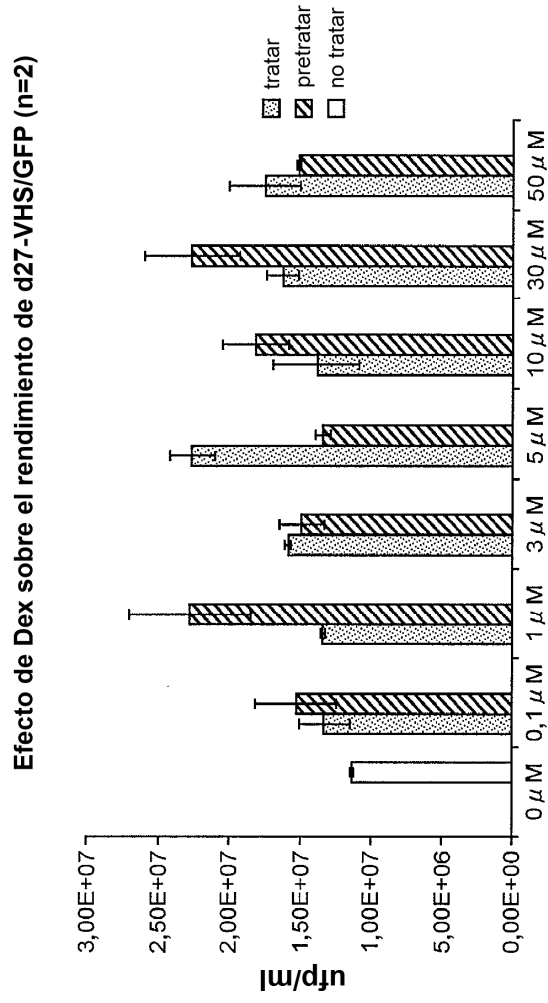


Fig. 6

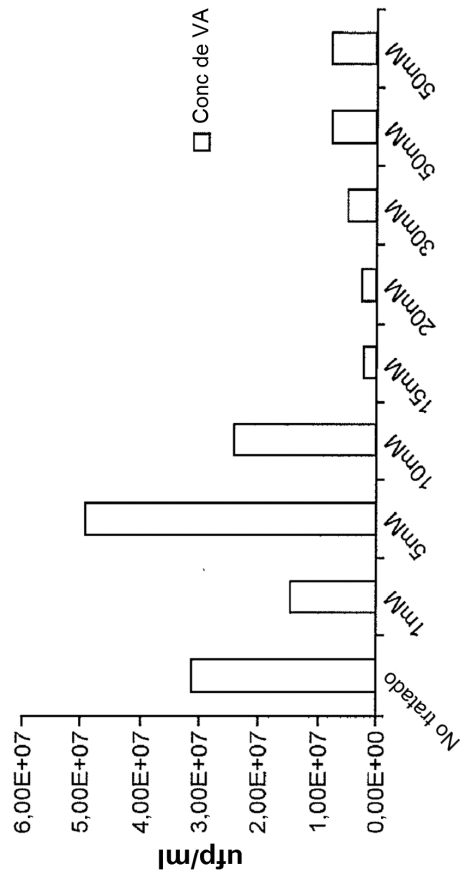


Fig. 7