

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 004**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6876** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2013 PCT/IB2013/002085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2013 E 13786307 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2877601**

54 Título: **Método para detectar o medir el impacto de una composición de vector vírico en células eucariotas y sus biomarcadores utilizados**

30 Prioridad:

**26.07.2012 US 201261676098 P**

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

**05.02.2020**

73 Titular/es:

**FLASH THERAPEUTICS (100.0%)  
3, rue des Satellites, Canal Biotech 2  
31400 Toulouse , FR**

72 Inventor/es:

**BOUILLÉ, PASCALE;  
GAYON, RÉGIS y  
ICHÉ, ALEXANDRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 740 004 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para detectar o medir el impacto de una composición de vector vírico en células eucariotas y sus biomarcadores utilizados

5 La invención se refiere, en general, al campo de la terapia génica mediada por vectores víricos y expresión génica recombinante. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos y a composiciones que utilizan un panel particular de productos génicos ("biomarcadores") y sus patrones de expresión diferencial ("firmas de expresión"), en donde los patrones de expresión se correlacionan con el impacto que una composición de vector vírico puede tener en cualquier célula diana dada, en particular en cualquier célula eucariota dada. La invención se basa en la identificación de un conjunto específico de biomarcadores que se expresan diferencialmente en células transducidas con vectores víricos y que son útiles para predecir la calidad, es decir, la pureza y/o la concentración, de una composición de vector vírico. El panel génico también es útil para diseñar modalidades adyuvantes específicas con una eficacia terapéutica mejorada.

15 Los vectores basados en virus son una herramienta comúnmente utilizada para suministrar material genético a las células. Originariamente, dichos vectores se desarrollaron como una alternativa a la transfección de ADN desnudo para experimentos de genética molecular y para usos terapéuticos tales como terapia génica o vacunas. Los vectores víricos se incluyen en dos categorías principales: vectores integradores, que por sí solos se insertan en el genoma receptor, y vectores no integradores, que suelen formar un elemento genético extracromosómico. Los vectores integradores, tales como los vectores gamma retrovíricos (RV) y los vectores lentivíricos (VL) se heredan de forma estable. Los vectores no integradores, tales como los vectores adenovíricos (VAD) y los vectores de virus adenoasociados (VAA) se pierden rápidamente de las células que se dividen rápidamente.

25 En particular, los vectores retrovíricos proceden de virus que pertenecen a la familia *Retroviridae* que comprende virus de ARN envueltos con una estructura macromolecular compleja que tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 150 nm (Salmeen et al. 1975). Debido al gran tamaño, las partículas víricas tienen una baja difusividad ( $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s); su densidad es de aproximadamente 1,15-1,16 g/cm<sup>3</sup> según lo determinado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Coffin et al. 1997). Se componen de 60-70 % de proteínas, 30-40 % de lípidos (derivados de la membrana plasmática de las células productoras), 2-4 % de hidratos de carbono y 1 % de ARN (Andreadis et al. 1999). Las partículas retrovíricas constan de dos copias idénticas de ARN monocatenario de sentido positivo, y de enzimas integrasas y transcriptasas inversas, contenidas en una cápside proteica rodeada por una membrana de bicapa lipídica. La bicapa lipídica está salpicada de proyecciones glucoproteicas. Los vectores retrovíricos son partículas cargadas negativamente en un amplio intervalo de pH ya que su punto isoeléctrico se produce a valores de pH muy bajos. Las proteínas de la envoltura y la bicapa lipídica son probablemente los principales contribuyentes a la carga negativa en la superficie del virus (Rimai et al. 1975).

40 El uso de vectores basados en virus se ha convertido en un método de suministro crucial para aplicaciones *in vitro* en el descubrimiento de fármacos, en ensayos clínicos *in vivo* y *ex vivo*, en el desarrollo de terapia génica y de modelos animales. Los vectores lentivíricos, tales como los vectores procedentes del VIH, son actualmente las herramientas preferidas para la transferencia de genes, tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a su capacidad para transducir células inmortalizadas o células primarias, tanto células en reposo como en proliferación, y a la integración estable resultante del transgén en el genoma. Estas ventajas los convierten no solo en una herramienta valiosa en el contexto terapéutico, así como en genómica funcional, sino también para la producción de moléculas de interés de uso en seres humanos. El beneficio de dichos vectores para su uso en terapia génica, se ha confirmado gracias el reciente éxito obtenido en el tratamiento de la adrenoleucodistrofia (N. Cartier, S. Hacein-Bey-Abina, et al. 2009) o de la  $\beta$ -talasemia humana (Marina Cavazzana-Calvo et al. 2010).

50 La investigación actual en medicina regenerativa también utiliza vectores basados en virus, especialmente para la producción y diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (iPS, siglas del inglés *induced pluripotent stem cells*) (Sommer et al. 2009). Aunque es posible reprogramar células somáticas en iPS utilizando composiciones de vectores en bruto (Takahashi K. y Yamanaka S. 2006), el uso de composiciones de vectores purificados y concentrados para la reprogramación conduce a un mayor aumento en los rendimientos y en la supervivencia y calidad clonales (Vallier et al. 2009). Por otra parte, los vectores basados en virus se utilizan habitualmente para generar modelos celulares como parte de la validación de dianas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos y la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos. En este contexto, es esencial caracterizar con precisión los cambios inducidos en las células transducidas por los vectores basados en virus. Como demuestran Banito A et al. (2009), la manipulación celular como la reprogramación celular puede ser lenta y estocástica, lo que sugiere la existencia de barreras que limitan su eficacia o estabilidad. En el presente documento identifican la senescencia como una de dichas barreras y muestran que la ablación de diferentes efectores de senescencia mejora la eficacia de la reprogramación. Para ese fin, los vectores purificados permiten evitar cualquier impacto negativo de las composiciones de vectores basados en virus, sobre células diana.

65 Las respuestas celulares generadas después de infección con VIH han sido muy estudiadas, incluyendo los cambios transcripcionales causados por el virus en células inmunitarias (Giri et al. 2006). En cambio, hay pocos estudios sobre los cambios transcripcionales causados por vectores lentivíricos procedentes del VIH. Los estudios realizados

hasta ahora se han centrado en el impacto de ciertos estadios de transducción, tal como la integración en el genoma de la célula transducida. Algunos estudios, es decir, Zhao et al. 2004 y Mitchell et al. 2003, han caracterizado los cambios globales en el perfil de expresión inducidos en respuesta a un vector lentivírico. Sin embargo, todos estos estudios se centran en condiciones específicas (tipo de célula específica del transgén) que no permiten extraer una conclusión general. Particularmente, no se ha realizado ningún estudio sobre el impacto global y la toxicidad de los vectores víricos, tales como los vectores lentivíricos y las consecuencias de los parámetros del proceso de producción, tales como la concentración y purificación de la composición del vector de virus, sobre el perfil de transcripción de las células transducidas.

Como factores que influyen en la elección de un vector particular se incluyen, su capacidad de empaquetamiento, su intervalo de hospedadores, su perfil de expresión génica, su eficacia de transducción y su capacidad para suscitar respuestas inmunitarias, lo cual es particularmente problemático si se necesitan administraciones o transducciones repetidas. Algunos de estos parámetros pueden ajustarse o controlarse. Un parámetro de importancia particular es el uso de vectores extremadamente concentrados y extremadamente purificados que permiten una transducción celular eficaz y que impiden que se produzcan respuestas celulares específicas debido a impurezas en las composiciones de vectores víricos. El desarrollo de la terapia génica, los ensayos clínicos *in vivo* y *ex vivo*, y las aplicaciones de descubrimiento de fármacos, resaltan la necesidad de tener herramientas para medir o detectar el efecto de una composición de vector vírico en células eucariotas y también para aumentar la seguridad asociada a la producción de proteínas para uso en seres humanos utilizando dichos vectores víricos.

Hasta ahora, la cuestión de la toxicidad asociada al uso de composiciones de vectores víricos no se ha explorado ni resuelto a nivel mundial. La presente invención está relacionada con la caracterización y selección de firmas transcripcionales, denominadas biomarcadores, en relación con posibles efectos nocivos en las células después de la transducción con las composiciones de vectores víricos. La presente invención desvela ensayos diseñados para caracterizar la seguridad y la calidad de las composiciones de vectores víricos obtenidas mediante cualquier proceso, así como de células modificadas genéticamente transducidas con dichas composiciones de vectores víricos. La identificación y modulación de genes que influyen o interfieren con la eficacia de la transducción, lo que podría afectar al nivel de expresión del transgén, puede dirigirse para optimizar el proceso de transducción.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para la caracterización de cambios celulares globales en respuesta a la introducción de composiciones de vectores víricos en células diana y, en particular, en células eucariotas. El propio vector vírico puede inducir dichos cambios globales o pueden ser el resultado del entorno en el que se encuentra el vector vírico, tal como el nivel de pureza o concentración de las composiciones de vectores víricos. Como se describe con detalle más adelante, los métodos y las composiciones de la invención utilizan un panel particular de productos génicos ("biomarcadores") y sus patrones de expresión diferencial ("firmas de expresión"), en donde los patrones de expresión se correlacionan con la calidad del impacto de la composición del vector vírico en cualquier célula eucariota transducida dada.

La presente invención proporciona un método para medir o detectar el efecto de una composición de vector vírico en células eucariotas detectando perfiles de expresión génica modificados y explorando modificaciones en el nivel de expresión de al menos un biomarcador en dichas células cultivadas.

La presente divulgación se refiere a métodos y a composiciones que utilizan un panel particular de biomarcadores y sus firmas de expresión, en donde las firmas de expresión se correlacionan con el efecto que puede tener una composición de vector vírico en cualquier célula diana dada, en particular una célula eucariota. La invención se basa en la identificación de un conjunto específico de biomarcadores que se expresan diferencialmente en células eucariotas transducidas con vectores víricos y que son útiles para predecir la calidad de la composición del vector vírico. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para predecir la respuesta celular en células transducidas con una composición de vector vírico. Específicamente, se proporciona un método para detectar una respuesta celular en células diana, en particular en células eucariotas en contacto con una composición de vector vírico que comprende (i) medir el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en una célula eucariota que no se ha puesto en contacto con una composición de vector vírico; (ii) medir el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en una célula eucariota después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico; y (iii) comparar la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (i) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (ii) donde un cambio en el nivel de expresión del biomarcador entre las etapas (i) y (ii) indica una respuesta celular y donde dicha respuesta celular se correlaciona con la calidad de la composición del vector vírico. En la etapa (iii), el cambio en la expresión puede ser un aumento o una disminución en la expresión del biomarcador. En una realización específica, el cambio en el nivel de expresión del biomarcador entre las etapas (i) y (ii) se establece a un valor absoluto mínimo de FC de 1,3 (factor de cambio  $\geq 1,3$ ) en la expresión, ya sea un aumento de 1,3 veces en la expresión o una disminución de 1,3 en la expresión. El valor FC se correlaciona con la calidad (concentración/purificación) de la composición del vector vírico y con las condiciones de transducción, en particular con la MDI (multiplicidad de infección).

La correlación identificada entre la expresión del biomarcador y la transducción del vector vírico proporciona un método para determinar la calidad de la composición del vector vírico. Los métodos de la invención se basan en la medición del nivel de expresión de uno o más transcritos de ARN predictivos o de sus productos de expresión en

una célula transducida en donde el transcrito de ARN predictivo o su producto es el transcrito o producto de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en los genes de las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

5 En una realización de la presente invención, se evalúa el impacto de una composición de vector vírico sobre células diana, en particular células eucariotas transducidas con una composición de vector vírico. En una realización específica de la presente invención, las células cultivadas son transducidas por vectores lentivíricos. En otra realización de la invención, las células eucariotas son células inmortalizadas, primarias o madre.

10 En una realización de la presente divulgación, se mide el nivel de expresión de un biomarcador implicado en procesos biológicos de senescencia. En una realización descrita preferida, el biomarcador implicado en la senescencia es un miembro de la familia de SASP. En una realización descrita más preferida, el gen de senescencia es uno o más genes seleccionados de la Tabla 7.

15 En otra realización de la presente invención, se mide el nivel de expresión de un biomarcador implicado en el ciclo celular. En una realización descrita preferida, el biomarcador de ciclo celular es uno o más genes seleccionados de las Tablas 2, 3 y 4.

20 En otra realización de la presente divulgación, se mide el nivel de expresión de un biomarcador seleccionado de la Tabla 8.

25 En otra realización de la presente invención, la invención proporciona adicionalmente un método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células diana, que comprende medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y/o de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AU- RKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

30 En una realización particular, la presente invención proporciona un método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células eucariotas inmortalizadas que comprende:

- (a) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico;
- 35 (b) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico a alta multiplicidad de infección (MDI); y
- (c) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (b) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (a) en donde una regulación positiva significativa en el nivel de expresión del biomarcador en
- 40 la etapa (b) en comparación con la etapa (a) indica que la calidad de la composición de vector vírico es insuficiente.

Más particularmente, una regulación positiva significativa a alta MDI es una regulación positiva dos veces mayor en comparación con la etapa (a).

45 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa de:

- (d) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico;
- 50 (e) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico; y
- (f) comparar dicha expresión de biomarcador(es) en la etapa (e) con la expresión de biomarcador(es) en la etapa (d) en donde una regulación negativa significativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en
- 55 comparación con la etapa (d) indica que la calidad de la composición del vector vírico es insuficiente.

Más particularmente, una regulación negativa significativa a una MDI óptima es una regulación negativa de 1,5 veces en comparación con la etapa (d).

60 Como alternativa, cabe señalar que, las etapas (d), (e) y (f) pueden realizarse antes o de manera simultánea con las etapas (a), (b) y (c).

El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa de:

- 65 (g) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de

vector vírico de control; y

(h) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (g) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (a), en donde no va a detectarse ninguna expresión diferencial significativa en el biomarcador(es) en la etapa (g) en comparación con la etapa (a).

5 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa de:

(j) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico de control; y

(k) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (j) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (d), en donde va a detectarse una posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d).

15 Más particularmente, la posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d) es al menos 1,5 veces menor que la regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en comparación con la etapa (d) a alta MDI.

20 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente de antemano una etapa de titulación de la composición de vector vírico y de la composición de vector vírico de control.

25 Ventajosamente, en el método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células diana, las mediciones del nivel de expresión del biomarcador se realizan antes de que las células alcancen la confluencia.

Preferentemente, las células diana son células eucariotas y se transducen mediante una composición de vector lentivírico.

30 La invención también proporciona kits para medir el nivel de expresión de biomarcadores en una muestra de células transducidas. Los kits pueden incluir uno o más reactivos correspondientes a los biomarcadores descritos en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores, proteínas recombinantes que se unen a anticuerpos específicos de biomarcadores, sondas o cebadores de ácido nucleico que se hibridan con los biomarcadores, etc. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una pluralidad de reactivos, por ejemplo, en una matriz, correspondiente a los biomarcadores descritos en este documento. Los kits pueden incluir reactivos de detección, por ejemplo, reactivos que están marcados de manera detectable. Los kits pueden incluir instrucciones escritas para el uso del kit para predecir la calidad de una composición de vector vírico, y pueden incluir otros reactivos e información tales como patrones de control o referencia, soluciones de lavado, programas informáticos de análisis, etc.

40 El kit de la invención comprende uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG.

45 Dicho kit comprende adicionalmente uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AU- RKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

Adicionalmente, dicho kit también comprende una composición de vector vírico de control.

50 La presente divulgación proporciona adicionalmente un biochip que consiste en al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AU- RKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK opcionalmente con un gen ubicuo.

55 La presente divulgación proporciona adicionalmente una placa de RT-qPCR que comprende cebadores de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y cebadores de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

60 La presente divulgación se refiere además a una composición de biomarcadores útil para la medición o detección del efecto de una composición de vector vírico en células eucariotas para determinar la calidad de dichas composiciones. En una realización preferida de la presente divulgación, la composición de biomarcadores útil para la medición o detección del efecto de una composición de vector vírico en células eucariotas comprende al menos uno de los productos seleccionados entre los genes o los polipéptidos presentes en las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En una realización más preferida, la composición de biomarcadores comprende al menos uno de los productos seleccionados entre los genes o los polipéptidos presentes en las Tablas 3, 4, 7 y 8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un conjunto específico de biomarcadores que se expresan diferencialmente en células transducidas con vectores víricos. Dichos biomarcadores, como se describe con detalle más adelante, pueden utilizarse en métodos diseñados para predecir la calidad de las composiciones de vectores víricos.

En la presente solicitud, los términos se emplean con su significado habitual, excepto cuando se indique lo contrario.

*Definiciones*

La expresión "composición de vector vírico" se refiere a cualquier composición derivada de virus obtenida de, pero sin limitación, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y de todas las composiciones que contienen vectores víricos de los mismos. En una realización preferida de la invención, las composiciones de vectores víricos se basan en virus que pertenecen a la familia *Retroviridae* que comprenden virus de ARN con envoltura, que incluyen, por ejemplo, vectores lentivíricos (VL) y gamma retrovíricos (RV). Las composiciones de vectores víricos pueden producirse utilizando cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. En una realización específica de la invención, las composiciones de vectores víricos a ensayar utilizando los métodos de la presente invención, pueden obtenerse mediante procedimientos tales como los descritos en las Figuras 1A, 1B y 1C.

La expresión 'medir o detectar el impacto de una composición de vector vírico' significa evaluar la expresión de un biomarcador después de poner en contacto una célula diana o una célula eucariota con una composición de vector vírico.

Las expresiones "biomarcador" o "marcador biológico" significan un indicador de un estado biológico. Se trata de una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Como se usa en este documento, un "biomarcador" es un indicador molecular de una propiedad biológica específica y como se usa en este documento es una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un gen o fragmento génico) o un producto de expresión del mismo (por ejemplo, un ARN, microRNA, un polipéptido o fragmento peptídico o variante del mismo) cuya expresión diferencial (presencia, ausencia, sobreexpresión o infraexpresión en relación con una referencia) dentro de una célula, predice la calidad de una composición de vector vírico. Un "producto de expresión", como se usa en este documento, es una molécula de ARN de sentido o de antisentido (por ejemplo, un ARNm), o un polipéptido traducido que corresponde a, o que procede de, una secuencia de polinucleótidos. Un "panel" de biomarcadores es una selección de dos o más combinaciones de biomarcadores.

Los biomarcadores para caracterizar una composición de vector vírico incluyen los enumerados en las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 y 8. Dichos marcadores incluyen genes que se encuentran regulados por la transducción de composiciones de vectores víricos en una célula. Uno o más de estos biomarcadores, o hasta todos los biomarcadores, pueden utilizarse juntos en cualquier combinación en los métodos de acuerdo con la presente divulgación.

Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido" pretenden incluir moléculas de ADN, tales como ADNc o ADN genómico, y moléculas de ARN, tales como ARNm o cualquier fragmento de ADN o ARN de interés. Estos términos se refieren a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros, ya sea en forma de cadena sencilla (monocatenaria) o doble (bicatenaria), incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. Este término abarca moléculas de ácido nucleico de origen tanto natural como sintético, así como moléculas de configuración lineal, circular o ramificada que representa la cadena de sentido o de antisentido, o ambas, de una molécula de ácido nucleico originaria. Se entiende que dichos ácidos nucleicos pueden estar no purificados, purificados, o unidos, por ejemplo, a un material sintético tal como una perla o matriz de columnas. El término también abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos naturales. A menos que se indique de otro modo, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), polimorfismos, alelos, y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. El término ácido nucleico se utiliza indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen o un fragmento del mismo que se selecciona como funcionalmente equivalente a la molécula completa.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden biomarcadores, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico y sus productos de expresión, o medios para detectar dichos biomarcadores, donde se encuentra que los biomarcadores se expresan diferencialmente en células transducidas con vectores víricos en comparación con células no transducidas.

Los expertos en la materia conocen secuencias de ácido nucleico que codifican los biomarcadores de la invención y están disponibles al público (por ejemplo, son accesibles en el Genbank). Como se describe con detalle más adelante, dichas secuencias de ácido nucleico pueden utilizarse para diseñar sondas o cebadores para su uso en ensayos para medir los niveles de expresión de biomarcadores en una célula transducida.

Los biomarcadores de acuerdo con la divulgación incluyen homólogos y variantes sustancialmente idénticos de las moléculas de ácido nucleico y sus productos de expresión descritos en el presente documento, por ejemplo, una molécula que incluye secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos funcionalmente equivalentes a los biomarcadores de la invención, por ejemplo, secuencias que tienen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas o variantes de corte y empalme o variantes de especies o moléculas que difieren de las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos a los que se hace referencia en las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 u 8 de este documento debido a la degeneración del código genético.

Otros ácidos nucleicos para su uso en la práctica de la invención, incluyen aquellos que tienen suficiente homología con los descritos en el presente documento para detectar la expresión utilizando técnicas de hibridación. Dichos polinucleótidos tienen, preferentemente, aproximadamente o 95 %, aproximadamente o 96 %, aproximadamente o 97 %, aproximadamente o 98%, o aproximadamente o 99 % de identidad con las secuencias de biomarcadores como se describe en este documento. Los otros polinucleótidos para su uso en la práctica de la invención también pueden describirse en función de la capacidad de hibridarse con polinucleótidos de la invención en condiciones rigurosas de aproximadamente 30 % v/v a aproximadamente 50 % de formamida y de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,15 M de sal para hibridación y de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,15 M de sal para condiciones de lavado a una temperatura de aproximadamente 55 a aproximadamente 65 °C, o superior, o condiciones equivalentes a las mismas.

Los términos "polipéptido" o "proteína" se refieren a un polímero de aminoácidos sin tener en cuenta la longitud del polímero. Por tanto, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de un polipéptido. También se incluyen dentro de la definición los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido, polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la materia, tanto de origen natural como no natural.

La expresión 'células cultivadas' significa células eucariotas que crecen en condiciones controladas, generalmente fuera de su entorno natural, incluyendo células primarias, líneas celulares y células transgénicas. Las células cultivadas pueden estar, o no, transducidas mediante una composición de vector vírico. La expresión "células diana" significa células que se analizan para determinar la expresión de biomarcadores mediante el método de la invención, o el kit de la invención. Las células diana son preferentemente células eucariotas, más preferentemente células inmortalizadas, células primarias o células madre. Del mismo tipo, mismas condiciones de cultivo. Por ejemplo, las células diana son células de prepucio.

En particular, las células diana pueden ser células permisivas o no permisivas. La expresión "células permisivas" se refiere a células diana que se transducen con una composición de vector vírico con un valor de Multiplicidad de Infección (MDI) óptimo menor que o igual a 40. La expresión "células no permisivas" se refiere a células diana que se transducen con una composición de vector vírico con un valor de MDI óptimo mayor que 40.

La multiplicidad de infección (MDI) es un término de uso frecuente en virología que se refiere al número de viriones que se añaden por célula durante la infección.

La expresión "MDI óptima" significa la MDI apropiada para transducir células diana. La MDI óptima está determinada por un intervalo de MDI en células diana, utilizando un gen indicador que expresa un vector vírico tal como un gen indicador que expresa un vector lentivírico. El gen indicador es, pero sin limitación, un gen indicador fluorescente, tal como GFP o un gen indicador luminiscente, tal como luciferasa.

La MDI óptima puede determinarla el experto, basándose en diversos criterios tales como, pero sin limitación:

- Porcentaje de células transducidas con un nivel de expresión del gen indicador,
- Viabilidad de células transducidas, y/o
- Nivel de expresión del gen indicador.

El porcentaje de células transducidas y el nivel de expresión del gen indicador se determinan mediante métodos que son conocidos por los expertos en la materia.

En una realización preferida de la invención, la MDI óptima está determinada por la MDI correspondiente al porcentaje más alto de células transducidas, un nivel de expresión del gen indicador suficiente para ser detectable y una no alteración de la viabilidad de las células transducidas en comparación con la viabilidad de las células no transducidas.

Por ejemplo, la MDI óptima para células de fibroblastos, tales como células de fibroblastos de prepucio (también denominadas "células de prepucio"), es de 40.

El término "transfección" se refiere al procedimiento de introducir deliberadamente ácidos nucleicos en las células. El término se usa estrictamente para métodos no víricos en células eucariotas. La transfección se utiliza en el procedimiento de producción de vectores víricos cuando los plásmidos que expresan gag-pol y env, se transfectan

en células productoras para obtener vectores víricos en el sobrenadante.

El término "transducción" es el procedimiento de introducir deliberadamente ácidos nucleicos en las células. El término se utiliza para métodos basados en virus en células eucariotas. Los vectores víricos se recogen de las células productoras y se ponen en contacto con las células eucariotas para obtener las células finalmente transducidas.

Las expresiones "factor de cambio" o "FC" representan la proporción entre el nivel de expresión de las células transducidas con una composición de vector vírico frente al nivel de expresión de células no transducidas o transducidas con diferentes lotes de composiciones de vectores víricos.

La expresión 'senescencia celular' se refiere a la detención estable del ciclo celular acompañada por un conjunto de características morfológicas y rasgos fisiológicos que distinguen las células senescentes de las células en proliferación, así como células detenidas quiescentes o diferenciadas terminalmente detenidas (Kosar et al. 2011).

El término 'SASP' significa "fenotipo secretor asociado a senescencia" (siglas del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) y se define como un conjunto de proteínas secretadas por células que experimentan senescencia celular.

La expresión "ciclo celular" significa la secuencia de eventos dentro de la célula entre divisiones mitóticas (células). El ciclo celular se divide convencionalmente en cinco fases: G0 (de gap, que significa intervalo); G1, (primer intervalo); S (fase de síntesis, durante la cual el ADN se sintetiza y se replica); G2 (segundo intervalo); y M (mitosis).

La presente invención proporciona un nuevo método para evaluar o medir el efecto de las composiciones de vectores víricos en células diana, preferentemente células eucariotas explorando modificaciones en el nivel de expresión de al menos un biomarcador en dichas células diana o eucariotas. El método de la invención se utiliza para evaluar la calidad de las composiciones de vectores víricos estableciendo si la composición de vector vírico tiene un impacto sobre células cultivadas. Las células diana o eucariotas pueden ser células transfectadas para producir las composiciones de vectores víricos o células cultivadas transducidas con las composiciones de vectores víricos. Los biomarcadores pueden ser ácidos nucleicos celulares y/o proteínas celulares o sus fragmentos seleccionados. El objetivo es determinar si la propia composición de vector vírico, en lugar del transgén que porta el vector vírico, repercute sobre las células cultivadas, donde dicha repercusión puede depender de la concentración y pureza de la composición de vector vírico. De hecho, hasta ahora, el experto en la materia no disponía de métodos para comparar el efecto de las composiciones de vectores víricos sobre la viabilidad y/o toxicidad de las células diana o eucariotas.

Por otra parte, las composiciones de vectores víricos pueden tener diferentes concentraciones y títulos. El título de la composición es un parámetro muy importante de la composición, ya que determina la Multiplicidad de la Infección (MDI) aplicada a las células cultivadas. La determinación del título depende de diversos factores, es decir, de las técnicas de medición y del procesamiento de datos. Típicamente, los investigadores se han centrado en optimizaciones de protocolos de pseudotipificación o transducción con vectores para mejorar la eficacia de la transducción (Janssens et al., 2003), aunque el uso de una MDI más alta es la clave para alcanzar niveles de transducción altos. Sin embargo, dado que dicho lote B-S induce toxicidad celular (Selvaggi et al., 1997; Reiser, 2000; Baekelandt et al., 2003), los resultados de eficacia de transducción con este tipo de producto B-S son siempre un equilibrio entre el nivel de transducción y la toxicidad resultante en células diana. Asimismo, otro inconveniente de los vectores retrovíricos o lentivíricos publicados, concentrados mediante técnicas clásicas, es la incapacidad de que las células madre transducidas, particularmente células madre hematopoyéticas, avancen hacia rutas de diferenciación después de la transducción. Por tanto, la presente invención proporciona métodos para determinar el efecto de composiciones de vectores víricos, a diferentes MDI, en células transducidas. La presente invención permite determinar el intervalo la de MDI correspondiente a una composición de vector vírico dada y también optimizar los protocolos utilizados para la transducción celular. Particularmente, el uso de biomarcadores de la presente invención permite definir el intervalo apropiado de MDI que consiente una transducción eficaz sin inducir efectos nocivos o indeseables en las células transducidas, como la detención del ciclo celular o la senescencia celular.

