(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 899 978**

(51) Int. CI.:

C12N 7/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2016 PCT/US2016/032082**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16183312**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2016 E 16724820 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 3294875**

(54) Título: **Sistema de expresión potenciada mediada por ICP0**

(30) Prioridad:

13.05.2015 US 201562161194 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2022

(73) Titular/es:

SANOFI PASTEUR INC. (100.0%)
One Discovery Drive
Swiftwater, PA 18370, US

(72) Inventor/es:

DELAGRAVE, SIMON y
LAI, CHARCHANG

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Sistema de expresión potenciada mediada por ICP0

CAMPO

Se proporcionan métodos y composiciones para potenciar la expresión de proteínas recombinantes.

ANTECEDENTES

La expresión eficaz de proteínas recombinantes es esencial para la producción de proteínas terapéuticas, particularmente cuando la proteína es parcialmente tóxica para la célula anfitriona que la produce. Una expresión eficaz también es vital cuando se produce un virus con replicación defectuosa para el uso en vacunas. En este escenario, ciertos genes esenciales se retiran del genoma viral para evitar la replicación viral en la vacuna. sin embargo, a fin de hacer crecer el virus vacunal en cultivo celular, las proteínas requeridas para la replicación del virus se pueden proporcionar en *trans* para complementar el virus con replicación defectuosa, y la expresión insuficiente de estas proteínas complementarias puede limitar el rendimiento viral.

El herpes genital es una enfermedad de transmisión sexual provocada habitualmente por infección con virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2). Después de la infección, el HSV-2 puede persistir con virus latente en los ganglios nerviosos, permitiendo brotes episódicos de lesiones genitales dolorosas en hasta 25% de pacientes que están infectados. La transmisión de HSV de una mujer infectada con enfermedad activa a su recién nacido también puede conducir a graves complicaciones neurológicas o muerte del bebé.

El ciclo vital del HSV se puede dividir en infección lítica de queratinocitos y fibroblastos e infección latente de neuronas sensoriales. Durante la fase latente del HSV, su genoma permanece inactivo con pocos o ningún gen expresado. Los agresores externos pueden activar la fase lítica del HSV, donde se activa un programa completo de expresión génica y replicación del genoma dando nuevos viriones.

Como con muchos virus, los genes de HSV se pueden dividir en tres categorías amplias, llamadas temprana inmediata (IE), temprana (E) y tardía (L), dependiendo de la cronología de su expresión después de la infección. El polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") con virus del herpes simple es una proteína IE encontrada en HSV y herpesvirus alfa relacionados. El ICPO se descubrió en los últimos 1980 y primeros 1990, pero su función todavía es en gran parte desconocida. Se ha presentado que el ICPO puede activar la transcripción génica, y la eliminación de ICPO reduce la replicación de HSV *in vitro* y atenúa el virus *in vivo* al inactivar su capacidad para la transición a la replicación lítica. Véase, p. ej., Boutell y Everett, J. Gen. Virol (2013) 94:465-481, y Lanfranca y cols., Cells (2014) 3:438-454.

A nivel molecular, el ICPO tiene un fenotipo muy complejo. Se han propuesto al menos cuatro mecanismos para explicar cómo el ICPO modula la transcripción génica. Estos implican generalmente la modificación de cromatina a fin de desreprimir el genoma de HSV después de la replicación en células neuronales. También se ha propuesto que el ICPO interactúa con el factor de transcripción E2FBP1. Además, una característica fundamental del ICPO es su actividad de ubiquitina ligasa E3 mediada por su dominio RING. El ICPO provoca ubiquitinación de proteínas, que conduce a su degradación o cambia su función. Un número de proteínas elegidas como diana para la ubiquitinación por ICPO participa en mecanismos a través de los cuales las células resisten infecciones virales. Por ejemplo, PML, un componente de los cuerpos nucleares ND10, que interfieren con la replicación del genoma de HSV, se degrada mediante ubiquitinación mediada por ICPO, como otras proteínas tales como IFI16 e IkBa implicadas en la inmunidad innata a infecciones. A pesar de la importancia aparente del ICPO en el ciclo celular del HSV, se sabe muy poco acerca del ICPO.

El desarrollo de una vacuna para HSV-2 puede ser capaz de prevenir una enfermedad por herpes y bloquear la extensión del virus. Sin embargo, estudios clínicos previos de una vacuna subunitaria para HSV-2 que contiene glicoproteína D no mostraban eficacia para prevenir la infección por HSV-2, véase R.B. Belshe y cols., NEJM 366:34-43 (2012). Se ha propuesto que una vacuna capaz de imitar una infección viral natural e inducir una amplia respuesta inmunitaria puede ser un candidato a vacuna atractivo, según se apunta en M.C. Bernard y cols., PLOS One 10(4):e0121518 (2015).