Para estudiar los mecanismos subyacentes a la respuesta celular de las células transducidas en las composiciones de vectores víricos, se desarrolló un sistema modelo basado en el descubrimiento de biomarcadores expresados diferencialmente en células transducidas, donde el patrón de expresión del biomarcador se correlaciona con la calidad de la composición de vector vírico (vector vírico sin ADNc). Por consiguiente, la presente invención se basa en la identificación y validación de diversos biomarcadores cuya expresión se modifica después de ponerse en contacto con una composición de vector vírico. La invención se basa en datos generados con diferentes composiciones de vectores víricos (diferentes niveles de concentración/pureza) y diferentes valores de MDI para identificar biomarcadores fiables para medir el impacto de las composiciones de vectores víricos sobre células eucariotas cultivadas. En particular, las diferencias en los niveles de expresión de los genes de las células transducidas se compararon entre los niveles de expresión de los genes de las células no transducidas frente a los genes de las células transducidas con un vector vírico sin ADNc. Algunos genes identificados como biomarcadores

volvieron a analizarse mediante experimentos con micromatrices y/o cuantificación mediante RT-qPCR del nivel de expresión en células transducidas con composiciones de vectores víricos en comparación con células no transducidas. Para estos experimentos de validación, se presta especial atención a la titulación de las composiciones de vectores víricos. Por ejemplo, las composiciones de vectores víricos se titulan tres veces en diferentes momentos.

La presente divulgación atañe a un perfil de biomarcadores correspondiente a moléculas que están reguladas positiva o negativamente en células diana transducidas, preferentemente células eucariotas, mediante una composición de vector vírico. En una realización preferida de la divulgación, el cambio en el nivel de expresión del biomarcador entre las células no transducidas y las células transducidas se establece a un valor absoluto mínimo de FC de 1,3 (factor de cambio  $\geq 1,3$ ) en la expresión, ya sea un aumento de 1,3 veces en la expresión o una disminución de 1,3 en la expresión. El valor de FC se correlaciona con la calidad de la composición de vector vírico y con las condiciones de transducción, en particular con la MDI (multiplicidad de infección). El perfil de biomarcadores es útil para caracterizar el estado biológico específico de las células transducidas. El perfil comprende los biomarcadores de las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 y 8.

La comparación de los niveles de expresión génica entre células pre-transducidas y post-transducidas identificó una firma de expresión génica compuesta por genes sobreexpresados e infraexpresados. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para evaluar la calidad de una composición de vector vírico. Los métodos de la divulgación se basan en la medición del nivel de expresión de uno o más transcritos de ARN predictivos o sus productos de expresión en una célula transducida, normalizado contra el nivel de expresión de los transcritos de ARN o sus productos de expresión en una célula no transducida, o contra un conjunto de referencia de transcritos de ARN o sus productos de expresión, en donde el transcrito de ARN predictivo es el transcrito de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en los genes enumerados en las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 y 8. Aunque los biomarcadores individuales son útiles para evaluar la calidad de una composición de vector vírico, la combinación de biomarcadores como se propone en este documento, permite una determinación más precisa de la calidad de una composición de biomarcadores.

Los niveles de expresión de los biomarcadores en una muestra pueden determinarse por comparación con una muestra de "control" o "referencia" adecuada. Por ejemplo, el nivel de expresión relativo de marcadores en una célula transducida con un vector vírico puede determinarse con referencia al nivel de expresión de los mismos marcadores en una célula transducida con un vector no vírico. Si el nivel de expresión de los marcadores es mayor o menor que el de referencia, se puede decir que la expresión de los marcadores está "aumentada" o "disminuida", respectivamente. Además, es posible que los niveles de expresión puedan permanecer constantes entre el control o la referencia y la muestra.

El término cambio "significativo" (regulación positiva o regulación negativa) es un cambio en el nivel de expresión que es lo suficientemente importante como para que un experto lo considere trascendente. En particular, el cambio en el nivel de expresión es significativo cuando el nivel de expresión de las células transducidas no se corresponde con el nivel de expresión en las células no transducidas teniendo en cuenta el margen de error. En una realización preferida de la presente divulgación, se establece un cambio significativo en el nivel de expresión del biomarcador entre las células no transducidas y las células transducidas a un valor absoluto mínimo de FC de 1,3 (factor de cambio  $\geq 1,3$ ) en la expresión, ya sea un aumento de 1,3 veces en la expresión o una disminución de 1,3 en la expresión. Este valor absoluto mínimo de FC de 1,3 se consideró para el primer análisis con biochips. Para el experimento de validación, se realizaron pruebas de la *t* independientes con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg y un valor de *p* corregido  $< 0,05$ . Las sondas con valores absolutos de factores de cambio (FC)  $\geq 1,5$  se conservaron como sondas expresadas diferencialmente reguladas positiva y negativamente.

Las muestras para análisis en dichos métodos pueden ser cualquier célula diana, preferentemente células eucariotas o extracto de células eucariotas. Dichas células eucariotas incluyen líneas celulares, células cultivadas, células primarias, células madre.

Como se describe con detalle más adelante, la expresión de los biomarcadores dentro de una célula puede evaluarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la expresión puede evaluarse utilizando micromatrices de ADN. Como alternativa, los transcritos de ARN pueden medirse utilizando PCR en tiempo real, o, cuando el ARN corresponde a un gen codificante, los productos proteicos pueden detectarse utilizando anticuerpos adecuados. Los métodos para determinar los niveles de expresión de genes mediante estos y otros métodos son conocidos en la técnica.

Por brevedad, los solicitantes no están enumerando expresamente cada posible combinación de productos génicos adecuados para su uso en los métodos de la invención. No obstante, debe entenderse que se contempla cada combinación de este tipo y que está dentro del alcance de la invención. Se concibe específicamente que cualquier combinación de los productos génicos enumerados en las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 u 8 que se haya descubierto que se ha expresado diferencialmente entre un control o referencia, por ejemplo, células no transducidas y células transducidas, puede ser particularmente útil para el análisis en los métodos desvelados.

La presente invención proporciona un método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células eucariotas inmortalizadas que comprende:

- 5 (a) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico;
- (b) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico a una alta MDI; y
- 10 (c) comparar dicha expresión de biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (b) con la expresión de biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (a) en donde una regulación positiva significativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (b) en comparación con la etapa (a) indica que la calidad de la composición del vector vírico es insuficiente.

15 Por "transgén", se entiende más específicamente cualquier ácido nucleico de interés. Un transgén es, pero sin limitación, un gen indicador (GFP, luciferasa...), cualquier gen o combinación de parte (o partes) de un gen (o genes) o secuencia de interés, tal como ARNhc (RNA de horquilla corta) o miARN (micro ARN).

20 La expresión "calidad insuficiente" significa que la composición de vector vírico que se va a analizar modifica algunas características de las células transducidas en comparación con las células no transducidas. Los ejemplos de características modificadas son, pero sin limitación, la proliferación y/o la viabilidad de las células transducidas en comparación con las células no transducidas. En particular, estas características no se modifican cuando la composición de vector vírico es una composición de vector vírico concentrada y purificada, tal como una composición de vector vírico producida sin suero, concentrada y purificada por ultrafiltración y diafiltración tangencial, tal como la obtenida con el método descrito en la solicitud de patente WO 2013/014537.

25 Más específicamente, dicho método de producción de la composición de vector vírico comprende las siguientes etapas:

- 30 - transfección de una célula productora, modificada para complementar eliminaciones en el genoma vírico de ARN en el que se basa el vector vírico, y cultivar las células productoras en condiciones adecuadas para permitir la producción de partículas de vectores víricos, donde después de la transfección dicho cultivo se realiza en medio sin suero;
- recoger el sobrenadante que contiene dichas partículas de vector vírico; y
- 35 - purificar el sobrenadante mediante ultrafiltración y diafiltración tangencial, realizándose la ultrafiltración preferentemente en cartuchos de polisulfona de fibra hueca.

En particular, este método de producción de la composición de vector vírico no comprende ninguna etapa de inducción con butirato de sodio.

40 Ventajosamente, la recogida de sobrenadante se realiza en varias etapas comprendidas entre 3 y 6, a intervalos de tiempo específicos. Después de recoger el sobrenadante se clarifica por centrifugación.

El método de producción puede comprender además una etapa de cromatografía de intercambio iónico.

45 Este método de producción permite obtener una composición de vector vírico purificada que comprende menos de un 2 % de contaminantes proteicos iniciales y de un 10 a un 30 %, preferentemente menos de un 10 %, de contaminantes iniciales de ADN, comparado con la composición de vector vírico en bruto presente en el medio sin suero celular.

50 En particular, dicha composición de vector vírico es capaz de transducir células diana, en particular células eucariotas, sin repercutir sobre la viabilidad celular y/o tiene poco o ningún efecto sobre la proliferación celular, viabilidad, y/o la capacidad de las células, tales como células madre para diferenciarse o tales como células primarias para reprogramarse en células pluripotentes.

55 Más particularmente, en la composición de vector vírico obtenida por el método de producción mencionado anteriormente, las partículas físicas/unidades de transducción (PF/UT) suelen estar comprendidas entre 100: 1 hasta 900: 1, preferentemente entre 100: 1 hasta 600: 1, más preferentemente entre 100: 1 hasta 400: 1.

60 En el presente método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células eucariotas inmortalizadas, una regulación positiva significativa a alta MDI es, preferentemente, una regulación positiva dos veces mayor en comparación con la etapa (a).

Ventajosamente, el nivel de expresión de al menos un biomarcador puede medirse mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR, siglas del inglés *reverse transcription quantitative PCR*)

65 La expresión "alta MDI" significa una MDI mucho mayor que la MDI óptima. La alta MDI se determina mediante un

intervalo de MDI utilizando un gen indicador que expresa un vector vírico, tal como un gen indicador que expresa un vector lentivírico. El gen indicador es, pero sin limitación, un gen indicador fluorescente, tal como GFP o un gen indicador luminiscente, tal como luciferasa.

5 Preferentemente, la alta MDI corresponde a:

- al menos tres veces la MDI óptima para células no permisivas,
- al menos cuatro veces para células permisivas.

10 Por ejemplo, una alta MDI para células de fibroblastos, tales como células de fibroblastos de prepucio, es de al menos 120, tal como de 150.

El método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes a células eucariotas inmortalizadas puede comprender además una etapa de:

15 (d) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico;

20 (e) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico; y

(f) comparar dicha expresión de biomarcador(es) en la etapa (e) con la expresión de biomarcador(es) en la etapa (d) en donde una regulación negativa significativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en comparación con la etapa (d) indica que la calidad de la composición del vector vírico es insuficiente.

25 Más particularmente, una regulación negativa significativa a una MDI óptima es una regulación negativa de 1,5 veces en comparación con la etapa (d).

30 Ventajosamente, el nivel de expresión de al menos un biomarcador puede medirse mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR).

El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa de:

35 (g) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico de control; y

40 (h) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (g) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (a), en donde no va a detectarse ninguna expresión diferencial significativa en el biomarcador(es) en la etapa (g) en comparación con la etapa (a).

Esta expresión diferencial significativa en el biomarcador o biomarcadores no debe detectarse incluso a una alta MDI.

45 La expresión "composición de vector vírico de control" significa una composición de vector vírico muy concentrada y purificada. Puede obtenerse, pero sin limitación, por diafiltración o ultrafiltración tangencial única o sucesiva, por cromatografía de intercambio iónico, por cromatografía de exclusión. En una realización preferida de la invención, la composición de vector vírico de control es tal como se obtiene mediante el procedimiento de producción descrito en la solicitud de patente WO 2013/014537 (véase, por ejemplo, el "lote C" en esta solicitud PCT) y/o como se describe anteriormente.

50 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente una etapa de:

55 (j) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico de control; y

60 (k) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (j) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (d), en donde va a detectarse una posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d).

Más particularmente, la posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d) es al menos 1,5 veces menor que la regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en comparación con la etapa (d) a alta MDI.

65 El método de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente de antemano una etapa de titulación de la composición de vector vírico y de la composición de vector vírico de control.

Los títulos de virus en general, y de los vectores basados en virus lentivíricos, en particular, dependen del método y de las células que se utilicen para la titulación. La cuantificación de las partículas de vector capaces de realizar las etapas de la ruta de transducción desde la entrada de la célula hasta la integración y la expresión génica depende del propio vector y de las características de la célula.

Con respecto a las células utilizadas para la titulación de vectores, es importante asegurarse de que las células diana sean fácilmente permisivas, ya que se demostró que la permisividad de todos los tipos de células no era equivalente. Otro punto es que la eficacia de la transducción debe controlarse fácilmente para una cuantificación fiable de cualquiera de los transgenes y vectores a lo largo del tiempo. En este caso, en cada experimento de titulación se cuantifica un vector lentivírico estándar que expresa GFP en términos de unidades eficaces tanto por FACS (representado por el número de Unidades de Transducción por ml UT/ml) como por qPCR (representado por el número de Genoma Integrado por ml GI/ml) después de la transducción de HCT116 con diluciones en serie de los vectores de acuerdo con el material y los métodos descritos anteriormente. Ambos resultados dan un número relativo de partículas eficaces para la transducción, pero sus números absolutos respectivos no dan el mismo título dependiendo de la propia PCR y la secuencia diana utilizada para la amplificación. Estos datos muestran que, en ausencia de métodos estandarizados, puede ser difícil comparar con precisión estos diferentes enfoques basados en los títulos funcionales. Por lo tanto, puede ser de interés, incluir una composición de vector vírico de control en el presente método. Por tanto, dicha composición de vector vírico de control es un lote de referencia preferentemente con un título conocido y un tipo de célula diana definido.

En paralelo, la determinación de las partículas totales se cuantifica con el kit P24 Elisa para estimar las partículas totales del vector, incluso aquellas que no contienen ningún ARN genómico y/o que están desprovistas de proteínas de envoltura. Ambos títulos son útiles para determinar la proporción entre las partículas físicas PF que reflejan las partículas totales y el título biológico que da la capacidad real de transducción. Esta proporción da una estimación de la pureza y la integridad del vector. Para reflejar la integridad o la infectividad del vector se utiliza otra proporción y se expresa como el número de GI por ng de P24 (1 ng de P24 corresponde a 107 PF).

Ventajosamente, en el método de acuerdo con la invención, las mediciones del nivel de expresión del biomarcador se realizan antes de que las células alcancen la confluencia.

Preferentemente, las células diana son células eucariotas y se transducen mediante una composición de vector lentivírico.

Para determinar los niveles de expresión (aumentados, disminuidos) de los biomarcadores descritos anteriormente en la práctica de la presente invención, puede utilizarse cualquier método conocido en la materia. En una realización preferida de la invención, se utiliza la expresión basada en la detección de ARN que se hibrida a una "sonda" o un "cebador" específico para los biomarcadores descritos en este documento. Una "sonda" o un "cebador" es una molécula de ADN o ARN monocatenaria de secuencia definida que puede emparejarse con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la diana). La estabilidad de la molécula híbrida resultante depende de la extensión del emparejamiento de bases que se produce, y se ve afectada por parámetros tales como el grado de complementariedad entre la sonda y la molécula diana, y el grado de rigurosidad de las condiciones de hibridación. El grado de rigurosidad de la hibridación se ve afectado por parámetros tales como la temperatura, la concentración de sal y de moléculas orgánicas, tal como la formamida, y se determina por métodos conocidos por los expertos en la materia.

Dependiendo del propósito para el cual, y de las condiciones bajo las cuales, se utiliza la sonda o el cebador, la longitud de las sondas o de los cebadores específicos para los biomarcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento, o partes de los mismos, puede variar por cualquier número entero de al menos 8 nucleótidos a más de 500 nucleótidos. Las sondas o los cebadores específicos para los biomarcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento, pueden tener una identidad de secuencia mayor que 20-30 %, o de al menos 55-75 %, o de al menos 75-85 %, o de al menos 85-99 % o de 100 % con los biomarcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento. Las sondas o los cebadores pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ADNc, por ejemplo, por amplificación, o a partir de segmentos de ADN clonado, y pueden contener secuencias de ADN genómico o ADNc que representan toda o una parte de un solo gen de un solo individuo. Las sondas o los cebadores pueden sintetizarse químicamente.

Una sonda o un cebador puede hibridarse con un biomarcador de ácido nucleico en condiciones de alta rigurosidad como se describe en este documento. Las "condiciones de hibridación rigurosas" como las que se usan en este documento, son condiciones bajo las cuales una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda) se hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Las condiciones rigurosas pueden seleccionarse para que estén a una temperatura entre 5 y 10 °C. Más bajo que la del punto de fusión (T<sub>f</sub>) térmico para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T<sub>f</sub> puede ser la temperatura (con una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) a la cual el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T<sub>f</sub>, el 50 % de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas

pueden ser aquellas en las que la concentración salina de iones de sodio es menor que aproximadamente 1,0 M, tal como una concentración de iones de sodio (u otras sales) de aproximadamente 0,01-1,0 M, a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10-50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, de más de aproximadamente 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos de 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen las siguientes: formamida al 50 %, 5XSSC, y SDS al 1 %, incubando a 42 °C, o, 5XSSC, SDS al 1 %, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2XSSC y SDS al 0,1 % a 65 °C.

Las sondas o los cebadores pueden marcarse de manera detectable, ya sea radiactivamente o no radiactivamente, por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por "marcado de manera detectable" se entiende cualquier medio para marcar e identificar la presencia de una molécula, por ejemplo, una sonda o un cebador oligonucleotídica(o), un gen o fragmento del mismo, o una molécula de ADNc. Los métodos para marcar de manera detectable una molécula son muy conocidos en la materia e incluyen, sin limitación, marcado radioactivo (por ejemplo, con un isótopo tal como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S) y marcado no radiactivo tal como, marcado enzimático (por ejemplo, utilizando peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), marcado quimioluminiscente, marcado fluorescente (por ejemplo, usando fluoresceína), marcado bioluminiscente, o detección de anticuerpos de un ligando unido a la sonda. También se incluye en esta definición una molécula que se marca de manera detectable por un medio indirecto, por ejemplo, una molécula que está unida con una primera porción (tal como biotina) que, a su vez, está unida a una segunda porción que puede observarse o analizarse (tal como estreptavidina marcada con fluoresceína). Los marcadores también incluyen digoxigenina, luciferasas y aequorinas.

Las sondas o los cebadores pueden utilizarse en métodos de detección de biomarcadores que impliquen hibridación de ácidos nucleicos, tales como secuenciación de ácido nucleico, amplificación de ácido nucleico por la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, RT-PCR), análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios (SSCP, siglas del inglés *single stranded conformational polymorphism*), análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), hibridación de Southern, hibridación de northern, hibridación *in situ*, ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *electrophoretic mobility shift assay*), hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*), y otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Un método de detección de biomarcadores preferido es la PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR).

Una realización preferida que utiliza un ensayo basado en ácido nucleico para determinar la expresión de biomarcadores es mediante la inmovilización, en un soporte sólido, de una o más secuencias de biomarcadores identificadas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, un sustrato sólido como una matriz o perlas o tecnología basada en perlas, como se conoce en la materia. Como alternativa, también pueden utilizarse ensayos de expresión basados en soluciones conocidos en la técnica. La secuencia o secuencias inmovilizadas pueden estar en forma de polinucleótidos como se describe en el presente documento, de modo que el polinucleótido podría hibridarse con un ADN o ARN correspondiente a la secuencia o secuencias del biomarcador.

El polinucleótido (o polinucleótidos) inmovilizado puede utilizarse para determinar la firma de expresión del biomarcador en una muestra de células transducidas y no transducidas. El polinucleótido (o polinucleótidos) inmovilizado solo necesita ser suficiente para hibridarse específicamente con las correspondientes moléculas de ácido nucleico procedentes de la muestra (y con la exclusión de hibridación detectable o significativa con otras moléculas de ácido nucleico).

En realizaciones en las que solo van a analizarse uno o unos pocos biomarcadores, el ácido nucleico procedente de una muestra aislada de células puede amplificarse utilizando preferentemente cebadores apropiados de tal manera que solamente se amplifiquen los genes que se van a analizar para reducir las señales de fondo contaminantes de otros genes expresados en la célula. Como alternativa, y cuando se van a analizar múltiples genes, o cuando se utilizan muy pocas células (o una célula), el ácido nucleico de la muestra puede amplificarse globalmente antes de la hibridación con los polinucleótidos inmovilizados. Por supuesto, el ARN o su ADNc homólogo, pueden marcar se y utilizarse directamente, sin amplificación, con métodos conocidos en la materia.

En la práctica de la invención puede utilizarse un biochip.

En particular, la presente divulgación proporciona un biochip que consiste en al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AU- RKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK opcionalmente con un gen ubicuo.

El biochip puede comprender un sustrato sólido que comprende una sonda, o pluralidad de sondas descritas en este documento, unida. Las sondas pueden ser capaces de hibridarse con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las sondas pueden unirse en sitios definidos espacialmente sobre el sustrato. Puede utilizarse

más de una sonda por secuencia diana, ya sean sondas superpuestas o sondas en diferentes secciones de una secuencia diana particular. Las sondas pueden sintetizarse primero, y después unirse al biochip, o pueden sintetizarse directamente en el biochip.

5 El sustrato sólido puede ser un material que puede modificarse para contener sitios individuales separados apropiados para la unión o asociación de las sondas y es susceptible de al menos un método de detección. Como ejemplos representativos de sustratos se incluyen vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflón J, etc.), polisacáridos, nailon y nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice,  
10 incluidos el silicio y el silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos y plásticos. Los sustratos pueden permitir la detección óptica sin fluorescencia apreciable.

La expresión del biomarcador también puede medirse en función de la detección de una presencia, también puede utilizarse el aumento o la disminución de los niveles o actividad de las proteínas. Los métodos de detección basados  
15 en anticuerpos son muy conocidos en la materia e incluyen, como ejemplos no limitantes, ensayos de tipo sándwich y ELISA, así como ensayos basados en transferencia de Western y citometría de flujo. Los anticuerpos, para su uso en dichos métodos de detección, incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen específicamente a los biomarcadores de las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 y 8.

20 Preferentemente, los anticuerpos, para su uso en dichos métodos de detección, incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen específicamente a al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y/o al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

25 Dichos anticuerpos, así como sus fragmentos (incluidos, pero sin limitación, fragmentos Fab) funcionan para detectar dichos biomarcadores en las células gracias a su capacidad para unirse específicamente a dichos polipéptidos con la exclusión de otros polipéptidos para producir una señal detectable. En la práctica de la invención también pueden utilizarse anticuerpos recombinantes, sintéticos e híbridos con la misma capacidad.

30 En una realización preferida, la expresión del biomarcador también puede medirse mediante RT-qPCR. La presente divulgación proporciona adicionalmente una placa de RT-qPCR que comprende cebadores de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG y cebadores de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D,  
35 KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

En la Tabla 10 se dan ejemplos de cebadores que pueden utilizarse en la placa de RT-qPCR para EREG y CXCL2.

40 La presente invención se basa en la identificación y la validación de biomarcadores de células diana que pueden utilizarse para evaluar la calidad de una composición de vector vírico. En una realización descrita preferida, los biomarcadores se seleccionan de los genes enumerados en las Tablas 2, 3, 4, 6, 7 y 8. Como se describe con detalle más adelante, se identificaron tres familias de biomarcadores: (i) biomarcadores asociados a senescencia, (ii) biomarcadores asociados al ciclo celular, y (iii) otros biomarcadores que se descubrió que estaban asociados a la  
45 calidad de las composiciones de vector vírico.

Para identificar estos biomarcadores, la expresión génica se determinó utilizando diferentes composiciones de vectores víricos obtenidas de la siguiente manera. Las células productoras se tri-transfectaron con construcciones de plásmidos como se describe en la Figura 1C, de acuerdo con técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la técnica de fosfato de calcio, la técnica de DEAE-dextrano,  
50 electroporación, métodos basados en choque osmótico, microinyección o métodos basados en el uso de liposomas. En una realización específica, las células pueden transfectarse utilizando un método de precipitación con calcio. Dicho método se prefiere cuando las células productoras de elección son células 293T aunque también pueden utilizarse células equivalentes.

55 Después de la transfección, las células se incuban en medios sin suero para la producción de los lotes A, B C y D (Figura 1B). El lote B-S se produce con suero al 10 % (Figura 1A). Las células se incuban durante un tiempo suficiente para permitir la producción eficaz de partículas víricas. El tiempo de incubación después de la transfección, depende de una combinación de factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de vector vírico utilizado y la línea celular productora de elección. En una realización específica, después de la incubación pueden realizarse  
60 recogidas múltiples. Por ejemplo, pueden realizarse cuatro o más recogidas de vectores. Para determinar las condiciones de incubación más productivas, pueden realizarse experimentos con lotes pequeños para determinar las condiciones optimizadas para generar el título más alto y el lote más puro de partículas víricas.

65 En el presente documento, al sobrenadante de cultivo inicial que contiene las partículas de vectores víricos, se le denomina lote A. El lote B se obtiene mediante métodos de concentración de la técnica anterior utilizados comúnmente (Figura 1A), tales como una etapa de concentración por ultrafiltración utilizando unidades de

centrifugación listas para usar en la recogida posterior a la clarificación. El método para obtener una composición de vector vírico puede comprender además la etapa de ultrafiltración diafiltración tangencial del producto del lote A para la purificación adicional de las partículas de vector vírico. Dicha etapa de diafiltración ultrafiltración es un tipo de filtración con membrana en la que la presión hidrostática aplica fuerza a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de mayor peso molecular que el límite de la membrana se quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de menor peso molecular que el límite de la membrana pasan a través de la misma. La técnica de ultrafiltración se realiza mediante ultrafiltración de flujo tangencial utilizando cartuchos de polisulfona de fibra hueca. Dicha técnica permite controlar y adaptar la presión para garantizar el mantenimiento de la integridad y la viabilidad del vector. Dicha etapa proporciona la concentración de las partículas del vector, además de actuar como una etapa de purificación para la eliminación de contaminantes iniciales, tales como proteínas y ácidos nucleicos de células hospedadoras, del lote recogido. En el presente documento dicho lote se denomina lote C.

En otra realización más, después de la etapa de ultrafiltración y/o diafiltración tangencial, el método para obtener una composición de vector vírico puede comprender además la etapa de cromatografía de intercambio iónico que puede realizarse para concentrar y purificar adicionalmente las partículas de vector vírico. En el presente documento dicho lote se denomina lote D.

Los biomarcadores se han identificado analizando experimentos con micromatrices dirigidos a ácidos nucleicos de células, por ejemplo, células de fibroblastos de prepucio humano transducidas con los lotes B (obtenido mediante el procedimiento B), C (obtenido mediante el procedimiento C), B-S (obtenido mediante el procedimiento B con suero), UC o UC-S (obtenido en presencia de suero y concentrado por ultracentrifugación) o no transducidas (NT).

En una realización específica, se han identificado genes implicados en la senescencia celular como biomarcadores útiles para determinar la calidad de una composición de vector vírico. La senescencia es un estado permanente de detención del ciclo celular que, a diferencia de la quiescencia, no responde a los factores de crecimiento (Young et al.). Originariamente se describió en términos de agotamiento replicativo de fibroblastos cultivados, y desde entonces se ha demostrado que la senescencia puede aparecer prematuramente en una gran cantidad de tensiones celulares. La senescencia celular aparece en cultivo e *in vivo* como respuesta a un exceso de tensión extracelular o intracelular. La inducción de respuestas a daños en el ADN y la remodelación de la cromatina del locus INK4a/ARF, son dos de los mecanismos detrás de la inducción de senescencia. Li et al. (2009) demostraron que las condiciones de cultivo celular durante la reprogramación mejoran la expresión del locus Ink4/Arf, destacando aún más la importancia de silenciar este lugar para permitir una proliferación y reprogramación eficaces. Limitar la senescencia utilizando una suspensión de vectores extremadamente purificada para sobreexpresar combinaciones de factores tales como Oct4, Sox2, Klf4 y c- Myc, pueden tener un efecto positivo profundo en la eficacia de la generación de células iPS, aumentando tanto la cinética de la reprogramación como el número de colonias de células iPS emergentes.

La presente invención desvela el uso de genes implicados en el fenotipo senescente para evaluar el impacto de las composiciones de vectores víricos sobre células diana. En una realización preferida de la presente divulgación, el biomarcador implicado en el fenotipo senescente celular se enumera en las Tablas 5 o 6.

El fenotipo senescente no se limita a una detención de la proliferación celular. Una célula senescente es una célula potencialmente persistente que es metabólicamente activa y que ha sufrido cambios generalizados en la expresión y secreción de proteínas, desarrollando, en última instancia, el fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (Coppe et al. 2010). El SASP incluye varias familias de factores solubles e insolubles. Los factores de SASP pueden ser factores de señalización solubles (interleucinas, quimiocinas y factores de crecimiento), proteasas secretadas y proteínas insolubles/componentes de la matriz extracelular secretados (Coppe et al. 2010). Las células senescentes desarrollan actividades secretoras alteradas que pueden inducir cambios en el microentorno tisular, relajando su control sobre el comportamiento celular y promoviendo la tumorigénesis (Coppe et al. 2010). En el cultivo celular, la detención del ciclo celular típicamente conduce a la senescencia, porque la célula está sobre estimulada por el suero, nutrientes, oncogenes y etcétera (Blagosklonny, 2011). La presente invención desvela el uso de genes implicados en el SASP para evaluar el impacto de las composiciones de vectores víricos sobre células diana que se han puesto en contacto con dichas composiciones. En una realización preferida de la presente divulgación, biomarcadores asociados a SASP, incluyen los enumerados en la Tabla 7.

En una realización específica de la invención, se han identificado genes implicados en el ciclo celular como biomarcadores útiles para determinar la calidad de una composición de vector vírico. La división celular consiste en dos procesos consecutivos, principalmente caracterizados por la replicación de ADN y la segregación de cromosomas copiados en dos células distintas. Originariamente, la división celular se dividió en dos estadios: mitosis (M), es decir, el proceso de división nuclear; e interfase, el interludio entre dos fases M. Los estadios de la mitosis incluyen profase, metafase, anafase y telofase. Al microscopio, las células en interfase simplemente crecen en tamaño, pero diferentes técnicas revelaron que la interfase incluye las fases G1, S y G2. La replicación de ADN se produce en una parte específica de la interfase denominada fase S. La fase S está precedida por un intervalo denominado G1 durante el cual la célula se está preparando para la síntesis de ADN y es seguido de un intervalo denominado G2 durante el cual la célula se prepara para la mitosis. Las fases G1, S, G2 y M son las subdivisiones

5 tradicionales del ciclo celular estándar. Las células en G1 pueden, antes de dedicarse a la replicación del ADN, entrar en un estado de reposo denominado G0. Las células en G0 representan la mayor parte de las células que no crecen, que no proliferan el cuerpo humano. La presente invención desvela el uso de genes implicados en el ciclo celular para evaluar el impacto de las composiciones de vectores víricos sobre células diana que se han puesto en contacto con dichas composiciones. En una realización preferida de la presente divulgación, como biomarcadores asociados al ciclo celular se incluyen los enumerados en las Tablas 2, 3 y 4. En una realización más preferida, la exploración de la modificación se realiza sobre el nivel de expresión de al menos un biomarcador asociado al ciclo celular, enumerado en la Tabla 4.

10 La presente invención desvela además una clase de biomarcadores cuyo nivel de expresión en las células diana se modula dependiendo de la calidad, es decir, la concentración y la purificación, de las composiciones de vectores víricos utilizadas. Para seleccionar una nueva clase de biomarcadores, se investigó el impacto de las composiciones de vectores víricos que tenían diferentes calidades y que se obtuvieron mediante diferentes procedimientos. Las composiciones de vectores víricos se obtuvieron mediante los procedimientos descritos en las Figuras 1A y 1B.

15 En una realización preferida de la presente divulgación, el uso de los genes enumerados en la Tabla 8, puede utilizarse para evaluar el impacto de las composiciones de vectores víricos en células diana que se han puesto en contacto con dichas composiciones.

20 La invención también proporciona kits para medir el nivel de expresión de biomarcadores en una muestra de células transducidas. Los kits pueden incluir uno o más reactivos correspondientes a los biomarcadores descritos en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores, proteínas recombinantes que se unen a anticuerpos específicos de biomarcadores, sondas o cebadores de ácido nucleico que se hibridan con los biomarcadores, etc. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una pluralidad de reactivos, por ejemplo, en una matriz, correspondiente a los biomarcadores descritos en este documento. Los kits pueden

25 incluir reactivos de detección, por ejemplo, reactivos que están marcados de manera detectable. Los kits pueden incluir instrucciones escritas para el uso del kit para predecir la calidad de una composición de vector vírico, y pueden incluir otros reactivos e información tales como patrones de control o referencia, soluciones de lavado, programas informáticos de análisis, etc.

30 También se desvela un método para explorar o detectar una respuesta nuclear o celular en células eucariotas transducidas con una composición de vector vírico que comprende (i) medir el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en una célula eucariota que no se ha puesto en contacto con una composición de vector vírico; (ii) medir el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en una célula eucariota después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico; y (iii) comparar la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la

35 etapa (i) con la expresión del biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (ii) donde un cambio en el nivel de expresión del biomarcador entre las etapas (i) y (ii) indica una respuesta celular y donde dicha respuesta celular se correlaciona con la calidad de la composición del vector vírico. En una realización preferida, el uno o más biomarcadores expresado es un ácido nucleico expresado en las células eucariotas que se han puesto en contacto con una composición de vectores víricos.

40 En otra realización, el uno o más biomarcadores expresado es un polipéptido expresado en las células eucariotas que se han puesto en contacto con una composición de vectores víricos.

45 En una realización específica, el biomarcador es un gen implicado en el proceso biológico de senescencia. Preferentemente, el biomarcador implicado en senescencia es un gen de la familia SASP. Más preferentemente, el biomarcador se selecciona de la Tabla 7.

50 En una realización específica, el biomarcador es un gen de la familia del ciclo celular. Particularmente, el biomarcador es un gen seleccionado de las Tablas 2, 3 y 4. Más particularmente, el biomarcador se selecciona de los genes enumerados en la Tabla 8.

En otra realización, el biomarcador se selecciona de la Tablas 2, 3, 4, 7 y/u 8.

55 En una realización, la composición de vector vírico se transduce en la célula eucariota. En otra realización, las células eucariotas se transducen mediante una composición de vector lentivírico. En una realización específica, las células eucariotas son células inmortalizadas, células primarias o células madre.

La presente divulgación proporciona un método para medir o detectar los efectos de una composición de vector vírico en células eucariotas de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

60 (i) poner en contacto dichas células con una composición vírica de interés,  
(ii) medir el nivel de expresión de biomarcadores en dichas células cultivadas; y  
(iii) opcionalmente, caracterizar los biomarcadores específicos de las modificaciones de las expresiones nuclear o citoplasmática en dichas células.

65

La presente divulgación proporciona un kit para medir la expresión de un biomarcador asociado a la transducción de una composición de vector vírico que comprende uno o más reactivos correspondientes al reconocimiento de los biomarcadores de las Tabla 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Preferentemente, el reactivo corresponde al reconocimiento de los ácidos nucleicos que codifican los biomarcadores de las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Más preferentemente, el reactivo corresponde al reconocimiento de polipéptidos de las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

El kit de acuerdo con la invención comprende uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG.

Dicho kit comprende adicionalmente uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AU-RKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK.

Adicionalmente, dicho kit también comprende una composición de vector vírico de control.

La presente divulgación proporciona una composición de biomarcador útil para la medición o detección del efecto de una composición de vector vírico en células eucariotas que comprende al menos uno de los productos seleccionados entre los genes o los polipéptidos presentes en las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Preferentemente, la composición de biomarcador comprende al menos uno de los productos seleccionados entre los genes o los polipéptidos presentes en las Tablas 3, 4, 7, 8.

Los siguientes ejemplos se dan con referencia a las siguientes figuras y tablas:

#### FIGURAS

Figura 1A. Método habitual de producción de vectores con suero mediante procedimientos de vanguardia. Figura 1B. Concentración de vector vírico y procedimiento de purificación utilizado para obtener las composiciones de vectores víricos B y C. Los diferentes procedimientos son secuenciales (de A a D correspondientes a la obtención de los lotes A a D) para cumplir con los requisitos de concentración y purificación de las células diana: células inmortalizadas (A), células primarias y células madre (C) e inyección *in vivo*(D). El procedimiento B (correspondiente al lote B obtenido) representa el procedimiento de vanguardia. Figura 1C. Plásmidos portadores de genes gag y pol, plásmido auxiliar que expresa la envoltura y plásmido de expresión de transgenes sin ADNc. Figura 2A. Resumen de los títulos de los lotes B y C utilizados para el estudio de transcriptómica. Características de los lotes B y C sin ADNc con rLV-EF1 utilizados para el estudio de transcriptómica. (1) Las unidades de transducción (UT) se determinaron mediante qPCR. (2) Las Partículas Físicas (PF) se cuantificaron mediante ensayo ELISA del antígeno p24 del VIH para determinar la proporción entre PF/UT. Figura 2B. Crecimiento de células de prepucio 48 h después de la transducción con vectores de lotes B y C. Células de prepucio 48 horas después de la transducción con un casete vacío portador del vector lentivírico (rLV-EF1 sin ADNc) a una MDI de 040 o a una MDI de 150. Los lotes B y C de rLV-EF1 se obtuvieron de la misma recogida en bruto.

Figura 3A. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas. Diagrama de dispersión que representa sondas expresadas diferencialmente, con un valor absoluto de FC  $\geq 1,5$ , en células transducidas con rLV-EF1 lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas. El eje X representa intensidades normalizadas para las células no transducidas (NT) y el eje Y las intensidades normalizadas para las células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de factores de cambio que representan valores de factores de cambio de -2, 1 y 2.

Figura 3B. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas. Diagrama de dispersión que representa sondas expresadas diferencialmente, con un valor absoluto de FC  $\geq 1,5$ , en células transducidas con rLV-EF1 lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas. El eje X representa intensidades normalizadas para las células no transducidas (NT) y el eje Y las intensidades normalizadas para las células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de factores de cambio que representan valores de factores de cambio de -2, 1 y 2.

Figura 4. Diagrama de Venn: sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas y sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote C frente a células no transducidas a una MDI de 150. Diagrama de Venn que muestra la intersección entre la lista de sondas reguladas negativamente (FC  $\leq -1,5$ ) en células transducidas con el lote B a una MDI de 150 en comparación con células no transducidas, y la lista de sondas reguladas negativamente (FC  $\leq -1,5$ ) en células transducidas con el lote C a una MDI de 150 en comparación con células no transducidas.

Figura 5. Gráfico de perfil de sondas de ciclo celular en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas a una MDI de 150 con FC  $\leq -3$ . El gráfico de perfil representa sondas diferenciales que tienen un FC  $\leq -3$  cuando se comparan células transducidas con el lote B a una MDI de 150 con células no transducidas. Se aplicó una transformación inicial en los valores de intensidad antes de representar los datos. Los valores de intensidad normalizados se representan gráficamente en las siguientes condiciones: células transducidas con el lote B a una MDI de 150, células transducidas con el lote C a una MDI de 150, célula no transducida.

Figura 6A. Validación mediante RT-qPCR de la regulación negativa de 5 genes del ciclo celular en células transducidas con rLV-EF1 lote B a una MDI de 150 y células transducidas con rLV-EF1 lote C a una MDI de 150 en comparación con células no transducidas. La RT-qPCR se realizó en ARN de células transducidas con rLV-

EF1 lote B y rLV-EF1 lote C a una MDI de 150 y en ARN de células no transducidas. Los factores de cambio obtenidos mediante RT-qPCR, calculados a partir de valores de ciclo de umbral ( $C_t$ , *threshold cycle*) en cada condición frente a valores en células no transducidas, utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , se representan gráficamente en las 3 condiciones (NT: Células No Transducidas, Lote C: células transducidas con rLV-EF1 lote C a una MDI de 150, Lote B: células transducidas con rLV-EF1 lote B a una MDI de 150). Figura 6B. Comparación de valores de factores de cambio obtenidos con RT-qPCR y de experimentos con micromatrices para los 5 genes validados anteriormente citados. Todos los factores de cambio se calcularon comparando los valores de expresión en células transducidas con rLV-EF1 lote B o lote C a una MDI de 150 frente a valores de expresión en las células no transducidas. (1) Símbolo de genes HUGO (*Human Genome Organisation*, Organización del Genoma Humano), (2) Lote utilizado para la transducción a una MDI de 150, (3) El valor de factor de cambio se calculó a partir de los valores de  $C_t$  utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y transformado en un valor negativo equivalente ( $-1/FC$ ), (4) Valor de factor de cambio del experimento con micromatrices.

Figura 7A. Células transducidas con el lote B obtenido con suero (lote B-S) en comparación con células no transducidas. Células de prepucio 48 horas después de la transducción con un casete vacío portador del vector lentivírico (rLV-EF1 sin ADNc) producido en presencia de suero a una MDI de 40 y de 150. Figura 7B. Características del lote B-S de rLV-EF1 sin ADNc utilizado para el estudio de transcriptómica. (1) Las unidades de transducción (UT) se determinaron mediante qPCR. (2) Las Partículas Físicas (PF) se cuantificaron mediante ensayo ELISA del antígeno p24 del VIH para determinar la proporción entre PF/UT.

Figura 8. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) frente a células no transducidas a una MDI de 150. Diagrama de dispersión que representa sondas expresadas diferencialmente, con un valor absoluto de  $FC \geq 1,5$ , en células transducidas con rLV-EF1 sin ADNc lote B-S a una MDI de 150 frente a células no transducidas. El eje X representa intensidades normalizadas para las células no transducidas (NT) y el eje Y las intensidades normalizadas para las células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de factores de cambio que representan valores de factores de cambio de -2, 1 y 2.

Figura 9. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) frente a células no transducidas a una MDI de 40. Diagrama de dispersión que representa sondas expresadas diferencialmente, con un valor absoluto de  $FC \geq 1,5$ , en células transducidas con rLV-EF1 sin ADNc lote B-S a una MDI de 40 frente a células no transducidas. El eje X representa intensidades normalizadas para las células no transducidas (NT) y el eje Y las intensidades normalizadas para las células transducidas (T). Las líneas de tono gris muy claro son líneas de factores de cambio que representan valores de factores de cambio de -2, 1 y 2.

Figura 10. Diagrama de Venn: Sondas moduladas en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 150 frente a células no transducidas y sondas moduladas en células transducidas con lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 40 frente a células no transducidas. Diagrama de Venn que muestra la intersección entre la lista de sondas expresadas diferencialmente (valor absoluto de  $FC \geq 1,5$ ) en las células transducidas con el lote B-S a una MDI de 150 en comparación con las células no transducidas, y la lista de sondas expresadas diferencialmente (valor absoluto de  $FC \geq 1,5$ ) en células transducidas con el lote B-S a una MDI de 40 en comparación con células no transducidas.

Figura 11. Gráfico de perfil que representa sondas impactadas en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 40 y 150 y no diferencial en células transducidas con los lotes B y C, a una MDI de 40 y 150. Gráfico de perfil que representa sondas que se expresaron diferencialmente en células transducidas con rLV-EF1 sin ADNc con el lote B-S a una MDI de 40 y 150 en comparación con células no transducidas (NT), y que no fueron diferenciales en células transducidas con rLV-EF1 sin ADNc con los lotes B y C una MDI de 40 y 150 en comparación con células no transducidas. Por "no diferencial", se entiende que el valor absoluto de FC es  $<1,3$ . Se aplicó una transformación inicial en los valores de intensidad antes de representar los datos. B-40: células transducidas con lote B a una MDI de 40. B-150: Células transducidas con lote B a una MDI de 150. C-40: Células transducidas con lote C a una MDI de 40. C-150: Células transducidas con lote C a una MDI de 150. NT: células no transducidas. B-S-40: células transducidas con lote B obtenido con suero a una MDI de 40. B-S-150: células transducidas con lote B obtenido con suero a una MDI de 150.

Figura 12. Caracterización de lotes (B, C, B-S y UC) de vectores rLV-EF1-GFP utilizados.

Figura 13. Fotos de células de fibroblastos de prepucio transducidas con vectores rLV-EF1-GFP. Las células se observaron 48 horas después de la transducción.

Figura 14. Sonda seleccionada en la figura 5 (genes de ciclo celular regulados negativamente con  $FC \leq -3$  con B-MCS-MDI150 frente a NT) representada en las siguientes condiciones: NT, B-GFP-MDI40, C-GFP-MDI40.

Figura 15. Gráfico de perfil que muestra el comportamiento de sondas correspondientes a la tabla 3 después de la transducción con rLV-EF1-GFP lote B y C a una MDI de 40 frente a células no transducidas (NT).

Figura 16. Gráfico de perfil que representa sondas correspondientes a los 18 genes de la tabla 4 y MKI67 después de la transducción con el vector rLV-EF1-GFP a una MDI de 40.

Figura 17. Gráfico de perfil que representa los 18 genes del ciclo celular de la tabla 4 y MKI67 después de la transducción con el vector rLV-EF1-GFP (B, B-S y C) a una MDI de 40.

Figura 18. Validación de algunos genes del ciclo celular como biomarcadores mediante RT-qPCR. Los valores de cuantificación relativa de ARNm se representan como media  $\pm$  DT calculados a partir de 3 muestras por condición. Los valores de factor de cambio para cada condición en comparación con NT se indican sobre cada barra del diagrama cuando las diferencias son significativas (prueba de la  $t$  para datos independientes, valor de  $p < 0,05$ ).

Figura 19. Validación de genes CXCL2 y EREG como biomarcadores mediante RT-qPCR. Los valores de cuantificación relativa de ARNm se representan como media  $\pm$  DT calculados a partir de 3 muestras por condición. Los valores de factor de cambio para cada condición en comparación con NT se indican sobre cada barra del diagrama cuando las diferencias son significativas (prueba de la *t* para datos independientes, valor de *p* <0,05).

TABLAS

Tabla 1. Cebadores utilizados para validaciones mediante RT-qPCR. Para cada gen analizado y para el gen de referencia GAPDH (representado por su respectivo símbolo de gen), se muestran las secuencias de los cebadores directo e inverso.

Tabla 2. Genes del ciclo celular regulados negativamente en células transducidas con rLV-EF 1 sin ADNc lote B y lote C a una MOI de 150 en comparación con células no transducidas. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Categorías de Ontología Génica (GO, *Gene Ontology*) "Fase M del ciclo celular mitótico", (6) categoría GO "fase G1", (7) categoría GO "fase G2", (8) categoría GO "fase S", (9) categoría GO "transición G1/S del ciclo celular mitótico", (10) categoría GO "transición G2/M del ciclo celular mitótico", (11) categoría GO "transición M/G1 del ciclo celular mitótico". Los genes se clasifican mediante el aumento de valores de Factor de Cambio en células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas.

Tabla 3. Genes incluidos en la categoría de Ontología Génica del "ciclo celular" y que están regulados positivamente en células transducidas rLV-EF1 lote B y lote C a una MDI150 en comparación con células no transducidas. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Número de registro de secuencias de proteínas de la base de datos del NCBI ARN RefSec. Los genes se clasifican mediante valores en disminución de Factor de Cambio.

Tabla 4. Genes incluidos en la categoría de Ontología Génica del "ciclo celular", que se regulan negativamente en células transducidas con rLV-EF1 lote B a una MDI de 40 y 150 y que se regulan negativamente en células transducidas con rLV-EF1 lote C en comparación con células no transducidas a una MDI de 150 pero no a una MDI de 40. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Número de registro de secuencias de proteínas de la base de datos del NCBI ARN RefSec.

Tabla 5. Listado de genes relacionados con senescencia celular, ya sea como parte de la ruta de "Senescencia y autofagia" con la referencia WP615 en la base de datos de acceso público de la Wikipathway o extraído de la bibliografía como característica del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). (1) Símbolo de genes HUGO (2) Parte de genes del SASP (3) Genes incluidos en la Wikipathway "Senescencia y autofagia" (4) Genes extraídos en relación con el SASP de Coppé *et al.*, 2010 (5) Gene extracted as associated to the SASP from Young *et al.*, 2009.

Tabla 6. Genes asociados a senescencia celular (ya sea formando parte de la "ruta de senescencia y autofagia" humana con la referencia WP615 en la base de datos de acceso público de Wikipathway o del listado de genes SASP extraídos de la bibliografía (Tabla 5)) que son genes expresados diferencialmente en células transducidas con rLV-EF1 lote B-S a una MDI de 150 en comparación con células no transducidas, que no son diferenciales en células transducidas con rLV-EF1 lote B y en células transducidas con lote C a una MDI de 150 en comparación con células no transducidas. Por "no diferencial", se entiende que el valor absoluto de FC es <1,3. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Número de registro de secuencias de proteínas de la base de datos del NCBI ARN RefSec.

Tabla 7. Diez biomarcadores asociados a senescencia celular. Estos genes se seleccionaron de la Tabla 6 como expresados diferencialmente en células transducidas con rLV-EF1 lote B-S a una MDI de 40 en comparación con células no transducidas y no diferenciales en células transducidas con rLV-EF1 lote B o C a una MDI de 40. Por "no diferencial" se entiende que el valor absoluto de FC es <1,3. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Número de registro de secuencias de proteínas de la base de datos del NCBI ARN RefSec. (6) a (11) valores de factor de cambio en cada condición transducida en comparación con la condición de control no transducido. ND: no estadísticamente diferencial. FC B-S frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B-S a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC B frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC C frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC B frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B a una MDI de 40 frente a células no transducidas. FC C frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote C a una MDI de 40 frente a células no transducidas. FC B-S frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B-S a una MDI de 40 frente a células no transducidas.

Tabla 8. Selección de genes no impactados con un vector de alta calidad. (1) Símbolo de genes HUGO (2) Descripción de genes del NCBI (3) Identificador de sondas Agilent, (4) Número de registro de secuencias de ácido nucleico de la base de datos del NCBI de ARN RefSec, (5) Número de registro de secuencias de proteínas

de la base de datos del NCBI ARN RefSec. (6) a (11) valores de factor de cambio en cada condición transducida en comparación con la condición de control no transducido. ND significa no estadísticamente diferencial. FC B-S frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B-S a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC B frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC C frente a NT MDI 150: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas. FC B frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B a una MDI de 40 frente a células no transducidas. FC C frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote C a una MDI de 40 frente a células no transducidas. FC B-S frente a NT MDI 40: Factor de cambio obtenido entre células transducidas con el lote B-S a una MDI de 40 frente a células no transducidas.

Tabla 9. Validación de genes del ciclo celular de la tabla 4 como biomarcadores con rLV-EF1-GFP a una MDI de 40.

Tabla 10. Secuencia de cebadores utilizados en el experimento de validación.

## 15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a comprender mejor la invención, aunque la invención no debe limitarse a estos ejemplos.

## 20 Materiales y Métodos

Construcción de plásmidos. Se utilizaron tres plásmidos para producir un virión recombinante o retrovirus recombinante. Un primer plásmido proporciona un ácido nucleico que codifica un gen gag y pol vírico (Figura 2A). Estas secuencias codifican un antígeno específico de grupo y transcriptasa inversa, (y enzimas integrasa y proteasa necesarias para la maduración y transcripción inversa), respectivamente, como se ha expuesto anteriormente. Un segundo plásmido proporciona un ácido nucleico que codifica una envoltura (env) vírica (Figura 2B), tal como del VSV-G (Virus G de la estomatitis vesicular). Un tercer plásmido proporciona las secuencias víricas que actúan en *cis* necesarias para el ciclo de vida del virus (Figura 2C). Este tercer plásmido también contiene un sitio de clonación para que una secuencia de ácido nucleico heteróloga se transfiera a una célula diana. En la Figura 2C se muestra una ilustración esquemática de un vector adecuado con la GFP como un transgén, pero que puede reemplazarse por cualquier gen o secuencia de interés tal como ADNc, ARNhc o miARN.

Procedimientos de fabricación de vectores víricos. Líneas celulares y condiciones de cultivo. Los vectores víricos se produjeron utilizando una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293T). Para la cuantificación de partículas infecciosas, se utilizó una línea celular de carcinoma de colon humano (HCT116; ATCC N<sup>o</sup>CCL- 247) adherente. Todas las células se obtuvieron en la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Paisley, RU) complementado con FCS al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. Para la producción de sobrenadantes de vectores víricos, el DMEM se complementó solo con penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 %.

Producción de vectores víricos. La producción de vectores víricos se realizó en una cámara de cultivo CellSTACK de 10 capas (6320 cm<sup>2</sup>, Corning). Células HEK293T se sembraron a 9,5x10<sup>3</sup> células viables/cm<sup>2</sup> en DMEM complementado con FCS al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % y se pusieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. Cuatro días después de la siembra, el sobrenadante se desechó y se reemplazó por DMEM reciente sin FCS complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina (PAA) al 1 % antes de transfectar las células.

La mezcla de tri-transfección estaba compuesta por los tres plásmidos siguientes: pENV, pGagPol (construcción de ADN vírico contenida en el hospedador bacteriano depositado en la Colección CNM respectivamente con el número de registro CNM I-4487 y CNM I-4488), y pLV-EF1 (construcción de ADN vírico procedente del contenido en el hospedador bacteriano depositado en la Colección CNM con el número de registro CNM I-4489). La concentración final se ajustó a 40 mg/ml-1 utilizando agua estéril. Después, a la mezcla de plásmido-agua se añadió por goteo CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) verificando con cuidado hasta alcanzar una concentración final de 500 mM. La mezcla obtenida se añadió después por goteo a un volumen equivalente de solución salina tamponada con Hepes (HBS, siglas del inglés *Hepes Buffered Saline 2X*) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la incubación, la mezcla de transfección se añadió al medio de cultivo celular y se incubó durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire.

Veinticuatro horas después de la transfección, el sobrenadante se desechó y se reemplazó por DMEM reciente no complementado y las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. Después del intercambio de medio, el sobrenadante se recogió varias veces (32 h, 48 h, 56 h y 72 h post transfección). Se añadieron algunos medios recientes y no complementados y las células se incubaron antes de recogerlas a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Cada recogida se clarificó por centrifugación durante 5 min. a 3 000 g antes de microfiltrarse a través de una unidad de filtro estéril de 0,45 µm de poro (Stericup, Millipore). Después, todo el conjunto de la recogida se agrupó para

suministrar la recogida en bruto para obtener el Lote A (composición de vectores víricos en bruto).

Concentración y purificación de vectores víricos. Las composiciones de vectores víricos utilizadas para identificar biomarcadores de la presente invención se obtienen mediante un procedimiento de concentración estándar y normalmente utilizado, ya sea mediante ultracentrifugación o centrifugación en unidades centrales (correspondientes a la obtención del lote B), o mediante procedimientos de concentración y/o purificación (C y D) asociados a un procedimiento de producción sin suero (correspondiente a la obtención del lote A), como se describe en la solicitud PCT WO 2013/014537 incorporada por referencia en este documento en su totalidad. Para experimentos de validación se produjo otro lote UC (o UC-S), obtenido en presencia de suero y concentrado por ultracentrifugación. Los diferentes lotes corresponden a diferentes estrategias de purificación que van desde la no purificación hasta varias etapas de purificación basadas en ultrafiltración y cromatografía. La concentración y purificación de la recogida en bruto se realizó primero mediante ultrafiltración de flujo tangencial utilizando cartuchos de polisulfona de fibra hueca. Después, el sobrenadante se diafiltró durante 20 diavolumenes en un modo continuo de diafiltración contra DMEM o tampón TSSM. Una vez realizada la diafiltración, el retenido se recuperó y se concentró adicionalmente en unidades de ultrafiltración desechables. El retenido de filtración en fibra hueca (HFF, *hollow fiber filtration*) se trató después con benzonasa añadiendo Benzonasa (250 U/μl) para una concentración final de (72 U/ml) y MgCl<sub>2</sub> (1,0 mM) para una concentración final de 1 μM, antes de incubar a 37 °C durante 20 minutos.

El material posterior a la HFF puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX) en una membrana Sartobind Q75 (Sartorius) desechable utilizando un sistema purificador AKTA (GE Healthcare). La membrana de intercambio iónico se equilibraría con 5 volúmenes de columna de DMEM (o TSSM) no complementado a 2 ml/min. Después, el sobrenadante vírico se cargaría en la membrana a 2 ml/min utilizando un circuito de muestreo. El flujo a través sería recogido. Al sistema AKTA se le puede aplicar el siguiente gradiente en etapas: NaCl 0 M, 0,5 M, 1,2 M y 2 M. El pico de elución (recogida con el gradiente en etapas de NaCl 1,2 M) se diluiría inmediatamente 10 veces en el siguiente tampón: Tris 20 mM + Sacarosa al 1,0 % p/v + Manitol al 1,0 % p/v, pH 7,3 y se concentró adicionalmente en unidades de ultrafiltración desechables.

Composiciones de vectores víricos. Las composiciones de vectores víricos se obtienen por el método descrito en la solicitud PCT WO 2013/014537 incorporada por referencia en su totalidad en el presente documento. Las composiciones resultantes son

- Lote B obtenido después de la centrifugación en unidades centrales del lote A;
- Lote C obtenido después de diafiltración ultrafiltración tangencial del lote A;
- Lote C-S obtenido después de diafiltración ultrafiltración tangencial del lote A producido en presencia de suero bovino fetal al 10 % (BIOWEST). Este lote solo se utiliza en la figura 13;
- Lote B-S obtenido en presencia de suero bovino fetal al 10 % (BIOWEST) mediante el mismo procedimiento que el del lote B sin suero;
- Lote UC o UC-S obtenido en presencia de suero bovino fetal al 10 % (BIOWEST) y concentrado por ultracentrifugación.

Los procedimientos utilizados para obtener estos lotes se describen en las Figuras 1A y 1B.

Cuantificación de partículas funcionales utilizando qPCR. Los ensayos de titulación de unidades de transducción se realizaron de la siguiente manera. Células HCT116 se sembraron en una placa de 96 pocillos a 12 500 células por pocillo y 250 μl de DMEM complementado con FCS al 10 %; penicilina/estreptomicina al 1 % y ultraglutamina al 1 % (medio completo). Veinticuatro horas después, se realizan cinco diluciones en serie con medio completo para cada muestra de vector y para un rLV-EF1-GFP conocido como un patrón interno (construcción de ADN vírico contenido en el hospedador bacteriano depositado en la Colección CNCM con el número de registro CNCM I-4489). Las células son transducidas con estas diluciones en serie en presencia de Polybrene® (Sigma) 8 μg/ml. Para cada serie de muestras, para el control se añade un pocillo de células no transducidas. Tres días después de la transducción, las células se tripsinizan y cada sedimento celular se recoge con 250 μl de PBS, el ADN genómico se extrae y se somete a qPCR. Los resultados se normalizan con el patrón interno conocido rLV-EF1-GFP que previamente se tituló con FACS, utilizando 100 μl de la suspensión celular. El título se expresa mediante unidades de transducción/ml (UT/ml) utilizando el patrón interno cuyo título se determinó previamente mediante FACS (Canto II) utilizando condiciones estándar considerando el porcentaje de células positivas.

Cuantificación de partículas físicas mediante ELISA del antígeno p24. El antígeno p24 principal se detecta directamente en el sobrenadante vírico con un kit de ensayo ELISA del antígeno p24 del VIH-1 proporcionado por Perkin Elmer. El kit se utiliza según lo especificado por el proveedor. El antígeno capturado está formando un complejo con un anticuerpo policlonal biotinilado contra el antígeno p24 del VIH-1, seguido de un conjugado de estreptavidina conjugada con HRP (del inglés *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante). El complejo resultante se detecta por incubación con ortofenilendiamina-HCl (OPD) que produce un color amarillo que es directamente proporcional a la cantidad capturada de antígeno p24. La absorbancia de cada pocillo de la microplaca se determina utilizando un lector de microplacas y se calibra frente a la absorbancia de una curva patrón del antígeno p24 del VIH-1. El título vírico expresado en partículas físicas por ml se calcula a partir de la cantidad de p24, sabiendo que 1 pg de p24 corresponde a 10<sup>4</sup> partículas físicas.

Producción de un vector de casete vacío para análisis con micromatrices. Para los estudios con micromatrices, se produjo un vector lentivírico sin ADNc (rLV-EF1) a diferentes purezas. Los lotes B y C de los vectores rLV-EF1 se purificaron a partir de la misma recogida en bruto. Se obtuvo una producción adicional en presencia de suero bovino fetal al 10 % (BIOWEST) para generar un lote B que contenía suero, en lo sucesivo mencionado en el presente documento como lote B-S.

Producción de vectores lentivíricos que expresan GFP. Se produjeron lotes B, C, B-S independientes de vectores lentivíricos que expresan GFP.

Para proporcionar otro tipo de vector concentrado de baja calidad, se utilizó el método de ultracentrifugación para concentrar los vectores producidos en presencia de suero al 10 % (Lote UC o UC-S).

Cultivo de células de prepucio. Se obtuvieron células de fibroblastos de prepucio humano de la Colección Americana de Cultivos Tipo (N<sup>o</sup>CRL-2097) y se cultivaron en EMEM (Medio Esencial Mínimo de Earl's, GIBCO) complementado con suero bovino fetal al 10 % (BIOWEST), penicilina/estreptomina (PAA) al 1 % y glutamina 2 mM. Las células se mantuvieron a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % y se pasaron dos veces por semana a 5 000 células/cm<sup>2</sup>.

Transducción de células de prepucio para análisis de transcriptómica. Veinticuatro horas antes de la transducción, se sembraron fibroblastos de prepucio humano a 5 000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T25. Las células se transdujeron por cuadruplicado a una MDI de 40 y 150 utilizando los lotes B, C y B-S del vector rLV-EF1 en un volumen final de 5 ml y en presencia de 4 µg/ml de Polybrene® (Sigma). Un control no transducido solo recibió 4 µg/ml de Polybrene®. El sobrenadante de transducción se eliminó después de aproximadamente 16 h. Las células se tripsinizaron 54 horas después de la transducción, se lavaron con 1x PBS, se centrifugaron y los sedimentos se mantuvieron a -80 °C. Cuarenta y ocho horas después de la transducción se hicieron fotografías.

Veinticuatro horas antes de la transducción, se sembraron fibroblastos de prepucio humano a 5 000 células/cm<sup>2</sup> en una placa múltiple de 6 pocillos. Las células se transdujeron por cuadruplicado a una MDI de 40 y 150 utilizando los lotes B, C, B-S y UC (o UC-S) del vector rLV-EF1-GFP en un volumen final de 5 ml y en presencia de 4 µg/ml de Polybrene® (Sigma). Un control no transducido solo recibió 4 µg/ml de Polybrene®. El sobrenadante de transducción se eliminó después de aproximadamente 16 h. Las células se tripsinizaron 54 horas después de la transducción, se lavaron 1 vez con PBS, se centrifugaron y los sedimentos se mantuvieron a -80 °C. Cuarenta y ocho horas después de la transducción se hicieron fotografías.

Extracciones de ARN. Se extrajeron muestras de ARN total de los sedimentos celulares utilizando el Sistema de purificación de ARN TRIzol® Plus (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN total y la pureza se determinaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies). La calidad y la integridad del ARN se verificaron con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE. UU.) y se ajustaron a las necesidades de las micromatrices de Agilent.

Experimentos con micromatrices de ADN. Los experimentos con micromatrices se llevaron a cabo en la plataforma Biochips de Genopole, Universidad de Toulouse, INSA, UPS, INP, CNRS e INRA (Toulouse, Francia) de acuerdo con los protocolos del fabricante. En resumen, después de la adición de una dilución de una dilución de ARN exógeno del kit Spike-In de ARN de un color (Agilent Technologies) para verificar la calidad, 100 ng de ARN total se transformaron en ARNc, se amplificaron y se marcaron con cianina 3 utilizando el kit Low Input Quick Amp de Agilent. 1650 ng de ARNc marcado con cianina 3 se hibridaron a 65 °C durante 17 horas a 10 rpm con oligomicromatrices de todo el genoma humano de Agilent 4x44K versión 2, que contenían 44 000 sondas (que consistían en oligonucleótidos de 60 metros de longitud) dirigidas a 27 958 genes. Las matrices hibridadas se lavaron y se escanearon en el escáner de alta resolución G2505C de Agilent y las imágenes se analizaron utilizando Feature Extraction 10.10 (Agilent Technologies). Después del control de calidad basado en informes de control de calidad de Feature Extraction, se conservaron 3 o 4 copias por condición. Con respecto al experimento de validación con rLV-EF1-GFP, se utilizó la versión Feature Extraction 11.5.

Análisis estadísticos de datos de micromatrices. Los conjuntos de datos sin procesar de Feature Extraction se importaron al programa informático GeneSpring® GX 12 (Agilent Technologies) y se normalizaron utilizando los métodos del percentil 75. Después, las sondas se filtraron por valores indicadores atribuidos por GeneSpring® al importar datos de Feature Extraction (para cada sonda, se ve afectado uno de los siguientes indicadores: "detectada", "no detectada" o "comprometida", utilizando los parámetros por defecto de GeneSpring®). Las sondas detectadas y no comprometidas en más del 60 % de las copias en al menos una condición se conservaron (eliminando puntos no detectados o comprometidos). Para las representaciones de gráficos de perfil, se aplicó una transformación inicial de los valores de intensidad a la mediana de todas las muestras. Esto significa que, para cada sonda, la mediana de los valores log resumidos de todas las muestras se calcula y se resta de cada una de las muestras. Para identificar sondas expresadas diferencialmente entre cada condición y la condición de control, se realizaron pruebas de la f independientes con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg y un valor de  $p < 0,05$  corregido. Las sondas con valores absolutos de factores de cambio (FC)  $\geq 1,5$  se conservaron como sondas expresadas diferencialmente reguladas positiva y negativamente.

Análisis funcional de datos con micromatrices. Las anotaciones proporcionadas por Agilent e incluidas en GeneSpring® se basan en un conjunto de datos denominado 'tecnología' en GeneSpring® y recibe el nombre de 26652 versión 2012.1.10. Para cada sonda, se proporcionan diferentes tipos de anotaciones, incluido el símbolo del gen, la descripción, los términos de ontología génica, el número de registro de ARN RefSec entre otros datos. Cabe señalar que solo un transcrito de RefSec se asocia a cada sonda, aunque una sonda puede dirigirse a varias transcripciones alternativas del mismo gen. La opción de ontología génica (GO) en GeneSpring® GX 12 se utilizó para determinar los procesos biológicos más significativos (valor de  $p < 0,1$  corregido) representados en listados de sondas expresadas diferencialmente, en comparación con el genoma humano completo. El análisis de rutas se utilizó para encontrar relaciones directas entre entidades de interés. Esto se realizó en GeneSpring® con el algoritmo "Análisis de un solo experimento". Las fuentes de la ruta humana seleccionadas fueron rutas curadas a las que se hace referencia en WikiPathways incluidas por defecto en GeneSpring® GX 12. Se conservaron rutas con un valor de  $p < 0,05$  y un número mínimo de 5 genes.

RT-PCR Cuantitativa (RT-qPCR) Relativa. Un total de 1 µg de ARN total de cada muestra se retrotranscribió utilizando el kit de síntesis de ADNc Superscript III RT (Life Technologies) y oligo(dT)<sub>12-18</sub> de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de ADNc se mezclaron después con supermezclas de qPCR SYBR® GreenER™ de ABI PRISM (Life Technologies) y cebadores específicos sintetizados por Eurogentec (Bélgica). como control interno para normalizar los niveles de transcripción se utilizó GAPDH. Todos los cebadores se diseñaron utilizando el programa informático Primer 3 versión V.0.4.0 y sus características se resumen en la tabla 1. Se realizó PCR en tiempo real por duplicado, de al menos dos muestras independientes, utilizando un instrumento StepOne (Applied Biosystems) y la cuantificación relativa se calculó mediante el método 2- $\Delta\Delta C_T$  (Livak *et al.* 2001). Para el experimento de validación, se utilizaron cebadores adicionales enumerados en la tabla 10 y se realizó RT-qPCR por duplicado a partir de tres muestras independientes. Para evaluar la importancia de las expresiones diferenciales de genes, para comparar valores de  $\Delta\Delta C_T$  entre condiciones se realizaron pruebas de la *f* de Student para datos independientes, con un valor de *p* límite de 0,05.

## Resultados

### Identificación de biomarcadores candidatos

Impacto sobre la proliferación de células cultivadas transducidas con una composición de vector vírico extremadamente purificada frente a una composición corriente y concentrada de vector vírico. Para evaluar los efectos de la transducción del vector vírico de acuerdo con el nivel de pureza e independientemente de cualquier transgén, células de fibroblastos de prepucio se transdujeron a una MDI de 40 y 150 con dos composiciones de rLV-EF1 (sin ADNc), el lote B y el lote C (descritos anteriormente) procedentes de la misma recogida en bruto (lote A) y cuyas características se resumen en la Figura 1A. Las células se observaron 48 horas después de la transducción como se presenta en la Figura 2B.

Se observó un ligero retraso del crecimiento a una MDI de 40 con células transducidas del lote B en comparación con células no transducidas, aunque no se notó ninguna diferencia de crecimiento después de la transducción del lote C a la misma MDI.

Por tanto, a una MDI habitual (normalmente se utiliza una MDI de 40 para la transducción de células de prepucio), la composición de vector vírico extremadamente purificada (lote C) no induce un efecto visible en el crecimiento de las células transducidas, mientras que la composición de vector vírico concentrada, corriente (lote B) parece tener un impacto negativo en el crecimiento de las células transducidas.

A una MDI de 150, se pudo observar una fuerte detención de la proliferación con las células transducidas del lote B en comparación con las células no transducidas, mientras que solo se observó un retraso moderado del crecimiento con el lote C.

Impacto sobre células del transcriptoma en células transducidas con una composición de vector vírico extremadamente purificada frente a una composición corriente y concentrada de vector vírico. Como ejemplo, la composición de vector vírico concentrada, corriente se refiere al lote B obtenido con suero (B-S). Para explorar los cambios subyacentes a nivel transcripcional, estas células se recogieron 54 horas después de la transducción. Este retraso de 54 horas después de la transducción se determinó según corresponda a partir de un estudio preliminar, ya que se produjo entre el momento en que apareció un retraso de crecimiento en las células transducidas frente a las células no transducidas, y el momento en que las células no transducidas alcanzaron la confluencia (datos no mostrados). El ARN se extrajo y se utilizó para realizar micromatrices de todo el genoma humano de Agilent, lo que permitió la cuantificación de casi todas las transcripciones humanas.

Cambios transcripcionales observados a una MDI de 150. En primer lugar, los niveles de ARN de células transducidas con rLV-EF1 lote B y rLV-EF1 lote C a una MDI de 150 se compararon con el ARN de células no transducidas. Después de realizar los análisis estadísticos, se conservaron las sondas reguladas positiva o negativamente 1,5 veces o más, para cada comparación.

Como se muestra en las Figuras 3a y 3b, un número de 1 027 sondas se expresaron diferencialmente en células transducidas después de la transducción del lote B y un número de 906 sondas se expresaron diferencialmente en células transducidas después de la transducción del lote C, en comparación con las células no transducidas. Las sondas reguladas negativamente fueron casi dos veces tan numerosas que las reguladas positivamente (703 y 650 sondas reguladas negativamente, respectivamente, para células transducidas con el lote B y lote C).

La comparación de los genes regulados negativamente a una MDI de 150 muestra que la mayoría de los genes regulados negativamente fueron comunes al análisis del transcriptoma de las células transducidas con el lote B frente al transcriptoma de las células no transducidas, y al análisis del transcriptoma de las células transducidas con el lote C frente al transcriptoma de las células no transducidas, excepto por un conjunto de genes específicos de lote que impactan específicamente en el transcriptoma de células transducidas con lote B o el transcriptoma de células transducidas con lote C. Como se muestra en el diagrama de Venn en la Figura 4, 560 sondas reguladas negativamente representan la intersección de los dos listados de sondas reguladas negativamente. Por tanto, hay un conjunto de 560 sondas que normalmente impactan en el transcriptoma de las células transducidas con el lote B o C frente al transcriptoma de células no transducidas.

Un análisis de Ontología Génica (GO) con GeneSpring® en estas 560 sondas reveló que los genes del ciclo celular estaban sobrerrepresentados de manera significativa con 239 sondas (que representan 204 genes distintos entre los 1 004 genes humanos comprendidos en la categoría GO del "ciclo celular"). Estos genes se presentan en la Tabla 2, clasificados por aumento de valores de FC. Muchos otros términos de GO estaban sobrerrepresentados de manera significativa, relacionándose la mayoría con el ciclo celular. En particular, todas las categorías de GO correspondientes a las fases y transiciones de cada ciclo celular se vieron impactadas significativamente.

Para avanzar aún más con el análisis de las 560 sondas comunes de regulación negativa, se realizó un análisis de la ruta en este listado utilizando GeneSpring®. La primera ruta humana resultante fue la ruta humana del "ciclo celular" con la referencia WP179 en la base de datos de Wikipathway de acceso público de julio de 2012 con 37 genes cuyo nivel de expresión estaba impactado. Las rutas humanas de "control del ciclo celular G1 a S" (referencia WP45 en la base de datos de Wikipathway de acceso público de julio de 2012), Las rutas humanas de las "fases G2-G2/M mitóticas" (referencia WP1859 en la base de datos de Wikipathway de acceso público de julio de 2012) y de "fases MM/G1 mitóticas" (referencia WP1860 en la base de datos de Wikipathway de acceso público de julio de 2012) también resultaron estar impactadas de manera significativa. Por lo tanto, todas las fases del ciclo celular parecen estar impactadas con importantes regulaciones negativas. La detención del ciclo celular en el punto de control G2-M se confirmó mediante regulación negativa de CDC25C, Ciclina B1 y CDC2 (nomenclatura de genes HUGO) asociadas a una regulación positiva de p21 (Chiu *et al*/2011). Otros bloqueos deben ser confirmados.

Entre los genes indicados en la categoría de GO del "ciclo celular", el marcador de proliferación MKI67 fue extremadamente regulado negativamente, con un valor de FC promedio de -8,6 y -5,6 (valor de FC promedio obtenido con los valores de las 3 sondas que representan este gen) en el transcriptoma de células transducidas respectivamente con el lote B y el lote C, frente al transcriptoma de células no transducidas. Estos valores se correlacionan con el retraso de proliferación observado, que fue más pronunciado después de la transducción del lote B en comparación con la transducción del lote C.

Como se observa en la Figura 5, se observó una diferencia de FC similar casi sistemáticamente entre las dos condiciones (es decir, lote B y lote C), con un 30 % promedio menor de FC para estos genes a nivel de transcripción en células transducidas con el lote B frente al nivel de transcripción en células no transducidas en comparación con el nivel de transcripción en células transducidas con el lote C frente al nivel de transcripción en células no transducidas. Esta observación se basa en la selección de sondas impactadas en células transducidas con el lote B a una MDI de 150, con valores de FC  $\leq -3$ . La diferencia de FC fue de al menos 10 %, a excepción de 5 genes de esta selección las regulaciones negativas de los genes del ciclo celular son más pronunciadas en las células transducidas con el lote B frente a las células no transducidas en comparación con las células transducidas con el lote C frente a las células no transducidas.

De manera destacable, 6 genes indicados en la GO como "ciclo celular" se regularon positivamente con los dos lotes (es decir, el lote B y el lote C) en comparación con las células no transducidas: CDKN1A, MDM2, TP53INP1, TGFB2, CDH13, RASSF2 de acuerdo con la nomenclatura de genes HUGO (como se presenta en la Tabla 3). Cabe señalar que CDKN1A, que codifica la proteína p21, corresponde a un inhibidor del ciclo celular, y que su sobreexpresión es más fuerte en las células transducidas con el lote B frente a las células no transducidas que las células transducidas con el lote C frente a las células no transducidas.

Cambios transcripcionales observados a una MDI de 40. Después, los niveles de ARN de las células transducidas con rLV-EF1, lotes B y C a una MDI de 40, se compararon con los del ARN de células no transducidas. Después de realizar los análisis estadísticos, las sondas reguladas positiva o negativamente 1,5 veces o más se conservaron para cada comparación.

Entre las 239 sondas reguladas negativamente del ciclo celular a una MDI de 150 con rLV-EF1 lote B o C frente a las células no transducidas, solo 31 sondas (que representan 28 genes) también se infraexpresaron a una MDI de 40

con el lote B frente a las células no transducidas, y entre ellas, 10 sondas se regularon negativamente con el lote C frente a las células no transducidas a la misma MDI. Los FC estuvieron comprendidos entre -1,5 y -2 a una MDI de 40, aunque estaban comprendidos entre -1,5 y -19 a una MDI de 150, mostrando que el impacto en el ciclo celular fue profundamente más fuerte a una MDI de 150 en comparación con una MDI de 40.

5 Finalmente, hubo 18 genes del ciclo celular impactados con valores de  $FC \leq -1.5$  solo con el lote B, estando el FC por encima del límite de -1,5 para el lote C a una MDI de 40. Estos genes son: ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A, TTK de acuerdo con la nomenclatura de genes HUGO (Tabla 4), que corresponde a los primeros genes del ciclo celular impactados en respuesta al contacto de las células con un vector vírico, y su desregulación se produce antes con un lote de vectores de baja calidad en comparación con un lote de vectores extremadamente purificado. Por tanto, dichos genes podrían utilizarse como marcadores tempranos de un impacto de una composición de vector vírico en el ciclo celular de células diana.

15 Validaciones mediante PCR cuantitativa. Este ejemplo describe la validación técnica posterior de la infraexpresión de genes del ciclo celular mediante RT-qPCR. Para confirmar los valores de expresión diferencial obtenidos de experimentos con micromatrices, se escogió un conjunto de 5 genes del ciclo celular (E2F8, MKI67, NEK2, AURKB, CENPA de acuerdo con la nomenclatura de genes HUGO) entre las 10 sondas más infraexpresadas en células transducidas con el lote B en comparación con las células no transducidas a una MDI de 150, la RT-qPCR se realizó en ARN de células transducidas con el lote B y el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas. Los resultados, presentados en las Figuras 6A y 6B, confirman la infraexpresión de estos genes y la regulación negativa más fuerte resultante de la transducción con el lote B en comparación con la transducción del lote C.

25 Impacto sobre el transcriptoma celular de un lote de vector vírico producido con suero. Para evaluar los efectos de la composición del medio con los vectores después de la producción de la composición de vector vírico con suero, el vector rLV-EF1 (sin ADNc) se produjo en presencia de suero al 10 % y se concentró utilizando el procedimiento B, dando un lote B-S, cuyas características se resumen en la Figura 7B. Este lote se utilizó para transducir células de prepucio a una MDI de 40 y de 150.

30 Como se muestra en la Figura 7A, las células se observaron 48 horas después de la transducción. Se compara una detención del crecimiento de las células transducidas con el lote B-S con las células no transducidas. Esta detención del crecimiento es más fuerte a una MDI mas alta (MDI de 150) en comparación con una MDI de 40. De manera destacable, pudieron observarse agregados en las células transducidas con el lote B-S, y su volumen aumenta con la MDI. Estas células se recogieron 54 horas después de la transducción para extracciones de ARN e hibridaciones en micromatrices. Sorprendentemente, durante la tripsinización, las células transducidas con el lote B-S fueron más difíciles de separar que las células transducidas con el lote B o C o con células no transducidas. Los niveles de ARN de las células transducidas con el lote B-S a una MDI moderada o más alta se compararon con los del ARN de células no transducidas utilizando micromatrices de todo el genoma humano de Agilent. Después de realizar los análisis estadísticos, se conservaron las sondas reguladas positiva o negativamente 1,5 veces o más, para cada comparación.

45 Cambios transcripcionales observados en células transducidas con el lote B-S a una MDI de 150 frente a células no transducidas. Como se muestra en la Figura 8, 1 019 sondas fueron significativamente diferenciales en las células transducidas con el lote B-S a una MDI de 150 en comparación con las células no transducidas. El análisis de rutas de GeneSpring® en este listado reveló que la Wikipathway de "senescencia y autofagia" humana (referencia WP1267 en la base de datos de la Wikipathway) se vio impactada significativamente con 10 genes diferenciales: BMP2, COL1A1, CXCL1, GABARAPL1, HMGA1, IGF1, IL1B, MMP14, PLAT, SERPINB2 según la nomenclatura de genes HUGO (otras rutas impactadas: ciclo celular, MAP cinasa, adhesión focal...).

50 Para el análisis, se seleccionaron diversos genes complementarios asociados al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) pero no incluidos en la ruta de senescencia y autofagia de la Wikipathway. El listado se extrajo de los datos de la bibliografía (Coppé *et al.* 2010 y Young *et al.* 2009). En la Tabla 5 se representa un listado relevante definido de genes asociados a senescencia celular de la ruta de "senescencia y autofagia" y de la bibliografía.

55 Finalmente, 20 genes pertenecientes a la ruta de "senescencia y autofagia" o asociados al SASP (AREG, BMP2, COL1A1, CXCL1, CXCL2, EREG, GABARAPL1, HMGA1, ICAM1, IGF1, IL1B, MMP1, MMP14, MMP3, NRG1, PLAT, PLAU, PLAUR, SERPINB2 y TNFRSF10C según la nomenclatura de genes HUGO, no representados en las Tablas) se seleccionaron porque parecían expresarse diferencialmente en células transducidas con el lote B-S en comparación con células no transducidas. Por otra parte, varios genes de colágeno se regularon negativamente y el gen PTGS2 fue reguló positivamente: estos genes también participan en el proceso biológico de senescencia (Coppe *et al.* 2010).

65 Entre los 20 genes pertenecientes a la ruta de "senescencia y autofagia" o asociados al SASP identificados anteriormente, 10 genes no impactaron en las células transducidas con el lote B o C en comparación con las células no transducidas, a una MDI de 150 (AREG, BMP2, EREG, HMGA1, ICAM1, MMP1, MMP14, NRG1, PLAT y PLAUR

según la nomenclatura de genes HUGO). Por "no impactado", se entiende que el valor absoluto de FC es <1,3.

Otros 6 genes también impactaron en células transducidas con lote B o C frente a células no transducidas pero de una manera opuesta a medida que se producían cambios durante la senescencia celular (COL1A1, CXCL1, CXCL2, GABARAPL1, IGF1 y PLAU según la nomenclatura de genes HUGO). Finalmente, 16 genes presentaron un perfil de expresión característico de la aparición de senescencia celular solo en respuesta al lote B-S, en comparación con otros lotes a una MDI de 150. Estos 16 genes se presentan en la tabla 5.

Cambios transcripcionales observados en células transducidas con el lote B-S a una MDI de 40 frente a células no transducidas. Se examinaron sondas expresadas diferencialmente con el lote B-S a una MDI de 40. Como se muestra en la Figura 9, 2 841 sondas se expresaron diferencialmente de manera significativa en comparación con el control no transducido. Como se muestra en la Figura 10, 631 sondas seguían siendo diferenciales entre las 1 019 sondas diferenciales a una MDI más alta.

Para identificar las sondas asociadas a vectores producidos con suero, se seleccionaron sondas que se expresaron diferencialmente en células transducidas con el lote B-S (a ambas MDI) frente a la condición no transducida, y que no fueron diferenciales en células transducidas con los lotes B y C (a ambas MDI). El conjunto correspondiente de 235 genes se representa en el gráfico de perfil que se muestra en la Figura 11. Por "no diferencial", se entiende que el valor absoluto de FC es <1,3.

Dentro de este listado de 235 genes, se seleccionaron genes asociados a senescencia celular para identificar biomarcadores tempranos de la aparición de un fenotipo senescente en células que se habían puesto en contacto con un vector vírico. Se obtuvo un listado de 10 genes asociados a senescencia celular, que podrían ser biomarcadores candidatos que revelan un impacto negativo de una composición de vector vírico en las células que se van a transducir. Estos genes son GABARAPL1, IGF1, PLAU, BMP2, EREG, MMP1, MMP14, NRG1, PLAT y PLAUR según la nomenclatura de genes HUGO (para más detalles véase la tabla 7).

Selección de listados de genes restringidos no impactados con un vector de alta calidad. Este ejemplo desvela una selección de genes no impactados por el lote C (a ambas MDI) e impactados con otros lotes. Mientras que la mayoría de los genes expresados diferencialmente se expresan comúnmente en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas y células transducidas con el lote C frente a células no transducidas a una MDI de 150, algunos genes muestran diferentes patrones de expresión.

Para seleccionar genes impactado específicamente en células que se han puesto en contacto con una composición de vector de baja calidad, se seleccionaron sondas que no se expresaron diferencialmente con el lote C (FC elegido entre -1,2 y 1,2) y que se expresaron diferencialmente en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas a una MDI de 40 y de 150. La selección correspondiente da como resultado un gen: CXCL2. Otros dos genes comparten el mismo perfil, excepto por valores reducidos de FC para B frente a NT a una MDI de 40 (valores absolutos comprendidos entre 1,3 y 1,5): FOXQ1 y ZNF547 (ID de sonda Agilent: A\_33\_P3352822, número de registro de ARNm RefSec: NM\_173631, número de registro de proteínas RefSec: NP\_775902).

Curiosamente, CXCL2 y FOXQ1 también son diferenciales cuando se comparan las células transducidas con el lote B-S frente a las células no transducidas a una MDI de 150 pero con una evolución opuesta, ya que son células sobreexpresadas transducidas con el B-S de lote frente a células no transducidas, aunque están infraexpresadas en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas.

Otro gen presenta un perfil de expresión interesante: MAP3K8. La sonda correspondiente no se seleccionó inicialmente ya que no era estadísticamente diferencial a una MDI de 40 cuando se comparaban las células transducidas con el lote B con las células no transducidas, pero pudo observarse una ligera diferencia al examinar los valores de intensidad, correspondientes a un valor de FC de -1,2, confirmando así la tendencia a la regulación negativa observada a una más alta MDI. Este gen está regulado negativamente en células transducidas con los lotes B y B-S frente a células no transducidas y no es diferencial en células transducidas con lote C a ambas MDI.

Estos tres genes (CXCL2, FOXQ1 y MAP3K8 según la nomenclatura de genes HUGO), mostrados en la Tabla 8, son por tanto biomarcadores para su uso en la práctica de la invención, ya que su expresión impacta específicamente cuando se transducen células con un lote de vectores de baja calidad, y no se ve afectada por una transducción de vectores de alta calidad.

Validación de biomarcadores candidatos.

Para validar la respuesta de biomarcadores candidatos en función de la calidad del lote del vector lentivírico, se realizó un experimento independiente. Células de fibroblastos de prepucio se transdujeron a una MDI de 40 y 150 con cinco composiciones de rLV-EF1-GFP: lote B, lote C, lote C- S, lote B-S y lote UC (o UC-S) (descritos anteriormente) y cuyas características se resumen en la Figura 12. Estos lotes se caracterizaron profundamente para garantizar las comparaciones más exactas entre las condiciones. Las células se observaron 48 horas después de la transducción como se presenta en la Figura 13. A una MDI de 40, se confirmó un retraso en el crecimiento con

- células transducidas con el lote B en comparación con células no transducidas, así como la ausencia de retraso visible con el lote C. Los restantes lotes producidos con suero, indujeron retrasos en la proliferación celular, de manera similar al lote B. Por tanto, la tasa de proliferación con el lote B es mejor que con el lote B-S, y la tasa de proliferación con el lote C es mejor que con el lote B. A una MDI de 150, el único lote que no afecta a la proliferación celular es el lote C. Se observa una fuerte detención de la proliferación con células transducidas con el lote B en comparación con células no transducidas, lo que confirma los resultados anteriores. Los lotes B-S y UC también indujeron fuertes retrasos de crecimiento. El impacto sobre el crecimiento celular observado con el lote C-S fue menor que con los lotes B, B-S y UC, siendo apenas ligeramente más intenso que con el lote C.
- Impacto sobre el transcriptoma de células transducidas. Para explorar los cambios subyacentes a nivel transcripcional, estas células se recogieron 54 horas después de la transducción. Los ARN se extrajeron y se utilizaron para experimentos de validación posteriores.
- Cambios transcripcionales observados a una MDI de 40. Se utilizó ARN de células transducidas a una MDI de 40 con vectores de los lotes B, C y B-S y de células NT para realizar micromatrices de todo el genoma humano de Agilent. Los niveles de ARN de células transducidas con rLV-EF1-GFP lotes B, C y B-S a una MDI de 40 se compararon con los de ARN de células no transducidas. Después de realizar los análisis estadísticos, las sondas reguladas positiva y negativamente 1,5 veces o más se conservaron para cada comparación.
- Categoría de genes del ciclo celular.
- Dentro de las sondas reguladas negativamente para B frente a NT y C frente a NT, las sondas del ciclo celular siguen siendo predominantes, con 209 sondas en 496 sondas reguladas negativamente para C frente a NT, y 236 en 591 sondas reguladas negativamente para B frente a NT.
- Las sondas correspondientes a genes del ciclo celular previamente seleccionadas en la figura 5 que están reguladas negativamente con  $FC \leq -3$  con el lote B de rLV-EF1 a una MDI de 150 frente a NT, seguían reguladas negativamente con rLV-EF1-GFP lote B y lote C a una MDI de 40 (fig. 14 y tabla 9). A excepción de 4 sondas, la regulación negativa fue más fuerte con el lote B que con el lote C, confirmando el mayor impacto en el ciclo celular con un lote de vector no extremadamente purificado.
- De manera similar, los genes del ciclo celular regulados positivamente correspondientes a la tabla 3 siguen regulándose positivamente con el vector rLV-EF1-GFP lote B o lote C, como se muestra en la figura 15 y en la tabla 9. Esta regulación positiva es más fuerte con el lote B que con el lote C en comparación con NT, a excepción de CDKN1A que muestra una regulación positiva de 1,6 veces con los 2 lotes.
- Los 18 genes del ciclo celular seleccionados en la tabla 4 como biomarcadores candidatos, muestran una regulación negativa después de la transducción con los vectores rLV-EF1-GFP de los lotes C y C a una MDI de 40 en comparación con NT (Nota: RRM2 solo está regulado negativamente con un FC de -1,3 con el lote C frente a NT). El gráfico de perfil presentado en la figura 16 confirma una regulación negativa más fuerte de estos genes con el lote B en comparación con el lote C. El marcador de proliferación MKI67 también se representa en la figura 16 y muestra una regulación negativa más pronunciada con el lote B que con el lote C en comparación con NT, lo que confirma los resultados anteriores.
- Comportamiento de genes del ciclo celular con el lote B-S. Como se muestra en el gráfico de perfil presentado en la figura 17, la regulación negativa de los 18 genes del ciclo celular de la tabla 4 y de MKI67 es similar con el lote B-S en comparación con el lote C (excepto para un gen: RRM2, que se regula negativamente en la misma proporción con los lotes B y B-S, y apenas se ve impactado con el lote C).
- Se puede establecer la hipótesis de que esta última observación está relacionada con la presencia de factores de crecimiento del suero, que podría concentrarse conjuntamente con el vector, e impedir la regulación negativa de los genes del ciclo celular, incluso si las células no están creciendo tan bien como las células transducidas con el lote C.
- Validaciones mediante RT-qPCR
- Se realizó RT-qPCR en los genes del ciclo celular MKI67 y E2F8 con tres objetivos:
- 1/ validación de expresiones de genes diferenciales obtenidas a una MDI de 40 para los lotes B, C y B-S en micromatrices con una técnica de cuantificación de ARNm independiente,
  - 2/ validación del comportamiento específico de estos genes después de la transducción con otro lote de baja calidad: el lote UC,
  - 3/ confirmación de la regulación negativa de estos 2 genes a una MDI de 150.
- Como se presenta en la figura 18, para estos 2 genes a una MDI de 40, se confirmó una regulación negativa más fuerte con el lote B en comparación con el lote C con el FC respectivo en comparación con NT de -4,6 y -2,4 para MKI67, y de -3,1 y -1,7 para E2F8. En consonancia con los resultados de las micromatrices, la regulación negativa

no fue mayor con el lote B-S que con el lote C (FC -2,9 y -1,7 para MKI67 y E2F8 respectivamente). El lote UC produce el mismo nivel de regulación negativa que el lote B a esta MDI (FC de -4,7 para MKI67 y de -3,0 para E2F8).

5 A una MDI de 150, la regulación negativa para estos 2 genes es más fuerte en cada condición, pero la proporción entre las regulaciones negativas de los lotes B y C sigue siendo la misma (aproximadamente el doble). El lote B-S genera una regulación negativa equivalente o inferior a la del lote C, lo que está en consonancia con el FC obtenido con micromatrices. Con lote UC, la regulación negativa alcanza un nivel intermedio entre los lotes B y C.

10 Para concluir, identificamos y validamos un conjunto de genes del ciclo celular que son genes de respuesta temprana en respuesta a la transducción y cuya regulación negativa es más fuerte a la mismo MDI con un vector de baja calidad producido sin suero que con un vector extremadamente purificado. Sin embargo, estos genes no pueden utilizarse como biomarcadores de calidad únicos, ya que se comportan de manera similar con lotes de baja calidad producidos con suero que con lotes extremadamente purificados, sin duda debido a mecanismos de compensación, a través de la activación de los genes del ciclo celular por factores de crecimiento séricos.

15 Genes que presentan un comportamiento específico de lote

Entre los 16 genes de la tabla 6, en este experimento independiente solo 2 de ellos se validaron como que presentaban un comportamiento diferente según la calidad del lote: CXCL2 y EREG.

En la Tabla 10 se ofrecen las secuencias de los cebadores utilizados en la validación mediante RT-qPCR.

25 CXCL2 se reguló positivamente de manera significativa después de la transducción con el lote B-S a una MDI 40 de(FC B-S frente a NT: 1,9) aunque se reguló negativamente con el lote C (FC C frente a NT: -1,75). Experimentos de validación mediante RT-qPCR en las mismas muestras (fig. 19) confirman la regulación negativa con el lote C, y muestran una ligera regulación positiva con B-S en comparación con NT pero no es estadísticamente significativa. Sin embargo, el lote UC muestra una regulación positiva de 1,6 veces en comparación con NT.

30 A una MDI de 150, los resultados de RT-qPCR mostrados en la figura 19B, confirman un comportamiento específico de este gen dependiendo de la calidad del lote del vector. De hecho, solo los lotes de baja calidad inducen una regulación positiva de CXCL2, aunque el lote C extremadamente purificado provoca una ligera regulación negativa de este gen (FC frente a NT: 1,4). Evidentemente, el lote B que induce expresión no diferencial a una MDI de 40 (incluso con una ligera regulación negativa), genera una fuerte regulación positiva a una MDI de 150. Esto podría explicar los diferentes resultados observados con el lote B de rLV-EF1 que indujo la regulación negativa de CXCL2 a una MDI de 40 y de 150, tal vez debido a una menor MDI, en comparación con el vector rLV-EF1-GFP. Finalmente, a alta MDI, la regulación positiva de CXCL2 parece ser específica de un lote de vector de baja calidad.

40 EREG muestra una ligera regulación positiva en micromatrices con los lotes B (FC frente a NT: 1,5) y B-S (FC frente a NT: 1,4), y no se impacta con el lote C. Se realizaron validaciones mediante RT-qPCR con ARN obtenido del experimento a una MDI de 150 (fig. 19C). Se confirmó una sobreexpresión fuerte y significativa con los lotes B y B-S (FC respectivo frente a NT: 3,0 y 2,9), mientras se confirmó la ausencia de impacto después de la transducción con el lote C. Puede observarse que el lote UC no induce una sobreexpresión significativa.

#### 45 Referencias

- Andreadis ST, Roth CM, Le Doux JM, Morgan JR, Yarmush ML. 1999. Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy. *Biotechnol Prog* 15 (1): 1-11.
- 50 Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara v, Walsh M, Vallier I, Gil J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 15 de septiembre de 2009; 23(18): 2134-9.
- Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, Nuttin B, Debyser Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther.* Noviembre de 2003; 10 (23): 1933-40.
- 55 Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY).* 2011; 3 (2): 94.
- 60 Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds). *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., et al., 2009. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science*, 326(5954), págs. 818-823.
- 65 Cavazzana-Calvo, Marina et al., 2010. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*, 467(7313), págs. 318-322.

- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- 5 Chiu SC, Wang MJ, Yang HH, Chen SP, Huang SY, Chen YL, Lin SZ, Harn HJ, Pang CY. Activation of NAG-1 via JNK signaling revealed an isochaihulac- tone-triggered cell death in human LNCaP prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:146
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*. 2010; 5:99-118.
- 10 Giri, M.S. et al., 2006. Microarray data on gene modulation by HIV-1 in immune cells: 2000-2006. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(5), págs. 1031-1043.
- Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, et al. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16 ink4a. *Cell Cycle*. 2011; 10(3):457-468.
- 15 Mitchell, R., Chiang, C.Y., et al., 2003. Global analysis of cellular transcription following infection with an HIV-based vector. *Molecular Therapy*, 8(4), págs. 674-687.
- 20 Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*. 27 de agosto de 2009; 460(7259): 1136-9. Epub 9 de agosto de 2009.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-408.
- 25 Rimai L, Salmee I, Hart D, Liebes L, Rich MA, McCormick JJ. 1975. Electrophoretic mobilities of RNA tumor viruses. *Studies by Doppler-shifted light scattering spectroscopy*. *Biochemistry* 14(21):4621-7.
- 30 Salmee I, Rimai L, Liebes L, Rich MA, McCormick JJ. 1975. Hydrodynamic diameters of RNA tumor viruses. *Studies by laser beat frequency light scattering spectroscopy of avian myeloblastosis and Rauscher murine leukemia viruses*. *Biochemistry* 14(1):134-41.
- Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*. 1 de febrero de 1997; 89(3): 776-9.
- 35 Sommer, C.A. et al., 2009. Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*, 27(3), págs. 543-549.
- 40 Takahashi K y Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, 25 de agosto de 2006.
- Vallier L, Touboul T, Brown S, Cho C, Bilican B, Alexander M, Cedervall J, Chandran S, Ahrlund-Richter L, Weber A, Pedersen RA. Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27 (11): 2655-2666.
- 45 Young ARJ, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep*. 2009;10(3): 228-230.
- 50 Zhao, Y., Azam, S. & Thorpe, R., 2005. Comparative studies on cellular gene regulation by HIV-1 based vectors: implications for quality control of vector production. *Gene therapy*, 12(4), págs. 311-319.

## REIVINDICACIONES

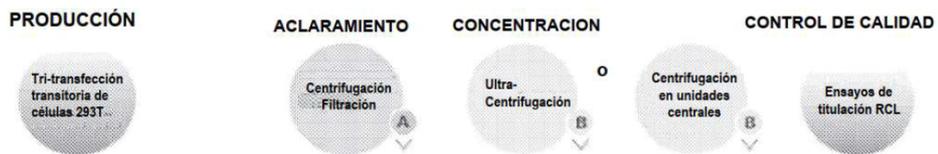
1. Un método para evaluar la calidad de una composición de vector vírico para una transferencia de transgenes en células eucariotas inmortalizadas que comprende (a) medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico; (b) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico a alta multiplicidad de infección (MDI), en donde una alta MDI corresponde a al menos tres veces la MDI óptima para células no permisivas, o al menos cuatro veces la MDI óptima para células permisivas; y (c) comparar dicha expresión de biomarcador(es) en la etapa (b) con la expresión de biomarcador(es) en la etapa (a) en donde una regulación positiva significativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (b) en comparación con la etapa (a) indica que la calidad de la composición de vector vírico es insuficiente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde una regulación positiva significativa a alta MDI es una regulación positiva dos veces mayor en comparación con la etapa (a).
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que adicionalmente comprende una etapa (d) de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado en el grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas que no se han puesto en contacto con la composición de vector vírico; (e) medir el nivel de expresión de dicho al menos un biomarcador en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con dicha composición de vector vírico; y (f) comparar dicha expresión de biomarcador(es) en la etapa (e) con la expresión de biomarcador(es) en la etapa (d) en donde una regulación negativa significativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en comparación con la etapa (d) indica que la calidad de la composición del vector vírico es insuficiente.
4. El método de la reivindicación 3, en donde una regulación negativa significativa a una MDI óptima es una regulación negativa de 1,5 veces en comparación con (d).
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que adicionalmente comprende una etapa (g) de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico de control; y (h) comparar la expresión de dicho biomarcador(es) en la etapa (g) con la expresión del biomarcador(es) en la etapa (a), en donde no va a detectarse ninguna expresión diferencial significativa en el biomarcador(es) en la etapa (g) en comparación con la etapa (a).
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que adicionalmente comprende una etapa (j) de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK en células eucariotas inmortalizadas después de haberse puesto en contacto con una composición de vector vírico de control; y (k) comparar la expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) en la etapa (j) con la expresión del biomarcador(o biomarcadores) en la etapa (d), en donde va a detectarse una posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d).
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la posible regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (j) en comparación con la etapa (d) es al menos 1,5 veces menor que la regulación negativa en el nivel de expresión del biomarcador en la etapa (e) en comparación con la etapa (d) a alta MDI.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende de antemano una etapa de titulación de la composición de vector vírico y de la composición de vector vírico de control.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las medidas del nivel de expresión del biomarcador se realizan antes de que las células alcancen la confluencia.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las células eucariotas inmortalizadas se transducen mediante una composición de vector lentivírico.
11. Un kit que comprende:
- uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en CXCL2 y EREG, seleccionándose dichos reactivos del grupo que consiste en anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores, proteínas recombinantes que se unen a anticuerpos específicos de biomarcadores, sondas o cebadores de ácido nucleico que se hibridan con los biomarcadores,
  - uno o más reactivos capaces de medir el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en ASPM, AURKB, CENPA, CENPF, CKS1B, E2F8, ERCC6L, FAM83D, KIFC1, MKI67, NEK2, NUSAP1, OIP5, PRC1, RRM2, SGOL1, SPC25, TOP2A y TTK, seleccionándose dichos reactivos del

grupo que consiste en anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores, proteínas recombinantes que se unen a anticuerpos específicos de biomarcadores, sondas o cebadores de ácido nucleico que se hibridan con los biomarcadores y

- una composición de vector vírico de control.

5

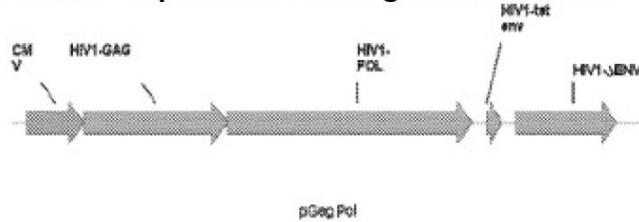
**Figura 1A. Producción habitual de vectores con suero mediante procedimientos de vanguardia.**



**Figura 1B. Concentración de vector vírico y procedimiento de purificación**

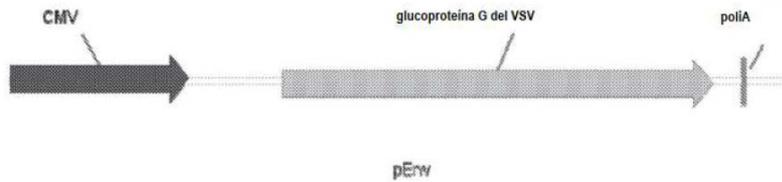


**FIG. 1C Plásmido portador de genes gag y pol, plásmido auxiliar que expresa envoltura y plásmido de expresión de transgenes sin ADNc**



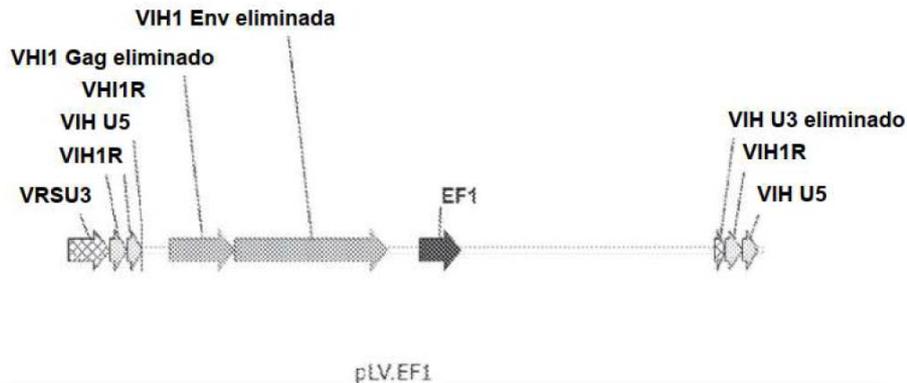
Plásmido portador de genes gag y pol

Características	Longitud (pb)	
promotor	602	/marcador=CMV
CDS	1502	/marcador =VIH1_gag
CDS	2737	/marcador =VIH1-pol
CDS	1173	/marcador =VIH1-env eliminado
Unión a proteínas204		/marcador =VIH1_RRE



Plásmido auxiliar que expresa envoltura

Características	Longitud (pb)	
Promotor	677	/marcador=CMV
CDS	1642	/marcador =VSV glucoproteína_G
Señal poliA	768	/marcador=HBB2



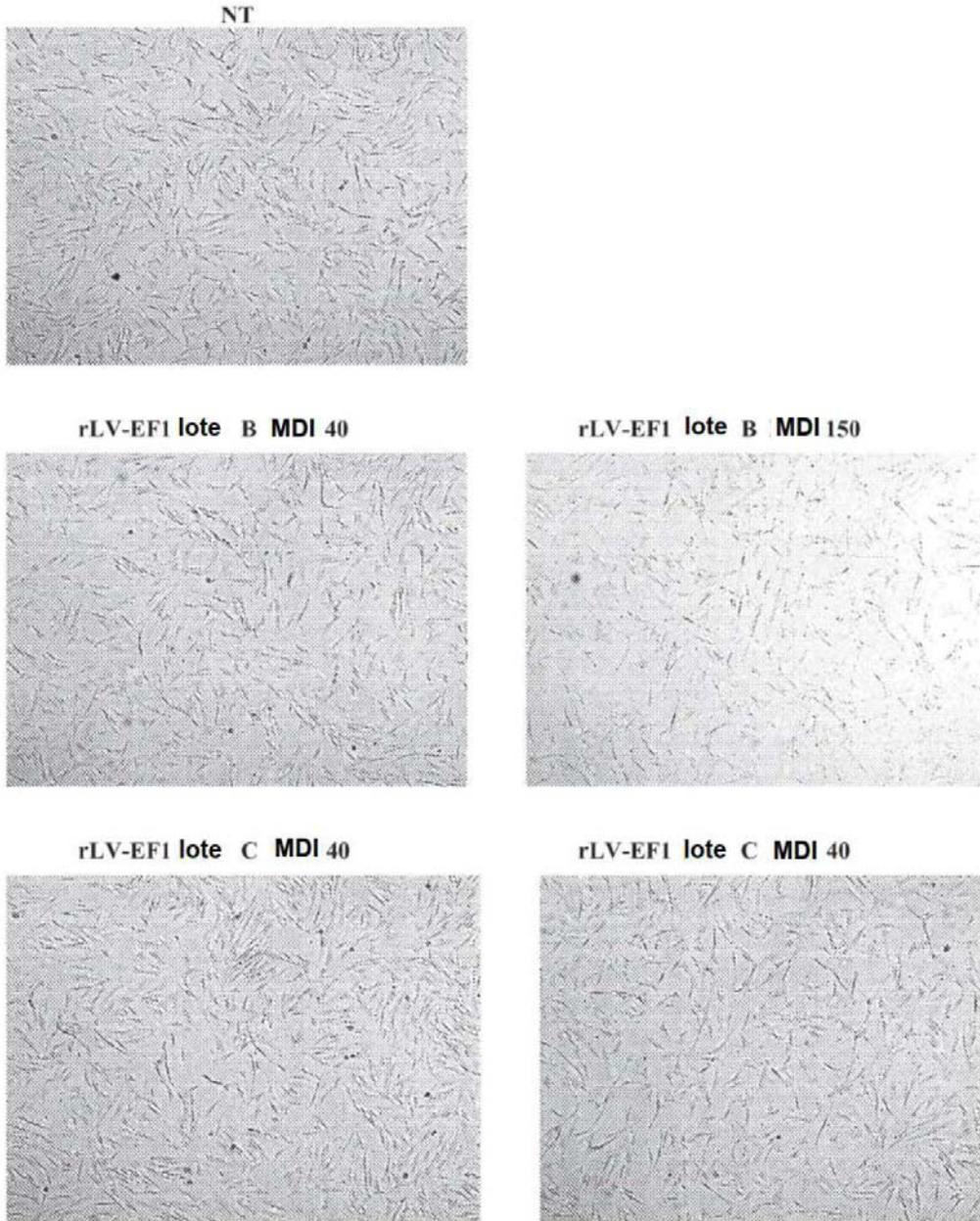
Plásmido de expresión de transgenes sin ADNc

Características	Longitud (pb)	
región_repetida	230	/marcador=RSV_U3
Característica	119	/marcador = señal de empaquetamiento
CDS	362	/marcador =VIH1_gag_eliminado
Promotor	236	/marcador =EFV_promotor
Característica	18	/marcador =Sitio de Unión a Cebador SUC
unidad_repetida	55	/marcador =HIV_U3 eliminado
unidad_repetida	95	/marcador =HIV_R
unidad_repetida	85	/marcador =HIV_U5

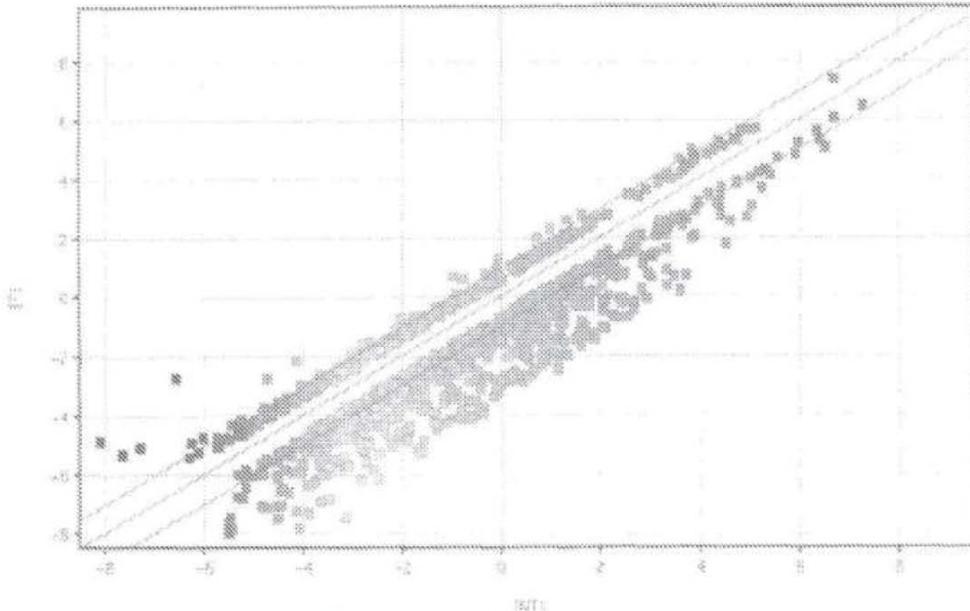
**Figura 2A. Resumen de títulos de los lotes B y C utilizados para el estudio de transcriptómica**

	<b>Título (UT/ml)(1)</b>	<b>PF/UT (2)</b>
<b>rLV-EF1 lote B</b>	4,7E+08	104
<b>rLV-EF1 lote C</b>	8,9E+09	67

**Figura 2B. Células de prepucio cultivadas 48h después de la transducción con vectores de lotes B y C.**

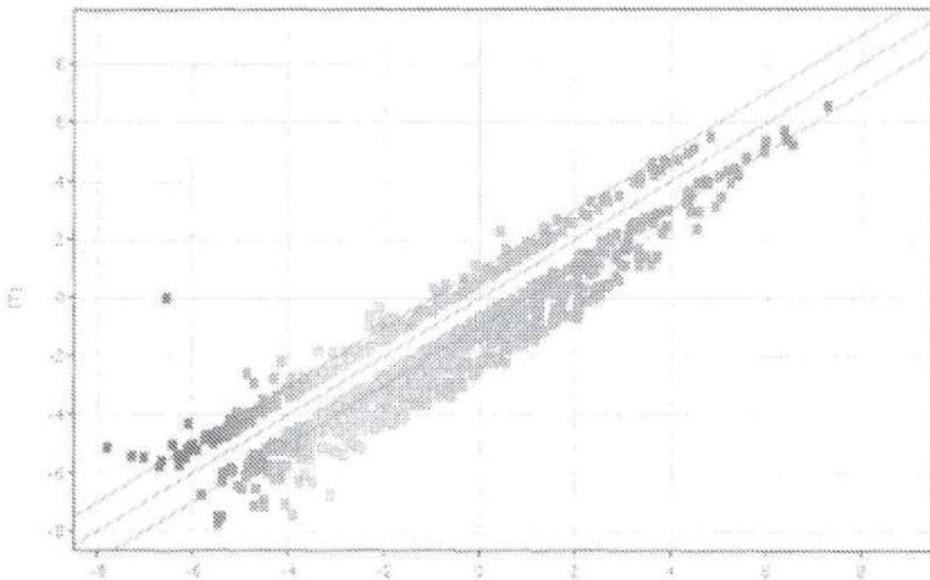


**Figura 3A. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas.**



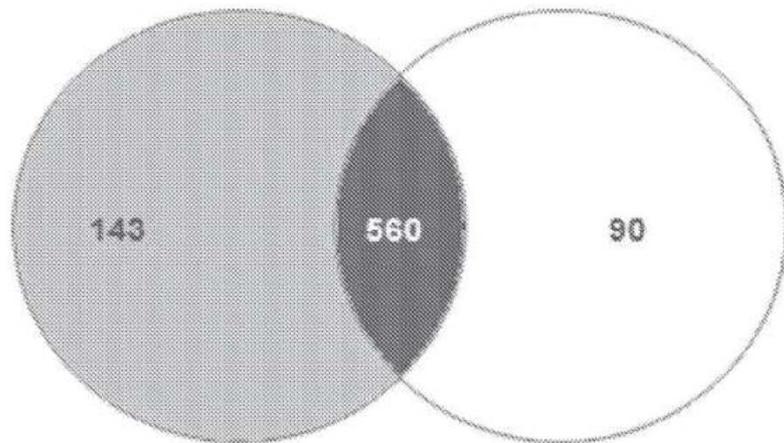
Selección de Factor de Cambio  $\geq 1,5$

**Figura 3B. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas.**



Selección de Factor de Cambio  $\geq 1,5$

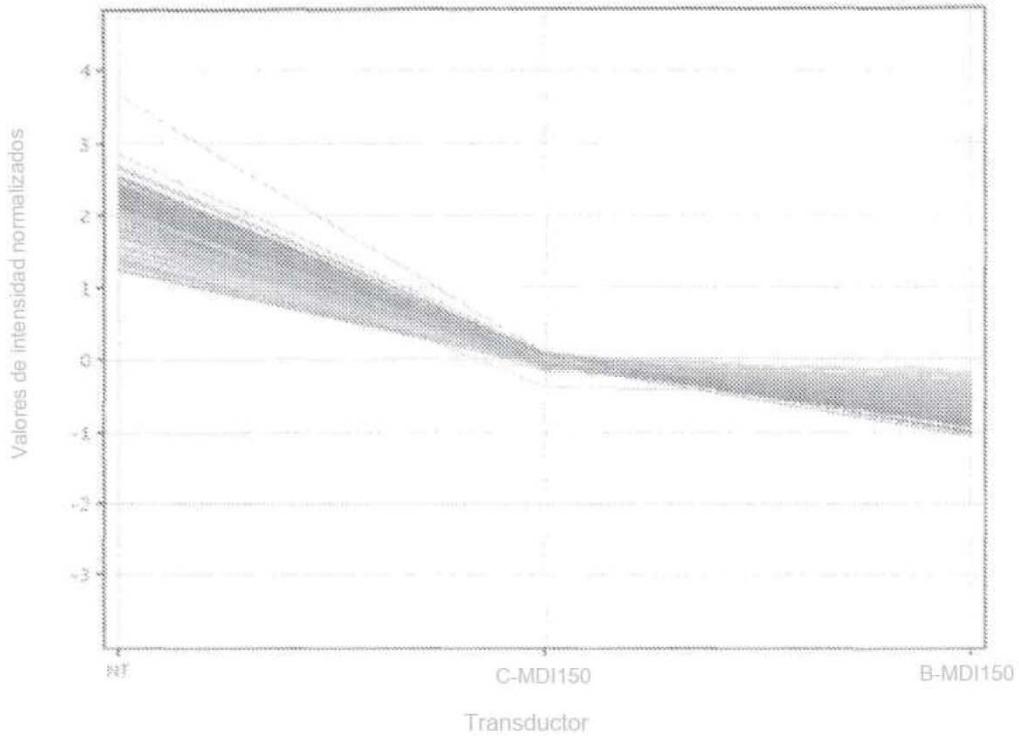
**Figura 4. Diagrama de Venn: sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas y sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote C frente a células no transducidas a una MDI de 150.**



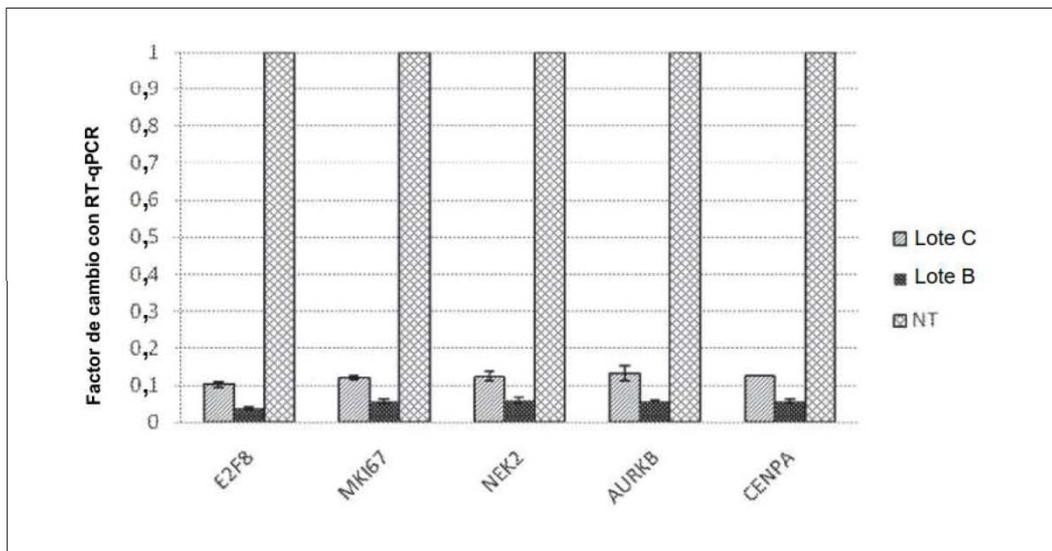
Sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote B a una MDI de 150 frente a células no transducidas

Sondas reguladas negativamente en células transducidas con el lote C a una MDI de 150 frente a células no transducidas

**Figura 5. Gráfico de perfil de sondas de ciclo celular en células transducidas con el lote B frente a células no transducidas a una MDI de 150 con  $FC \leq -3$ .**



**Figura 6A. Validación técnica de resultados de micromatrices mediante resultados con RT-qPCR.**

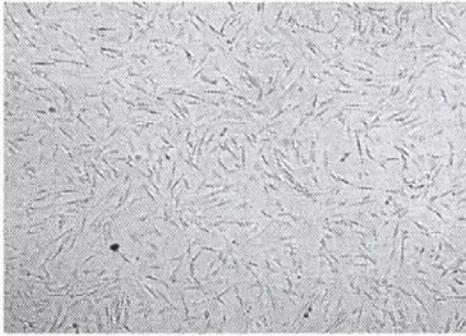


**Figura 6B. Validación técnica de resultados de micromatrices mediante resultados con RT-qPCR.**

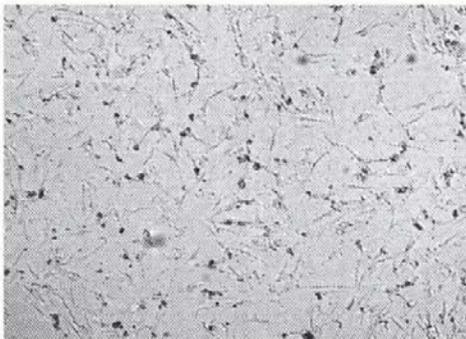
<b>Gen (1)</b>	<b>Lote (2)</b>	<b>FC con RT-qPCR frente a NT (3)</b>	<b>FC con micromatriz frente a NT (4)</b>
<b>AURKB</b>	MDI de 150 lote C	-7,5	-5,2
	MDI de 150 lote B	-17,4	-10,1
<b>NEK2</b>	MDI de 150 lote C	-8,0	-5,8
	MDI de 150 lote B	-16,8	-10,4
<b>E2F8</b>	MDI de 150 lote C	-9,8	-12,1
	MDI de 150 lote B	-25,9	-19,6
<b>MKI67</b>	MDI de 150 lote C	-8,3	-5,6
	MDI de 150 lote B	-17,4	-8,6
<b>CENPA</b>	MDI de 150 lote C	-7,9	-6,2
	MDI de 150 lote B	-17,7	-11,5

**Figura 7A. Células transducidas con el lote B obtenido con suero (lote B-S) en comparación con células no transducidas.**

NT



rLV-EF1 lote B-S MDI 40



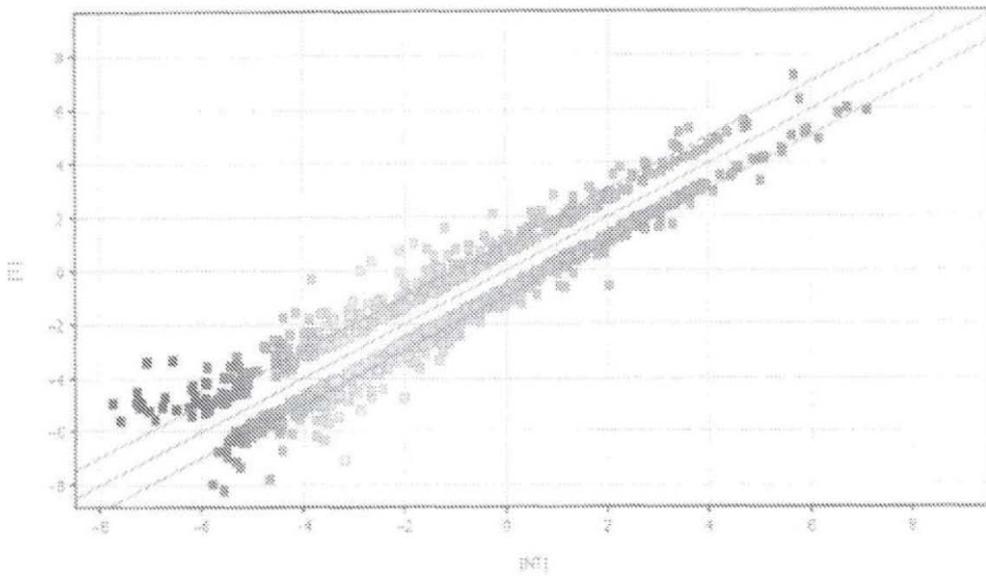
rLV-EF1 lote B-S MDI 150



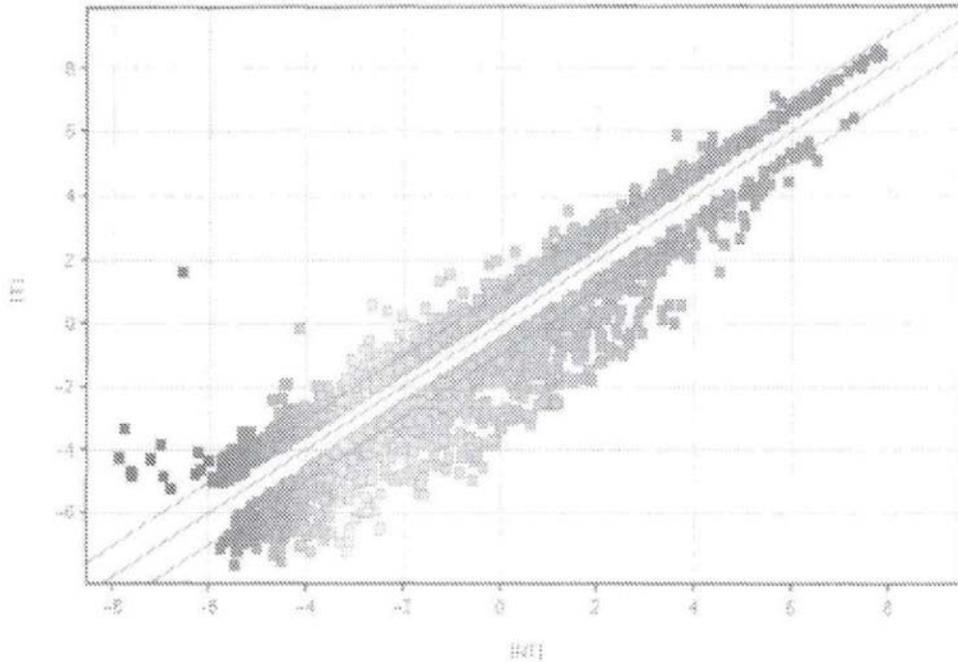
**Figura 7B Características del lote B-S utilizado para el estudio de transcriptómica**

	Título (UT/ml)(1)	PF/UT (2)
rLV-EF1 lote B-S	6,8E+07	494

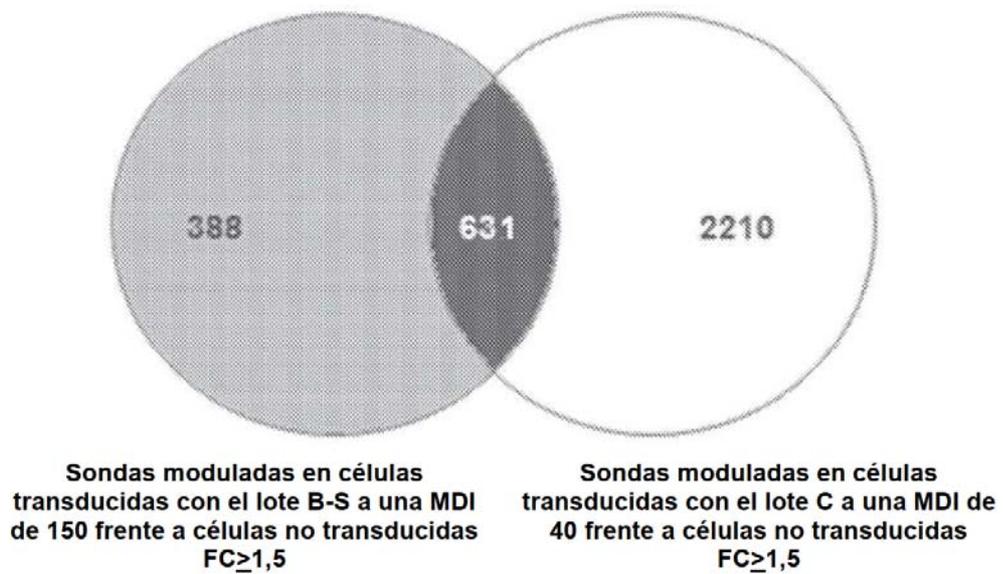
**Figura 8: Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) frente a células no transducidas a una MDI de 150**



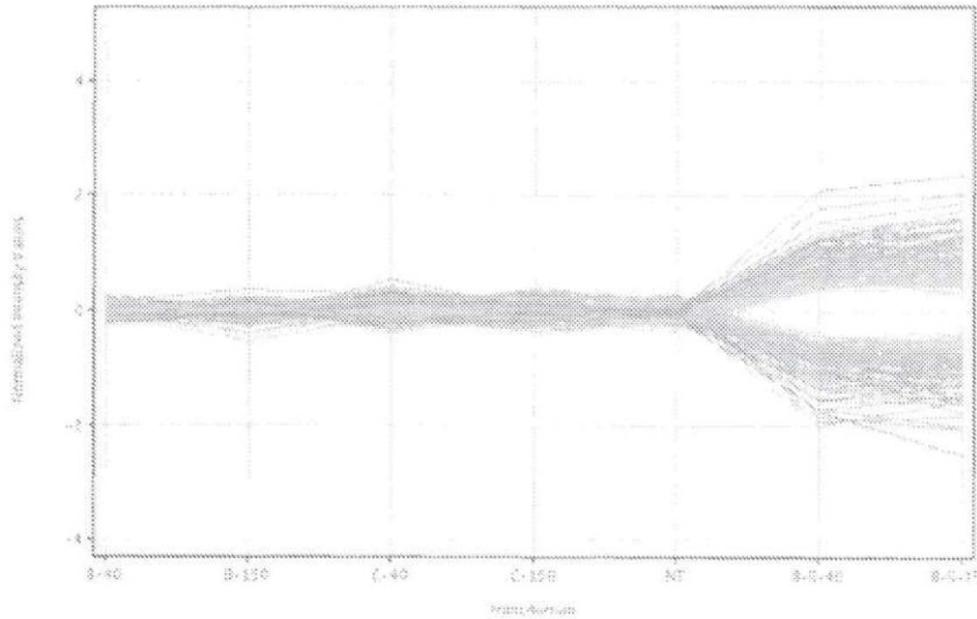
**Figura 9. Diagrama de dispersión de sondas diferenciales en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) frente a células no transducidas a una MDI de 40.**



**Figura 10. Diagrama de Venn: sondas moduladas en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 150 frente a células no transducidas y sondas moduladas en células transducidas con el lote B obtenido con Suero (B-S) a una MDI de 40 frente a células no transducidas.**



**Figura 11. Gráfico de perfil que representa sondas que impactan en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 40 y 150 y no diferencial en células transducidas con los lotes B y C una MDI de 40 y 150.**

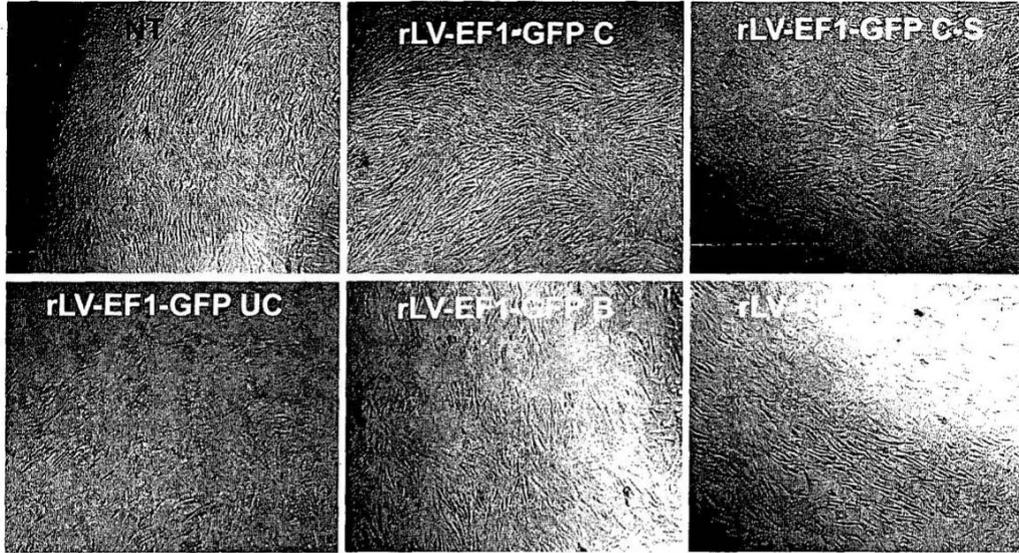


**Fig 12. Caracterización de lotes (B, C, B-S y UC) de vectores rLV-EF1-GFP utilizados**

Lote de rLV-EF1-GFP	Título (UT/ml) (1)	PF/UT (2)
<b>C</b>	<b>7,57E+07</b>	<b>195</b>
<b>B</b>	<b>9,26E+07</b>	<b>361</b>
<b>B-S</b>	<b>2,48E+08</b>	<b>293</b>
<b>UC</b>	<b>1,12E+08</b>	<b>348</b>

Fig. 13: Fotografías de células de fibroblastos de prepucio transducidas con vectores rLV-EF1-GFP. Las células se observaron 48 horas después de la transducción.

**MDI 40**



**MDI 150**

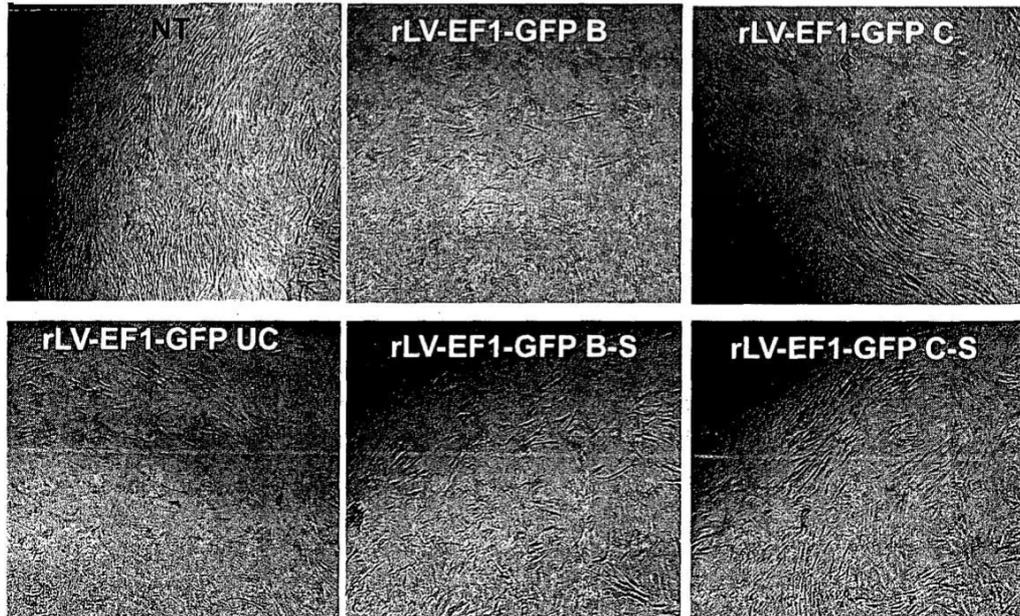
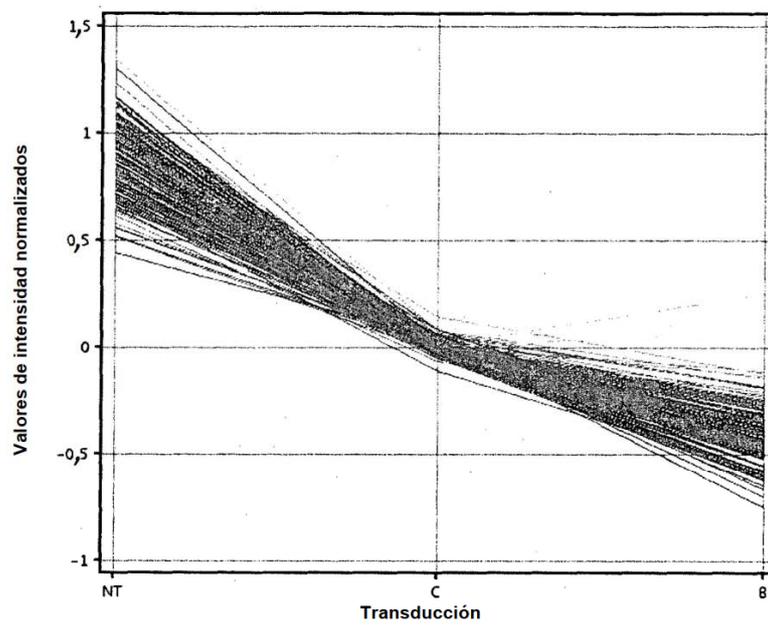
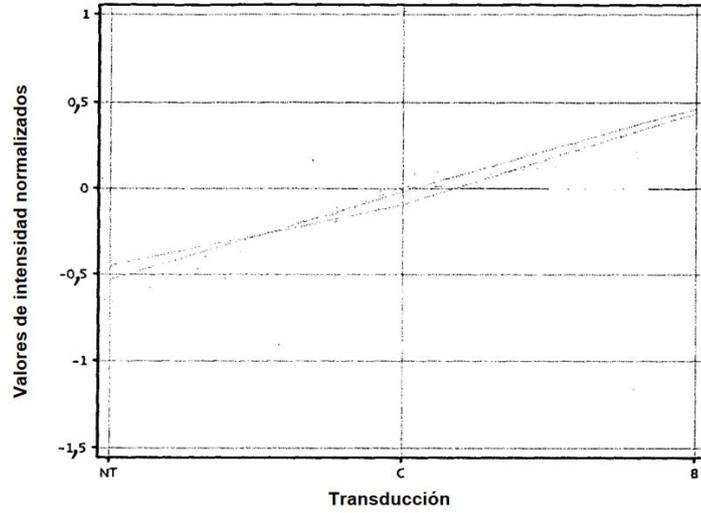


Fig 14: Sonda seleccionada en la figura 5 (genes de ciclo celular regulados negativamente con  $FC \leq -3$  con B-MCS-MDI150 frente a NT) representada en las siguientes condiciones: NT, B-GFP-MDI40, C-GFP-MDI40.



**Fig. 15:** Gráfico de perfil que muestra el comportamiento de sondas correspondientes a la tabla 3 después de la transducción con rLV-EF1-GFP lote B y C a una MDI de 40 frente a células no transducidas (NT).



**Fig. 16:** Gráfico de perfil que representa sondas correspondientes a los 18 genes de la tabla 4 y MKI67 después de la transducción con el vector rLV-EF1-GFP a una MDI de 40.

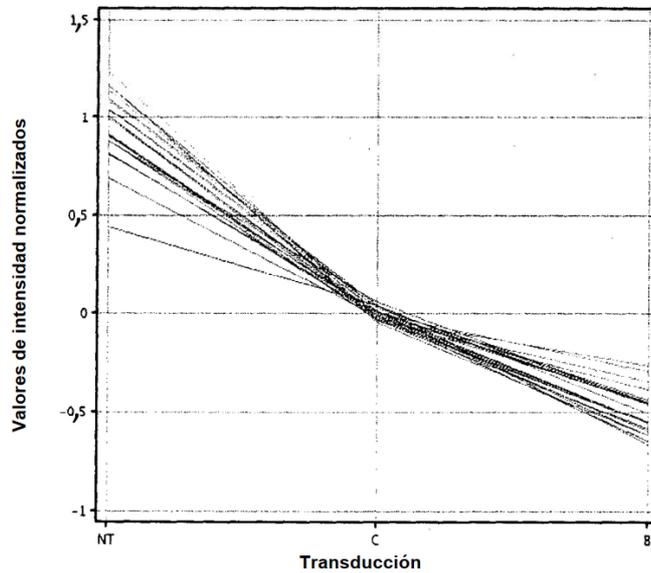
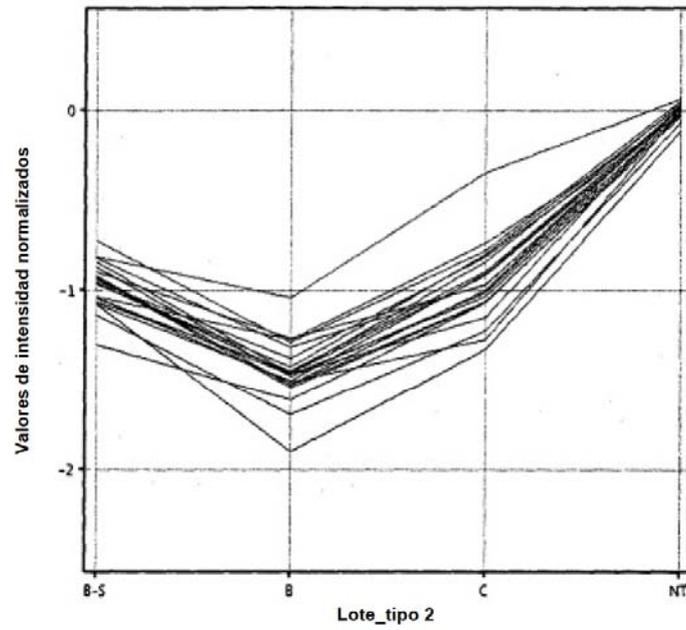


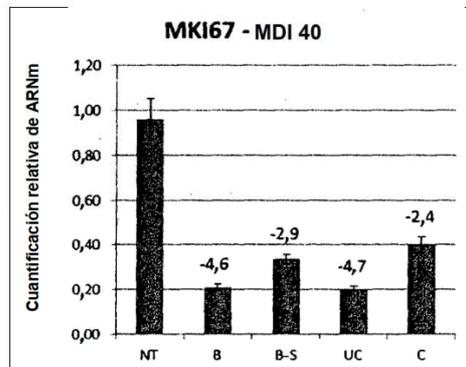
Fig 17. Gráfico de perfil que representa los 18 genes del ciclo celular de la tabla 4 y MKI67 después de la transducción con el vector rLV-EF1-GFP (B, B-S y C) a una MDI de 40.



**Fig. 18. Validación de algunos genes del ciclo celular como biomarcadores mediante RT-qPCR.**

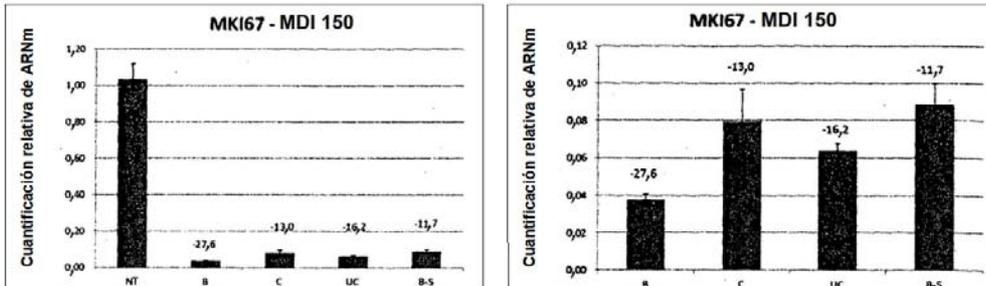
Los valores de cuantificación relativa de ARNm se representan como media  $\pm$  DT calculados a partir de 3 muestras por condición. Los valores de factor de cambio para cada condición en comparación con NT se indican sobre cada barra del diagrama cuando las diferencias son significativas (prueba de la t para datos independientes, valor de  $p < 0,05$ )

- **18A. MKI67 – MDI 40**



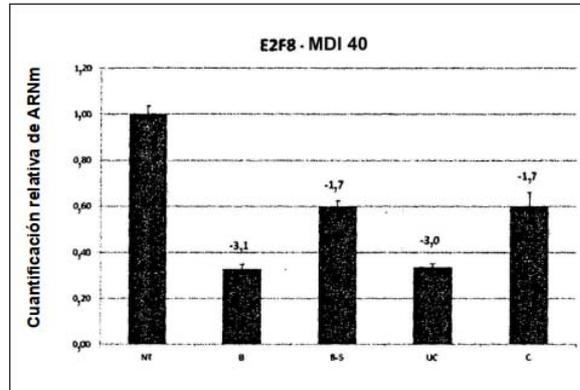
	Valor de p (ensayo de t) de células frente a células transducidas con lote C en $\Delta\Delta Ct$
NT	0,00
B MDI 40	0,00
B-S MDI 40	0,05
UC MDI 40	0,00

• 18B. MKI67 – MDI 150



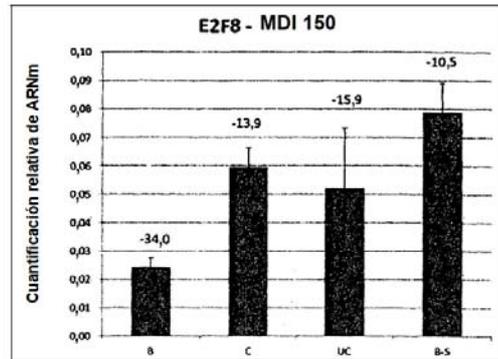
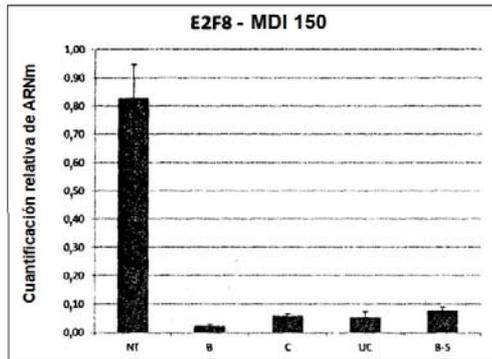
	Valor de p (ensayo de t) de células frente a células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células no transducidas en $\Delta\Delta Ct$
NT	0	
B MDI 150	0	1.05E-06
C MDI 150		3.48E-05
UC MDI 150	0,18	1.12E-06
B-S MDI 150	0,43	7.92E-06

• 18C. E2F8 – MDI 40



	Valor de p (ensayo de t) de células frente a células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células no transducidas en $\Delta\Delta Ct$
NT	0,00	
B MDI 40	0,00	0,00
B-S MDI 40	0,95	0,00
UC MDI 40	0,00	0,00
C MDI 40		0,00

• 18D. E2F8 – MDI 150

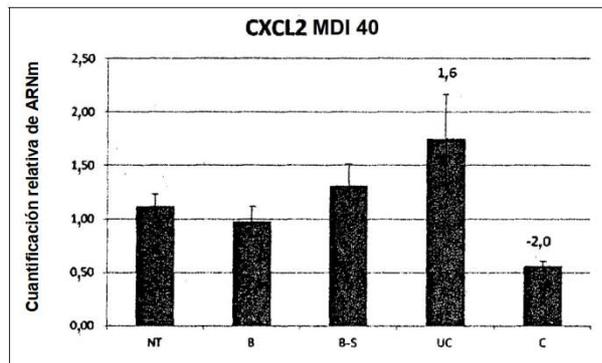


	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$
NT	0,00
B MDI 150	0,00
C MDI 150	
UC MDI 150	0,30
B-S MDI 150	0,99

**Fig. 19. Validación de genes CXCL2 y EREG como biomarcadores mediante RT-qPCR.**

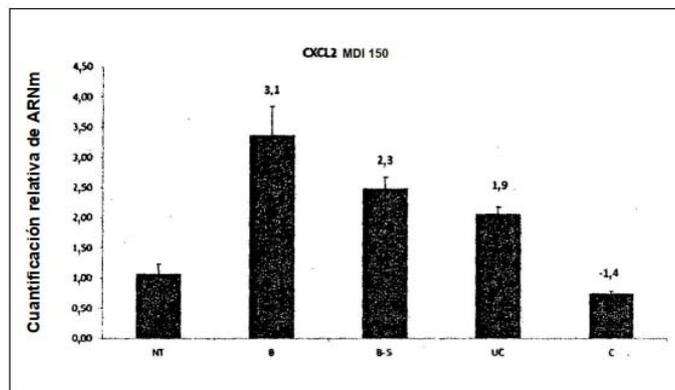
Los valores de cuantificación relativa de ARNm se representan como media  $\pm$  DT calculados a partir de 3 muestras por condición. Los valores de factor de cambio para cada condición en comparación con NT se indican sobre cada barra del diagrama cuando las diferencias son significativas (prueba de la t para datos independientes, valor de  $p < 0,05$ ).

- **19A. CXCL2 MDI 40**



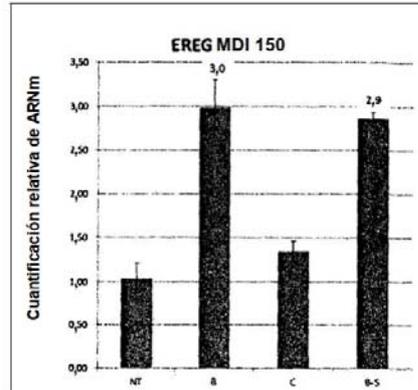
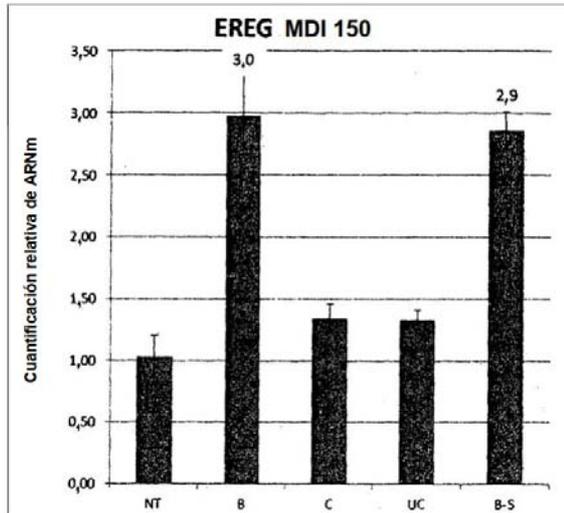
	Valor de p (ensayo de t) de células frente a células no transducidas en $\Delta\Delta Ct$	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$
NT		0,00
B MDI 40	0,24	0,01
B-S MDI 40	0,22	0,00
UC MDI 40	0,04	0,00
C MDI 40	0,00	

• 19B. CXCL2 MDI 150



	Valor de p (ensayo de t) de células frente a células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células no transducidas en $\Delta\Delta Ct$
NT	0,01	
B MDI 150	0,00	0,00
B-S MDI 150	0,00	0,00
UC MDI 150	0,00	0,00
C MDI 150		

• 19C. EREG MDI 150



	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células transducidas con el lote C en $\Delta\Delta Ct$	Valor de p (ensayo de t) de células transducidas frente a células no transducidas en $\Delta\Delta Ct$
NT	0,07	
B MDI 150	0,00	0,00
C MDI 150		0,07
UC MDI 150	0,93	0,06
B-S MDI 150	0,00	0,00

TABLAS

**Tabla 1. Cebadores utilizados para validaciones por RT-qPCR.**

Cebadores utilizados por RT-qPCR

Simbolo del Gen	secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador inverso
CENPA	TATTGGCCCTACAAGAGGCAGCAG	GCCAGTTGCACATCCTTTGGGAAG
E2F8	ACGAAGTGGCAGAGGAACCTAATG	AGGCGGCTCACCATATGTAAACTC
MKI67	AGCACCTGCTGTTTGAAGGG	ACACAACAGGAAGCTGGATACGG
NEK2	AGATCCGGAGGAAGAGTGATGG	TGTTTCTCAGCTTCTGTCATGGAG
AURKB	TGAGAGTGCATCACACAACGAGAC	GGGAACCTTAGGTCCACCTTGACG
GAPDE	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

**Tabla 2. Genes del ciclo celular clasificados por aumento de factor de cambio.**

Simbolo del Gen HUGO (1)	Descripción (2)	Nombre de la sonda (3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de proteína RefSec (5)	GO "Fase M del ciclo celular mitótico" (6)	GO "fase G1" (7)	GO "fase G2" (8)	GO "fase S" (9)	GO "transición G1/S del ciclo celular mitótico" (10)	GO "transición G2/M del ciclo celular mitótico" (11)	GO "transición M/G1 del ciclo celular mitótico" (12)
E2F8	Factor de transcripción 8 E2F (E2F8) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024680]	A_23_P35871	NM_024680	NP_078956							
SPC25	Componente del complejo cinetocoro NDC80, SPC25, homólogo (S. <i>cerevisiae</i> ) (SPC25) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_020675]	A_23_P51085	NM_020675	NP_065726	X						
CENPA	Proteína A centromérica (CENPA) de <i>Homo sapiens</i> variante transcripcional 1, ARNm [NM_001809]	A_24_P413884	NM_001809	NP_001800	X						
ESCO2	Establecimiento de homólogo 2 de cohesión 1 de <i>Homo sapiens</i> (S. <i>cerevisiae</i> ) (ESCO2), ARNm [NM_001017420]	A_24_P323598; A_33_P3326210	NM_001017420	NP_001017420							
NCAPG	Complejo de condensina I no-SMC de <i>Homo sapiens</i> , subunidad G (NCAPG), ARNm [NM_022346]	A_33_P3230254	NM_022346	NP_071741	X						

ES 2 740 004 T3

TTK	Proteína cinasa TTK (TTK) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_003318]	A_23_P259586	NM_003318	NP_003309															
NEK2	Cinasa 2 relacionada con NIMA (gen a nunca en mitosis) (NEK2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002497]	A_24_P319613;A_23_P35219	NM_002497	NP_002488															X
AURKB	Aurora cinasa B (AURKB) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004217]	A_23_P130182	NM_004217	NP_004208	X														
CDC2	Ciclo 2 de división celular de <i>Homo sapiens</i> , G1 a S y G2 a M (CDC2), variante transcripcional 1, ARNm [NM_001786]	A_23_P138507	NM_001786	NP-001777	X							X							X
DLGAP5	Proteína 5 asociada a homólogo de disco grande ( <i>Drosophila</i> ) (DLGAP5) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_014750]	A_23_P88331	NM_014750	NP-055565	X														
E2F2	Factor 2 de transcripción E2F (E2F2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004091]	A_23_P408955	NM_004091	NP_004082		X													
CENPF	Proteína F centromérica de <i>Homo sapiens</i> , 350/400 kDa (mitosina) (CENPF), ARNm [NM_016143]	A_23_P401; A_24_P96780	NM_016143	NP_057427	X						X								
NUSAP1	Proteína 1 nucleolar asociada al huso (NUSAP1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_016359]	A_33_P3350488	NM_016359	NP_057443	X														
NUF2	Componente del complejo de cinetocoro NUF2, NDC80 de <i>Homo sapiens</i> , homólogo ( <i>S. cerevisiae</i> ) (NUF2), variante transcripcional 1, ARNm [NM_145697]	A_23_P74349	NM_145697	NP_663735	X														
TOP2A	Alfa II topoisomerasa (ADN) de 170 kDa (TOP2A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001067]	A_23_P118834	NM_001067	NP_OO1058															X
KIFCI	Miembro C1 de la familia de cinesina de <i>Homo sapiens</i> (KIFCI), ARNm [NM_002263]	A_23_P133956	NM_002263	NP_002254	X														

ES 2 740 004 T3

SGOL1	Similar a sugosina 1 ( <i>S. pombe</i> ) (SGOL1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional A2, ARNm [NM_001012410]	A_23_P29723	NM_001012410	NP_001012410	X														
CDC25C	Homólogo C del ciclo de división celular 25 de <i>Homo sapiens</i> ( <i>S. pombe</i> ) (CDC25C), variante transcripcional 1,	A_23_P70249	NM_001790	NP_001781	X	X													X
KIF2C	Miembro 2C de la familia de cinesina (KIF2C) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006845]	A_23_P34788	NM_006845	NP_006836	X														
HJURP	Proteína de reconocimiento de la unión Holliday (HJURP) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018410]	A_33_P3807062	NM_018410	NP_060880															
SKA1	Subunidad 1 del complejo asociado al uso y cinetocoro (SKA1), de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001039535]	A_24_P322354	NM_001039535	NP_001034624	X														
MK167	Antígeno de <i>Homo sapiens</i> identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67 (MK167), variante transcripcional 1, ARNm [NM_002417]	A_24_P346855; A_33_P3374205; A_33_P3374210	NM_002417	NP_002408															
FAM83D	Miembro D 83 de similitud de secuencia con familia de <i>Homo sapiens</i> (FAM83D), ARNm [NM_030919]	A_23_P323751	NM_030919	NP_112181	X														
CEP55	Proteína centrosómica de <i>Homo sapiens</i> de 55kDa (CEP55), variante transcripcional 1, ARNm [NM_018131]	A_23_P115872; A_33_P3291831	NM_018131	NP_060601	X														
KIF20A	Miembro 20A de la familia de cinesina (KIF20A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005733]	A_23_P256956	NM_005733	NP_005724	X														
PBK	Cinasa de unión a PDZ (PBK) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018492]	A_32_P62997	NM_018492	NP_060962	X														
NDC80	Componente del complejo de cinetocoro, homólogo NDC80 ( <i>S. cerevisiae</i> ) de <i>Homo sapiens</i> (NDC80), ARNm [NM_006101]	A_23_P50108	NM_006101	NP_006092	X														

ES 2 740 004 T3

SKA3	Subunidad 3 del complejo asociado al huso y al cinetocoro (SKA3) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional1, ARNm [NM_145061]	A_33_P3216008	NM_145061	NP_659498	X														
CDCA3	Asociado 3 del ciclo de división celular (CDCA3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_031299]	A_24_P218979	NM_031299	NP_112589	X														
BUB1	Homólogo 1 de gemación no inhibida por becimidazoles (BUB1) (levadura) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004336]	A_23_P124417	NM_004336	NP_004327	X														
ASPM	Homólogo de asp (huso anómalo) de <i>Homo sapiens</i> asociado a microcefalia ( <i>Drosophila</i> ) (ASPM), ARNm [NM_018138]	A_33_P3288159;A_23_P52017	NM_018136	NP_060606	X														
IQGAP3	Proteína 3 activadora de GTPasa que contiene el motivo IQ de <i>Homo sapiens</i> (IQGAP3), ARNm [NM_178229]	A_33_P3321293	NM_178229	NP_839943															X
PLKI	Polocinasa 1 de <i>Homo sapiens</i> ( <i>Drosophila</i> ) (PLKI), ARNm [NM_005030]	A_23_P118174;A_33_P3298387	NM_005030	NP_005021	X														X
	Proteína Spc24 de cinetocoro (hSpc24) [Fuente: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc: Q8NBT2] [ENST00000293743]	A_24_P314571		#N/A	X														
ANLN	Proteína anilina de unión a actina de <i>Homo sapiens</i> (ANLN), ARNm [NM_018685]	A_23_P358684	NM_018685	NP_061155	X														
CDCA8	Asociado 8 del ciclo de división celular de <i>Homo sapiens</i> (CDCA8), ARNm [NM_018101]	A_23_P375	NM_018101	NP_060571	X														
GTSE1	Expresado 1 en fase G-2 y S (GTSE1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_016426]	A_23_P57588	NM_016426	NP_057510							X								
PRC1	Proteína 1 reguladora de citocinesis de <i>Homo sapiens</i> (PRC1), variante transcripcional 1, ARNm [NM_003981]	A_23_P206059	NM_003981	NP_003972															

ES 2 740 004 T3

CDC45L	Similar a 45 del ciclo de división celular CDC45 de <i>Homo sapiens</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ) (CDC45L), ARNm [NM_003504]	A_23_P5737 9	NM_00350 4	NP_003495				X	X		X
BUB1B	Homólogo beta 1 de gemación no inhibida por beclimidazoles (BUB1B) (levadura) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001211]	A_23_P 1634 81	NM_00121 1	NP_001202	X						
CDKN3	Cinasa inhibidora 3 dependiente de ciclina (CDKN3) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_005192]	A_33_P3307 903;A_23_P 48669	NM_00519 2	NP_005183					X		
CCNB2	Ciclina B2 (CCNB2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004701]	A_23_P6575 7	NM_00470 1	NP_004692	X					X	
RAD54L	Similar a RAD54 de <i>Homo sapiens</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ), variante transcripcional 1, ARNm [NM_003579]	A_23_P7411 5	NM_00357 9	NP_003570							
OIP5	Proteína 5 de interacción con Opa (OIP5) de <i>Homo sapiens</i> (OIP5), ARNm [NM_007280]	A_23_P3796 14	NM_00728 0	NP_009211	X						
SGOL1	Proteína 1 similar a sugosina ( <i>S. pombe</i> ) (SGOL1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional A1, ARNm [NM_001012409]	A_24_P2259 70	NM_00101 2409	NP_001012409	X						
MNDI	Homólogo 1 de divisiones nucleares de meiosis ( <i>S. cerevisiae</i> ) (MNDI) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_032117]	A_23_P1331 23	NM_03211 7	NP_115493							
RRM2	Ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001034]	A_24_P2256 16	NM_00103 4	NP_001025					X		
UBE2C	Enzima E2C de conjugación con ubiquitina (UBE2C) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 6, ARNm [NM_181803]	A_24_P2975 39	NM_18180 3	NP_861519	X						
KIF11	Miembro 11 de la familia de kinesina (KIF11) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004523]	A_24_P2270 91	NM_00452 3	NP_004514	X						

ES 2 740 004 T3

CASC5	Candidato 5 con susceptibilidad de cáncer (CASC5) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_170589]	A_23_P 1001 27; A_33_P3 213342	NM_17058 9	NP_733468	X								
SPC24	Homólogo del componente del completo de cinetocoro SPC24, NDC80 ( <i>S. cerevisiae</i> ) (SPC24) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_182513]	A_33_P3376 116	NM_18251 3	NP_872319	X								
CDCA2	Asociado 2 del ciclo de división celular (CDCA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_152562]	A_23_P3858 61	NM_15256 2	NP_689775	X								
CDC20	Homólogo 20 del ciclo de división celular ( <i>S. cerevisiae</i> ) de <i>Homo sapiens</i> (CDC20), ARNm [NM_001255]	A_23_P 1492 00	NM_00125 5	NP_001246	X								
CCNA2	Ciclina A2 (CCNA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001237]	A_23_P583 21	NM_00123 7	NP_001228	X							X	
MLFIIP	Proteína de interacción con MLFI (MLFIIP) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024629]	A_23_P2547 33	NM_02462 9	NP_078905	X								
BIRC5	Proteína 5 que contiene repeticiones IAP de baculovirus (BIRC5) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_001012271]	A_23_P1188 15	NM_00101 2271	NP_001012271	X							X	
TACC3	Proteína 3 que contiene superhélices ácidas de transformación (TACC3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006342]	A_23_P2128 44	NM_00634 2	NP_006333									
CENPE	Proteína E centromérica, 312 kDa (CENPE) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001813]	A_23_P2535 24	NM_00181 3	NP_001804	X								
KIF15	Miembro 15 de la familia de kinesina (KIF15) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_020242]	A_23_P 8090 2	NM_02024 2	NP_064627	X								
CDCA5	Proteína 5 asociada al ciclo de división celular (CDCA5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_080668]	A_23_P 1046 51	NM_08066 8	NP_542399	X						X		
SPAG5	Antígeno 5 asociado a sperm. (SPAG5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006461]	A_23_P8950 9	NM_00646 1	NP_006452	X								

ES 2 740 004 T3

CCNB1	Ciclina B1 (CCNB1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_031966]	A_23_P1221 97;A_33_P3 401621	NM_03196 6	NP_114172	X				X	X	
BLM	Similar a helicasa RecQ, síndrome de Bloom (BLM) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000057]	A_23_P8863 0	NM_00005 7	NP_000048			X				
CENPM	Proteína M centromérica (CENPM) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional1, ARNm [NM_024053]	A_33_P3387 831	NM_02405 3	NP_076958	X						
CLSPN	Homólogo de claspina ( <i>Xenopus laevis</i> ) (CLSPN) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_022111]	A_23_P1262 12	NM_02211 1	NP_071394							
TPX2	Homólogo asociado a microtúbulos, TPX2, ( <i>Xenopus laevis</i> ) (TPX2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_012112]	A_23_P6861 0	NM_01211 2	NP_036244	X						
GENS2	Subunidad 2 del complejo GINS (homólogo Psf2) (GENS2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_016095]	A_23_P1182 46	NM_01609 5	NP_057179			X				
MAD2L1	Proteína 1 similar a MAD2 deficiente en la detención mitótica (levadura) (MAD2L1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002358]	A_23_P9244 1	NM_00235 8	NP_002349	X						
RACGAP1	Proteína 1 activadora de Rac GTPasa (RACGAP1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional1, ARNm [NM_013277]	A_32_P1864 74	NM_01327 7	NP_037409							
ERCC6L	Similar al grupo 6 de complementación, reparación por escisión de complementación cruzada en roedores con deficiencia de reparación, (ERCC6L) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_017669]	A_23_P9632 5	NM_01766 9	NP_060139	X						
FANCD2	Grupo D2 de complementación de anemia de Fanconi (FANCD2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001018115]	A_33_P3257 808;A_23_P 143994	NM_00101 8115	NP_001018125							

ES 2 740 004 T3

PKMYTI	Tirosina/treonina 1 asociada a proteína cinasa de membrana (PKMYTI) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_182687]	A_33_P3397443	NMJ_82687	NP_872629	X			X	X		
CENPM	Proteína M centromérica (CENPM) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001002876]	A_24_P399888	NM_001002876	NP_001002876	X						
CENPH	Proteína H centromérica (CENPH) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_022909]	A_23_P110802	NM_022909	NP_075060	X						
ORC1L	Similar a la subunidad 1, complejo de reconocimiento de origen (levadura) (ORC1L) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004153]	A_23_P45799	NM_004153	NP_004144				X	X		
CCNE2	Ciclina E2 (CCNE2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_057749]	A_33_P3247022:A_33_P3217819	NM_057749	NP_477097					X		
TRIP13	Receptor de interacción 13 de la hormona tiroidea (TRIP13) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_004237]	A_33_P3339212	NM_004237	NP_004228							
NCAPG2	Subunidad G2, complejo de condensina II no-SMC (NCAPG2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_017760]	A_33_P3659876	NM_017760	NP_060230	X						
C11orfS2	Marco abierto de lectura 82 del cromosoma 11 (C11orfS2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_145018]	A_23_P429491	NM_145018	NP_659455							
CENPK	Proteína K centromérica (CENPK) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_022145]	A_23_P155989	NM_022145	NP_071428	X						
RAD51	Homólogo de RAD51 (homólogo de RecA, <i>E. coli</i> ) ( <i>S. cerevisiae</i> ) (RAD51) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_002875]	A_23_P88731	NM_002875	NP_002866							
CDTI	Factor 1 de replicación de ADN y de autorización de cromatina (CDTI) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_030928]	A_33_P3386262	NM_030928	NP_112190				X	X		
E2F1	Factor 1 de transcripción EF2 (E2F1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005225]	A_23_P80032	NM_005225	NP_005216	X	X			X		

ES 2 740 004 T3

GAS2L3	Proteína 3 similar a 2 específica de la detención del crecimiento (GAS2F3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_174942]	A_32_P189204	NM_174942	NP_777602															
SGOL2	Proteína 2 similar a sugosina (S. pombe) (SGOL2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_152524]	A_23_P411335	NM_152524	NP_689737	X														
BRCA1	Proteína 1 de cáncer de mama, de aparición temprana, (BRCA1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_007300]	A_23_P207400	NM_007300	NP_009231															
BRCA2	Proteína 2 de cáncer de mama, de aparición temprana, (BRCA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000059]	A_23_P99452	NM_000059	NP_000050															
FANCI	Grupo I de complementación, anemia de Fanconi (FANCI) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional, ARNm [NM_018193]	A_32_P95729	NM_018193	NP_060663															
POLE2	Épsilon 2 (subunidad p59) de polimerasa (dirigida a ADN) (POLE2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002692]	A_23_P163099	NM_002692	NP_002683					X		X								X
PTTG1	Transformante tumoral de pituitaria 1 (PTTG1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004219]	A_23_P7636	NM_004219	NP_004210	X														
KIF23	Miembro 23 de la familia de cinesina (KIF23) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_138555]	A_33_P3311755; A_23_P48835	NM_138555	NP_612565															
TRIP13	Receptor de interacción 13 de la hormona tiroidea (TRIP13) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001166260]	A_33_P3407256	NM_001166260	NP_001159732															
EXO1	Exonucleasa 1 (EXO1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_003686]	A_23_P23303	NM_003686	NP_003677															
ZWINT	Interaccionador ZW10 (ZWINT) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_032997]	A_33_P3212994; A_23_P63789	NM_032997	NP_127490															
KIF22	Miembro 22 de la familia de cinesina (KIF22) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_007317]	A_23_P54622; A_33_P3350634	NM_007317	NP_015556	X														

ES 2 740 004 T3

PRIM1	ADN, polipéptido 1 (49kDa) (PRIM1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000946]	A_23_P25019	NM_000946	NP_000937				X	X	X
FANCA	Grupo A de complementación, anemia de Fanconi (FANCA) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_000135]	A_23_P206441	NM_000135	NP_000126						
GINS4	Subunidad 4 (homólogo de Sld5) del complejo GINS (GINS4), ARNm [NM_032336]	A_33_P3340040	NM_032336	NP_115712				X		
CKS1B	Subunidad 1B reguladora de proteína cinasa CDC28 (CKS1B) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001826]	A_32_P206698;A_23_P45917	NM_001826	NP_001817				X	X	
CENPI	Proteína I centromérica (CENPI) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006733]	A_24_P419132;A_33_P3221313	NM_006733	NP_006724						
MCM5	Componente 5 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006739]	A_33_P3284951;A_23_P132277	NM_006739	NP_006730				X	X	X
FOXM1	Proteína M1 de caja de horquilla (FOXM1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_202002]	A_23_P151150	NM_202002	NP_973731						
FBXO5	Proteína 5 F-box (FBXO5) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001142522]	A_33_P3384871	NM_001142522	NP_001135994	X				X	
MCM7	Componente 7 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM7) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_182776]	A_23_P93690	NM_182776	NP_877577				X	X	X
ORC6L	Similar a la subunidad 6 del complejo de reconocimiento de origen (levadura) (ORC6L) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014321]	A_23_P100344	NM_014321	NP_055136				X	X	X
STMN1	<i>Estamina 1</i> (STMN1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_203401]	A_33_P3317523	NM_203401	NP_981946						

ES 2 740 004 T3

AURKA	Aurora cinasa A (AURKA) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_198433]	A_23_P1318 66	NM_19843 3	NP_940835	X															
KIF20B	Miembro 20B de la familia de cinesina (KIF20B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_016195]	A_23_P7507 1;A_33_P32 15239	NM_01619 5	NP_057279	X															
CKS2	Subunidad 2 reguladora de la proteína cinasa CDC28 (CKS2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001827]	A_23_P7172 7	NM_00182 7	NP_001818																
CIT	Citrón (serina/treonina cinasa 21 de interacción con rho) (CIT) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_007174]	A_33_P3312 301;A_23_P 420551	NM_00717 4	NP_009105	X															
GINS1	Subunidad 1 del complejo GINS (homólogo de Psf1) (GINS1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_021067]	A_33_P33400 25	NM_02106 7	NP_066545							X									
PSRC1	Superhélice 1 rica en prolina/serina (PSRC1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_032636]	A_23_P4653 9	NM_03263 6	NP_116025	X															
FEN1	Endonucleasa 1 específica de estructura flap (FEN1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_0041U]	A_24_P8489 8	NM_00411 1	NP_004102							X									
CHTF18	Homólogo 18 del factor de fidelidad de transmisión de cromosomas, CTF18, ( <i>S. cerevisiae</i> ) (CHTF18) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_022092]	A_23_P3542 97	NM_02209 2	NP_071375																
HAUS8	Subunidad 8, complejo similar a augmina HAUS, (HAUS8) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_033417]	A_23_P1419 65;A_33_P 3242124	NM_03341 7	NP_219485	X															
SMC4	Proteína 4 de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC4) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_005496]	A_33_P3716 128;A_33_P 3248519	NM_00549 6	NP_005487	X															
MCM7	Componente 7 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM7) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_005916]	A_33_P3258 223	NM_00591 6	NP_005907							X		X							X

ES 2 740 004 T3

MCM2	Componente 2 del complejo de mantenimiento de micromosomas (MCM2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004526]	A_32_P103633	NM_004526	NP_004517					X	X		X
UHRF1	Proteína 1 similar a ubiquitina con PHD y dominios de dedo de cinc (UHRF1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_013282]	A_23_P208880;A_33_P3379454	NM_013282	NP_037414								
H2AFX	Miembro X de la familia de histonas H2A (H2AFX) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002105]	A_24_P38895	NM_002105	NP_002096								
TIMELESS	Homólogo a timeless ( <i>Drosophila</i> ) (TIMELESS) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_003920]	A_23_P53276	NM_003920	NP_003911	X							
DBF4	Homólogo a DBF4 ( <i>S. cerevisiae</i> ) (DBF4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006716]	A_33_P3413523	NM_006716	NP_006707						X		X
CENPN	Proteína N centromérica (CENPN) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_018455]	A_23_P88740	NM_018455	NP_060925	X							
FANCA	Grupo A de complementación, anemia de Fanconi (FANCA) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001018112]	A_33_P3286422;A_33_P3386344	NM_001018112	NP_001018122								
LIN9	Homólogo a lin-9 ( <i>C. elegans</i> ) (LIN9), ARNm [NM_173083]	A_32_P233304	NM_173083	NP_775106								
HELLS	Linfoide específico de helicasa (HELLS) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018063]	A_23_P12816;A_33_P3258117	NM_018063	NP_060533	X							
CKAP2	Proteína 2 asociada a citoesqueleto (CKAP2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_018204]	A_23_P151405;A_24_P99090	NM_018204	NP_060674								
NCAPD2	Subunidad D2, complejo de condensina I no SMC (NCAPD2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014865]	A_33_P3303385;A_23_P25293	NM_014865	NP_055680	X							

ES 2 740 004 T3

RFC3	Factor C 3 (activador 1) de replicación, 38kDa (RFC3) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_002915]	A_23_P1419 3	NM_00291 5	NP_002906					X			
TYMS	Timidilato sintetasa (TYMS) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001071]	A_23_P5009 6	NM_00107 1	NP_001062						X		
HIST1H3F	Agrupación 1 de histonas H3f (HIST1H3F) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_021018]	A_23_P3079 9	NM_02101 8	NP_066298					X			
KIF18A	Miembro 18A de la familia de cinesina (KIF18A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_031217]	A_33_P3242 649	NM_03121 7	NP_112494	X							
BARD1	Dominio 1 RING asociado a BRCA1 (BARD1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000465]	A_23_P6777 1	NM_00046 5	NP_000456								
SYCE2	Proteína 2 del elemento central del complejo sinaptonémico (SYCE2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001105578]	A_32_P2035 28	NM_00110 5578	NP_001099048								
CDKN2C	Inhibidor 2C de cinasa dependiente de ciclina (p18, inhibe a CDK4) (CDKN2C) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_078626]	A_33_P3292 540	NM_07862 6	NP_523240		X					X	
CENPP	Proteína P centromérica (CENPP) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001012267]	A_33_P3245 321	NM_00101 2267	NP_001012267	X							
KNTC1	Proteína 1 asociada a cinetocoro (KNTC1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014708]	A_23_P1368 17	NM_01470 8	NP_055523	X							
ESPL1	Proteína 1 homóloga a cuerpos extra de poste de huso ( <i>S. cerevisiae</i> ) (ESPL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_012291]	A_23_P3270 7	NM_01229 1	NP_036423	X							
C13orf34	Marco abierto de lectura 34 del cromosoma 13 (C13orf34) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024808]	A_23_P2562 6	NM_0248 08	NP_079084								
MCM3	Componente 3 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002388]	A_23_P7873	NM_00238 8	NP_002379					X		X	X

ES 2 740 004 T3

GMNN	Inhibidor de replicación de ADN, geminina (GMNN) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_015895]	A_23_P1971 2	NM_01589 5	NP_056979															
SMC2	Proteína 2 de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001042550]	A_33_P3357 322;A_33_P 3378334	NM_00104 2550	NP_001036015	X														
CHAF1B	Subunidad B (p60) del factor 1 de ensamblaje de la cromatina CHAF1B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005441]	A_23_P5730 6	NM_00544 1	NP_005432															
POLA1	Subunidad catalítica, alfa 1, de polimerasa (dirigida por ADN) (POLA1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_016937]	A_32_P1701	NM_01693 7	NP_058633					X		X								X
INCENP	Antígenos proteicos internos de centrómero 135/155kDa (INCENP) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001040694]	A_23_P_1163 87	NM_00104 0694	NP_001035784	X														
CENPO	Proteína O centromérica (CENPO) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024322]	A_23_P5099 0;A_24_P27 6888	NM_02432 2	NP_077298	X														
MCM4	Componente 4 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM4) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_005914]	A_23_P3709 89	NM_00591 4	NP_005905					X		X								X
CENPN	Proteína N centromérica (CENPN) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001100624]	A_33_P3387 861	NM_00110 0624	NP_001094094	X														
KPNA2	Carinoferina alfa 2 (cohorte 1 RAG, importina alfa 1) (KPNA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002266]	A_23_P1252 65	NM_00226 6	NP_002257					X										

ES 2 740 004 T3

	Proteína 1 centromérica (CENP-1) (proteína 19 del complejo centromérico de interfase) (proteína de respuesta primaria a la hormona estimuladora de folículo) (proteína 1 de respuesta primaria a FSH ) (proteína 1 de respuesta primaria rica en leucina) [Fuente: UniProtKB/Swiss-Prot; Acc: Q92674] [ENST00000403304]	A_33_P3340468		#N/A	X							
MCM1	Componente 8 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM8) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_182802]	A_23_P68547	NM_182802	NP_877954				X		X		X
PSMC3IP	Proteína de interacción con PSMC3 (PSMC3IP) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_013290]	A_24_P287941	NM_013290	NP_037422								
CEP110	Proteína centrosómica de 110 kDa (CEP110), ARNm [NM_007018]	A_24_P109554	NM_007018	NP_008949							X	
E2F7	Factor 7 de transcripción E2F (E2F7) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_203394]	A_32_P210202	NM_203394	NP_976328								
DTYMK	Desoxitimidilato cinasa (timidilato cinasa) (DTYMK) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_012145]	A_23_P123974	NM_012145	NP_036277								
CDC25A	Homólogo A 25 del ciclo de división celular ( <i>S. pombe</i> ) (CDC25A) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001789]	A_24_P397107	NM_001789	NP_001780	X			X		X	X	
CDC7	Homólogo 7 del ciclo de división celular ( <i>S. cerevisiae</i> ) (CDC7) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_003503]	A_23_P148807	NM_003503	NP_003494						X		X
ADN2	Homólogo 2 de helicasa de replicación de ADN (levadura) (ADN2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001080449]	A_33_P3833211	NM_001080449	NP_001073918				X				

ES 2 740 004 T3

MCM6	Componente 6 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM6) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005915]	A_23_P9061 2	NM_00591 5	NP_005906					X	X		X
CHAF1A	Subunidad A (p150), factor 1 de ensamblaje de la cromatina (CHAF1A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005483]	A_24_P5351 9;A_33_P34 16366	NM_00548 3	NP_005474								
RFC2	Proteína 2 (activador 1) del factor C de replicación, 40 kDa (RFC2) de <i>Homo sapiens</i> variante transcripcional1, ARNm [NM_181471]	A_23_P9382 3	NM_18147 1	NP_852136					X			
RPA3	Proteína A3 de replicación 14 kDa (RPA3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002947]	A_23_P2564 55	NM_00294 7	NP_002938					X	X		X
STAG3	Antígeno 3 del estroma (STAG3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_012447]	A_23_P1456 57	NM_01244 7	NP_036579								
CDC25B	Homólogo B 25 (S. <i>pombe</i> ) del ciclo de división celular (CDC25B) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_021873]	A_23_P2107 26	NM_02187 3	NP_068659	X							X
SUV39H1	Homólogo 1 supresor de variación 3-9 ( <i>Drosophila</i> ) (SUV39H1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_003173]	A_33_P3407 524;A_23_P 422193	NM_00317 3	NP_003164								
RAD54B	Homólogo B de RAD54 (S. <i>cerevisiae</i> ) (RAD54B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_012415]	A_23_P8273 8	NM_01241 5	NP_036547								
POLA2	Polimerasa (dirigida a ADN) alfa 2 (subunidad de 70kD) (POLA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002689]	A_23_P1616 15	NM_00268 9	NP_002680					X	X		X
CEP152	Proteína centrosómica de 152 kDa (CEP152) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014985]	A_24_P6527 00	NM_01498 5	NP_055800								X
NCAPD3	Subunidad D3 del complejo de condensina II no SMC (NCAPD3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_015261]	A_32_P7144 7	NM_01526 1	NP_056076	X							

ES 2 740 004 T3

POLD1	Subunidad catalítica delta 1 de 125kDa de polimerasa (dirigida a ADN) (POLD1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002691]	A_23_P5045 5	NM_00269 1	NP_002682					X			
RFC5	Factor C (activador 1) 5 de 36,5kDa de replicación (RFC5) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_181578]	A_23_P9530 2	NM_18157 8	NP_853556					X			
RFC4	Factor C (activador 1) 4 de 37kDa de replicación (RFC4) de <i>Homo sapiens</i> variante transcripcional 1, ARNm [NM_002916]	A_23_P1819 6	NM_00291 6	NP_002907					X			
MASTL	Similar a serina/treonina cinasa asociada a microtúbulos (MASTL) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_032844]	A_24_P2580 51	NM_03284 4	NP_116233	X					X		
CENPN	Proteína N centromérica (CENPN) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001100625]	A_33_P3387 856	NM_00110 0625	NP_001094095	X							
CDKN2D	Inhibidor 2D de cinasa dependiente de ciclina (p19, inhibe a CDK4) (CDKN2D) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001800]	A_23_P8994 1	NM_0018 00	NP_001791		X				X		
ZWILCH	Homólogo a Zwilch asociado a cinetocoro ( <i>Drosophila</i> ) (ZWILCH) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_017975]	A_33_P3433 873	NM_01797 5	NP_060445	X							
DSN1	Homólogo ( <i>S. cerevisiae</i> ) del componente del complejo de cinetocoro DSN1, MIND (DSN1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_024918]	A_23_P1659 37	NM_02491 8	NP_079194	X							
LIG1	Ligasa I, dependiente de ADN, ATP (LIG1), ARNm [NM_000234]	A_23_P3911 6	NM_00023 4	NP_000225					X			

ES 2 740 004 T3

C21orf45	Marco abierto de lectura 45 del cromosoma 21 (C21orf45) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018944]	A_23_P252335	NM_018944	NP_061817	X														
DSCC1	Homólogo 1 defectuoso en cohesión con la cromátida hermana ( <i>S. cerevisiae</i> ) (DSCC1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024094]	A_23_P252740	NM_024094	NP_076999	X														
UBE2S	Enzima ES2 de conjugación con ubiquitina (UBE2S) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014501]	A_32_P171328	NM_014501	NP_055316	X														
CENPQ	Proteína Q centromérica (CENPQ) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018132]	A_23_P70328	NM_018132	NP_060602	X														
GOS2	Proteína 2 de intercambio G0/G1 (GOS2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_015714]	A_23_P74609	NM_015714	NP_056529															
LRRCC1	Proteína 1 que contiene dominio superhélice y repeticiones ricas en leucina (LRRCC1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional1, ARNm [NM_033402]	A_23_P157527	NM_033402	NP_208325	X														
CDK2	Cinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1,	A_23_P98898	NM_001798	Np_001789	X	X	X	X		X	X	X							
	Cds completo FLJ53559 de ADNc de <i>Homo sapiens</i> [NM_001798] [AK296555 que codifica BAG59178]	A_33_P3407636		#N/A															X
CENPJ	Proteína J centromérica (CENPJ) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_018451]	A_32_P219116	NM_018451	NP_060921															X
DDX11	Polipéptido 11 de caja DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) (homólogo de helicasa similar a CHL1, <i>S. cerevisiae</i> ) (DDX11) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_030653]	A_23_P203949;A_23_P203947	NM_030653	NP_0895911	X				X										X
SUV39H2	Homólogo 2 supresor de variegación 3-9 ( <i>Drosophila</i> ) de <i>Homo sapiens</i> (SUV39H2), ARNm [NM_024670]	A_23_P202392	NM_024670	NP_078946															



ES 2 740 004 T3

YEATS4	Proteína 4 que contiene el dominio YEATS (YEATS4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006530]	A_23_P8759 1	NM_006530	NP_006521	X														
TUBGCP3	Proteína 3 asociada al complejo de tubulina gamma (TUBGCP3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006322]	A_23_P7670 5	NM_006322	NP_006313															X
BUB3	Homólogo 3 de gemación no inhibida por becimidazoles (levadura) (BUB3) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001007793]	A_23_P4692 4	NM_001007793	NP_001007794	X														

**Tabla 3. Genes del ciclo celular regulados positivamente clasificados por disminución del Factor de Cambio**

Símbolo del gen	Descripción (2)	Nombre de la Sonda(3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de Proteína RefSec (5)
CDKN1A	Inhibidor 1 A de cinasa dependiente ciclina (p21, Cip1) (CDKN1A) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_078467]	A_24_P89457	NM_078467	NP_510867
MDM2	Homólogo de la proteína de unión p53 Mdm de <i>Homo sapiens</i> (ratón) (MDM2), variante transcripcional MDM2, ARNm [NM_002392]	A_23_P502750	NM_002392	NP_002383
TP53INP1	Proteína 1 nuclear inducible por la proteína p53 tumoral de <i>Homo sapiens</i> (TP53INP1), variante transcripcional 1, ARNm [NM_033285]	A_23_P168882	NM_033285	NP_150601
TGFB2	Factor beta 2 de crecimiento transformante (TGFB2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_003238]	A_24_P402438	NM_003238	NP_003229
CDH13	H-cadherina (corazón), cadherina 13 (CDH13) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001257]	A_32_P85999	NM_001257	NP_001248
RASSF2	Miembro 2 de la familia de dominio de asociación a Ras (RalGDS/AF-6) (RASSF2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_014737]	A_23_P166087	NM_014737	NP_055552

**Tabla 4. 18 genes del ciclo celular que siguen regulados negativamente con FC<-1,5 solo con el lote B a una MOI de 40.**

Símbolo del gen (1)	Descripción (2)	Nombre de la sonda (3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de Proteína RefSec (5)
ASPM	Homólogo de asp (huso anómalo) de <i>Homo sapiens</i> asociado a microcefalia ( <i>Drosophila</i> ) (ASPM), ARNm [NM_018136]	A_33_P3288159	NM_018136	NP_060606
AURKB	Aurora cinasa B (AURKB) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004217]	A_23_P130182	NM_004217	NPJ504208
CENPA	Proteína A centromérica (CENPA) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001809]	A_24_P413884	NM_001809	NP_001800
CENPF	Proteína F centromérica (CENPF) de 350/400 kDa (mitosina) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_016343]	A_23_P401;A_24_P96780	NM_016343	NP_057427
CKS1B	Subunidad 1B reguladora de proteína cinasa CDC28 (CKS1B) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_001826]	A_32_P206698	NM_001826	NP_001817
E2F8	Factor 8 de transcripción E2F (E2F8) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_024680]	A_23_P35871	NM_024680	NP_078956
ERCC6L	Similar al grupo 6 de complementación, reparación por escisión de complementación cruzada en roedores con deficiencia de reparación (ERCC6L) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_017669]	A_23_P96325	NM_017669	NP_060139
FAM83D	Miembro D 83 de similitud de secuencia con familia de <i>Homo sapiens</i> (FAM83D), ARNm [NM_030919]	A_23_P323751	NM_030919	NP_112181
KIFC1	Miembro C1 de la familia de kinesina (KIFC1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002263]	A_23_P133956	NM_002263	NP_002254
NEK2	Cinasa 2 relacionada con NIMA (gen a nunca en mitosis) (NEK2) de <i>Homo sapiens</i> ARNm [NM_002497]	A_24_P319613	NM_002497	NP_002488
NUSAP1	Proteína 1 nucleolar y asociada al huso (NUSAP1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_016359]	A_33_P3350488	NM_016359	NP_057443
OIP5	Proteína 5 de interacción con Opa (OIP5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_007280]	A_23_P379614	NM_007280	NP_009211
PRC1	Proteína 1 reguladora de citocinesis (PRC1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_003981]	A_23_P206059	NM_003981	NP_003972
RRM2	Ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 2, ARNm [NM_001034]	A_24_P225616	NM_001034	NP_001025
SGOL1	Proteína 1 similar a sugosina ( <i>S. pombe</i> ) (SGOL1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional A2, ARNm [NM_001012410]	A_23_P29723	NM_001012410	NP_001012410
SPC25	Componente del complejo cinetocoro NDC80, SPC25, homólogo ( <i>S. cerevisiae</i> ) (SPC25) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_020675]	A_23_P51085	NM_020675	NP_065726
TOP2A	Alfa II topoisomerasa (ADN) de 170kDa (TOP2A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001067]	A_23_P118834	NM_001067	NP_001058
TTK	Proteína cinasa TTK (TTK) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_003318]	A_23_P259586	NM_003318	NP_003309

Tabla 5. Listado de genes que el inventor considera que están relacionados con senescencia celular.

Símbolo del gen HUGO (1)	SASP (2)	Wikipathway de "Senescencia y Autofagia" (3)	Coppé <i>et al</i> , 2010(4)	Young <i>et al</i> , 2009 (5)
AKT1S1		X		
AMBRA1		X		
ANG	X		X	
AREG	X		X	
ATG10		X		
ATG16L1		X		
ATG3		X		
ATG5		X		
ATG7		X		
BCL2		X		
BECN1		X		
BMH		X		
BMP2		X		
BRAF		X		
CCL1	X		X	
CCL3	X	X		
CCL8	X		X	
CCL11	X		X	
CCL13	X		X	
CCL20	X		X	
CCL25	X		X	
CCL26	X		X	
CCL16	X		X	
CD44		X		
CDC25B		X		
CDKN1A		X		
CDKN1B		X		
CDKN2A		X		
CEBPB	X	X		
COL10A1	X	X		
COL1A1	X	X		
CREG1		X		
CSF2	X		X	
CSF3	X		X	
CTSB	X		X	
CXCL1	X	X		

ES 2 740 004 T3

CXCL11	X		X	
CXCL12	X		X	
CXCL13	X		X	
CXCL14		X		
CXCL2	X		X	
CXCL5	X		X	
CXCR2	X			X
E2F1		X		
EGF	X		X	
EGFR	X		X	
EREG	X		X	
FAS	X		X	
FGF2	X		X	
FGF7	X		X	
FKBP8		X		
FN1	X	X		
GABARAP		X		
GABARAPL1		X		
GABARAPL2		X		
GSK3B		X		
GSN		X		
HGF	X		X	
HMGA1		X		
HRAS		X		
ICAM1	X		X	
ICAM3	X		X	
IFI16		X		
IFNB1		X		
IFNG	X	X		
IGF1		X		
IGF1R		X		
IGFBP2	X		X	
IGFBP3	X		X	
IGFBP4	X		X	
IGFBP5		X		
IGFBP6	X		X	
IGFBP7	X	X		
IL1A	X	X		
IL1B	X	X		
IL13	X		X	
IL15	X		X	

ES 2 740 004 T3

IL24		X		
IL3		X		
IL6	X	X		
IL6R		X		
IL6ST	X	X		
IL7	X		X	
IL8	X	X		
ING1		X		
ING2		X		
INHBA		X		
INS		X		
IRF1		X		
IRF5		X		
IRF7		X		
JUN		X		
KIAA0652		X		
KITLG	X		X	
LAMP1		X		
LAMP2		X		
MAP1LC3A		X		
MAP1LC3B		X		
MAP1LC3C		X		
MAP2K3		X		
MAPK1		X		
MDM2		X		
MLL		X		
MIF	X		X	
MST8		X		
MMP10	X		X	
MMP12	X		X	
MMP13	X		X	
MMP14	X	X		
MMP1	X		X	
MMP3			X	
MTOR				
NGF	X	X	X	
NRG1	X		X	
PIGF	X		X	
PIK3C3		X		

ES 2 740 004 T3

PLA2R1	X			X
PLA2G2A	X			X
PLAT	X	X		
PLAU	X		X	
PLAUR	X		X	
PTEN		X		
RAF1		X		
RB1		X		
RB1CC1		X		
RNASEL		X		
RSL1D1		X		
SERPINB2	X	X		
SERPINE1	X	X		
SH3GLB1		X		
SLC39A1		X		
SLC39A2		X		
SLC39A3		X		
SLC39A4		X		
SPARC		X		
SQSTM1		X		
SRC		X		
TIMP1	X		X	
TIMP2	X		X	
TGFB1		X		
THBS1		X		
TNFSF15		X		
TNFRSF11B	X		X	
TNFRSF10C	X		X	
TNFRSF1B	X		X	
TNFRSF1A	X		X	
TP53		X		
ULK1		X		
UVRAG		X		
VEGF	X		X	
VTN		X		

**Tabla 6. 16 genes de senescencia expresados diferencialmente en células transducidas con el lote B obtenido con suero (B-S) a una MDI de 150 frente a células no transducidas**

Símbolo del gen HUGO (1)	Descripción (2)	Nombre de la sonda (3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de proteína RefSec (5)
COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000088]	A_33_P3304668	NM_000088	NP_000079
CXCL1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad alfa estimuladora del crecimiento del melanoma) (CXCL1) de <i>Homo sapiens</i> ARNm [NM_001511]	A_23_P7144;A_33_P3330264	NM_001511	NP_001502
CXCL2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002089]	A_24_P257416;A_23_P315364	NM_002089	NP_002080
GABARAPL1	Proteína 1 similar a la proteína asociada al receptor GABA(A) (GABARAPL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_031412]	A_24_P4816;A_33_P3812669	NM_031412	NP_113600
IGF1	Factor 1 de crecimiento similar a insulina (somatomedina C) (IGF1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 4, ARNm [NM_000818]	A_23_P13907	NM_000818	NP_000609
PLAU	Activador de plasminógeno, urocinasa (PLAU) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NMJ302658]	A_23_P24104;A_33_P3306146	NM_002658	NP_002649
AREG	Anfirregulina (AREG) de <i>Homo sapiens</i> ARNm [NM_001657]	A_23_P259071	NM_001657	NP_001648
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_0012001]	A_33_P3237150	NM_001200	NP_001191
EREG	Epirregulina (EREG) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001432]	A_23_P41344	NM_001432	NP_001423
HMGA1	Proteína AT-hook 1 del grupo de movilidad alta (HMGA1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_145901]	A_23_P42331	NM_145901	NP_665908
ICAM1	Molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000201]	A_23_P153320	NM_000201	NP_000192
MMP1	Metalopeptidasa 1 de la matriz (MMP1) (colagenasa intersticial) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_002421]	A_23_P1691	NM_002421	NP_002412
MMP14	Metalopeptidasa 14 de la matriz (MMP14) (insertada en la membrana) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004995]	A_24_P82106	NM_004995	NP_004986
NRG1	Neurreulina 1 (NRG1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional HRG-gamma, ARNm [NM_004495]	A_33_P3284345	NM_004495	NP_004486
PLAT	Activador de plasminógeno tisular (PLAT) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_000930]	A_23_P82868	NM_000930	NP_000921
PLAUR	Receptor del activador de plasminógeno, urocinasa (PLAUR) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_001005377]	A_23_P16469	NM_001005377	NP_001005377

Tabla 7. 10 biomarcadores candidatos asociados a senescencia.

Simbolo de gen HUGO (1)	Descripción (2)	Nombre de la sonda (3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de proteína RefSec (5)	FCB-S frente a NT MDI 150(6)	FCB frente a NT MDI 150 (7)	FCC frente a NT MDI 150 (8)	FCB frente a NT MDI 40 (9)	FCC frente a NT MDI 40 (10)	FC B-S frente a NT MDI 40 (11)
GABARAPL1	Proteína 1 similar a la proteína asociada al receptor GABA(A) (GABARAPL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_031412]	A_24_P4816:A_33_P3812669	NM_031412	NP_113600	-2,0	#N/A	1,4	#N/A	#N/A	-1,5
1GF1	Factor 1 de crecimiento similar a insulina (somatomedina C) (IGF1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 4, ARNm [NM_000618]	A_23_P13907	NM_000618	NP_000609	-2,8	#N/A	1,5	#N/A	1,3	-2,3
PLAU	Activador de plasminógeno, urocinasa (PLAU) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_002658]	A_23_P24104:A_33_P3306146	NM_002658	NP_002649	3,3	-1,4	#N/A	#N/A	#N/A	2,2
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_0012001]	A_33_P3237150	NM_001200	NP_001191	2,0	#N/A	1,2	#N/A	#N/A	2,3
EREG	Epirregulina (EREG) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_0014321]	A_23_P41344	NM_001432	NP_001423	2,5	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	2,0
MMP1	Metalopeptidasa 1 de la matriz (MMP1) (colagenasa intersticial) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_002421]	A_23_P1691	NM_002421	NP_002412	3,1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	2,8
MMP14	Metalopeptidasa 14 de la matriz (MMP14) (insertada en la membrana) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_004995]]	A_24_P82106	NM_004995	NP_004986	1,8	#N/A	#N/A	#NZ/A	#N/A	1,6
NRG1	Neurreulina 1 (NRG1) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional HRG-gamma, ARNm [NM_004495]	A_33_P3284345	NM_004495	NP_004486	1,6	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	2,2
PLAT	Activador de plasminógeno tisular (PLAT) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 1, ARNm [NM_000930]]	A_23_P82868	NM_000930	NP_000921	3,1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1,6
PLAUR	Receptor del activador de plasminógeno, urocinasa (PLAUR) de <i>Homo sapiens</i> , variante transcripcional 3, ARNm [NM_001005377]	A_23_P16469	NM_001005377	NP_001005377	1,7	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	1,9

**Tabla 8. Genes que no impactaron en células transducidas con el lote C, en comparación con células transducidas con otros lotes**

Simbolo del gen HUGO (1)	Descripción (2)	Nombre de la sonda (3)	Registro de ácido nucleico RefSec (4)	Registro de proteína RefSec (5)	FC B frente a NT MDI 150 (6)	FC C frente a NT MDI 150 (7)	FC B-S frente a NT MDI 150 (8)	FC B frente a NT MDI 40 (9)	FC C frente a NT MDI 40 (10)	FC B-S frente a NT MDI 40 (11)
CXCL 2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002089]	A_24_P2574 16	NM_002089	NP_002080	-2,04	ND	4,17	-1,53	ND	ND
FOXQ 1	Caja QI de horquilla (FOXQ1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_033260]	A_32_P1642 46	NM_033260	NP_150285	-1,82	ND	2,35	-1,27	ND	1,36
MAP3 K8	Proteína cinasa cinasa cinasa 8 activada por mitógeno (EC 2.7.11.25) (proto-oncogén de serina /treonina- proteína cinasa COT)(oncogén tiroideo de cáncer de Osaka)(C-COT) (Locus 2 de progresión tumoral) (TPL-2) [Fuente: UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41279] [ENST000003753221]	A_33-P3246 505	*	**	-2,08	ND	-2,20	ND (FC-1,23)	ND	-2,28

\*La secuencia de la sonda A\_33\_P3246505 no coincide con ningún número de referencia de ARN RefSec. Coincide con el número de registro AY309013 del Genbank. \*\* La secuencia de ácido nucleico AY309013 corresponde al número de registro de proteína AAP45053 del Genbank.

**Tabla 9. Validación de genes del ciclo celular de la tabla 4 como biomarcadores con rLV-EF1-GFP a una MDI de 40.**

Símbolo del gen	FC (B-S frente a NT)	FC (B frente a NT)	FC (C frente a NT)
ASPM	-2,3	-2,6	-1,9
ASPM	-2,1	-2,5	-2,0
AURKB	-2,0	-2,7	-1,8
CENPA	-2,1	-2,8	-1,9
CENPF	-1,9	-2,4	-2,0
CKS1B	-1,8	-2,8	-2,0
CKS1B	-U	-2,4	-1,9
E2F8	-1,9	-2,9	-2,0
ERCC6L	-1,7	-2,5	-1,8
FAM83D	-1,9	-2,9	-2,1
KIFC1	-1,9	-3,4	-2,3
MKI67	-2,0	-2,8	-2,4
MKI67	-1,9	-2,8	-2,3
MKI67	-2,1	-2,8	-1,9
NEK2	-2,1	-3,1	-2,2
NUSAP1	-1,9	-2,7	-1,9
OIP5	-2,0	-2,7	-2,0
PRC1	-1,8	-2,8	-2,0
RRM2	-1,8	-2,1	-1,3
SGOL1	-2,4	-3,0	-2,1
SPC25	-1,8	-2,8	-1,8
TOP2A	-2,0	-2,4	-1,6
TTK	-1,9	-2,6	-1,7

**Tabla 10: Secuencia de cebadores utilizados en el experimento de validación**

Símbolo del gen	Secuencia del cebador directo (5' -> 3')	Secuencia del cebador inverso (5' -> 3')
EREG	AGGAGGATGGAGATGCTCTGTG	ACTGCCTGTAGAAGATGGAAACCC
CXCL2	CCCAAACCGAAGTCATAGCCACAC	GCCACCAATAAGCTTCCTCCTCC