HSV529 es una variante de HSV-2 con replicación defectuosa, también conocida como ACAM529, según se describe en Delagrave y cols., PLOS One 7(10):e46714 (2012) y M.C. Bernard y cols., PLOS One 10(4):e0121518 (2015). El virus HSV529, que es un clon purificado en placas de la cepa rederivada dl5-29, carece de dos genes de replicación de ADN viral (U_L5 y U_L29) y no se puede replicar en ausencia de estos productos génicos. Da Costa y cols. J. Virol. 7963-7971 (2000); S.T. Mundle, PLOS One 8(2):e57224 (2013). El virus HSV529 se hace crecer usando la línea de células cooperadoras complementarias, AV529-19, que es una línea de células Vero que se transfectaba establemente para suministrar las proteínas de HSV-2 UL5 y UL29 en *trans* en células infectadas. En modelos de herpes genital en ratones y cobayas, HSV529 induce respuestas inmunitarias y bloquea la infección por HSV-2, véase M.C. Bernard y cols., PLOS One 10(4):e0121518 (2015) y las referencias de la misma.

Los presentes inventores describen en la presente que el virus HSV-2 silvestre genera un rendimiento viral significativamente superior que el HSV529 después de la infección de células AV529-19. Dada la necesidad de generar el candidato clínico HSV529 a gran escala con propósitos clínicos, los presentes inventores investigaron métodos para incrementar el rendimiento viral. Dado el papel crítico conocido de ICP8 (la proteína expresada por el gen U_L29) en la replicación de HSV-2, véase P.E. Boehmer y cols., J Biol Chem 269(46):29329-3 (1994), los presentes inventores investigaron la expresión de ICP8 en células AV529-19. Los presentes inventores encontraron inesperadamente que ICP8 solo se podía detectar en células AV529-19 después de la infección con HSV529. Así, existe una necesidad en la técnica de mejorar la producción de proteínas recombinantes en células AV529-19 para incrementar el rendimiento de la producción de HSV529. También existe una necesidad en la técnica de incrementar la producción de proteínas en otros sistemas, tal como, por ejemplo, cuando se producen productos biológicos terapéuticos para la producción en masa, o cuando se produce una vacuna con replicación defectuosa en sistemas complementarios trans.

Samaniego LA, y cols. (J Virol. 1997;71(6):4614-4625) describe cómo la proteína temprana inmediata del virus del herpes simple ICPO afecta a la transcripción desde el genoma viral y a la supervivencia de células infectadas en ausencia de ICP4 y ICP27.

Quinlan y cols. (Molecular and Cellular Biology mayo 1985, 5 (5) 957-963) describe la estimulación de la expresión de una proteína que se une a ADN del virus del herpes simple mediante dos funciones virales.

Jordan R., y cols. (J Virol. 1997;71(9):6850-6862) describe cómo la activación de la expresión génica de ICPO del virus del herpes simple tipo 1 se produce a nivel de la síntesis de ARNm.

SUMARIO

La presente invención proporciona un método para producir un virus con replicación defectuosa en cultivo, que comprende:

a. proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se requiere para la replicación de un virus con replicación defectuosa y en donde la célula es una célula mamífera o aviar;

b. introducir en la célula un polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") por virus de herpes simple, incrementando de ese modo la expresión de la proteína recombinante;

c. introducir en la célula un virus con replicación defectuosa, en donde la proteína recombinante complementa al virus con replicación defectuosa en trans; y

d. aislar el virus con replicación defectuosa;

en donde el ICPO se introduce mediante transducción con un vector viral seleccionado de vectores de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociado.

También se proporciona un método para producir un virus con replicación defectuosa en cultivo, que comprende las siguientes etapas separadas:

a. proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se requiere para la replicación de un virus con replicación defectuosa y en donde la célula es una célula mamífera o aviar;

b. introducir en la célula un polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") por virus de herpes simple, incrementando de ese modo la expresión de la proteína recombinante;

c. introducir en la célula un virus con replicación defectuosa, en donde la proteína recombinante complementa al virus con replicación defectuosa en trans; y

d. aislar el virus con replicación defectuosa;

en donde el virus con replicación defectuosa es un miembro de la familia de virus herpes, y:

i. la proteína recombinante es ICP8 y/o pUL5 y el virus con replicación defectuosa se introduce en la célula después del ICPO; o

ii. la proteína recombinante es ICP8 y/o pUL5 y el ICPO se introduce con un vector o una construcción de expresión que codifica ICPO.

También se proporciona un método para producir HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa o para incrementar el rendimiento de HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa, que comprende las siguientes etapas, en orden:

a. introducir ICPO en células AV529-19, en donde el ICPO incrementa la expresión de al menos una de ICP8 o pUL5;

b. infectar las células AV529-19 con HSV529; y

c. aislar HSV529.

Al evaluar los medios por los que se incrementa ICP8 en células AV529-19 después de la infección con HSV529, los presentes inventores han determinado que la proteína de HSV temprana inmediata, ICPO, es capaz de inducir células AV529-19 para incrementar la expresión de ICP8. El aporte de ICPO recombinante, mediante transducción o transfección, puede incrementar los niveles de ICP8, así como ser capaz de incrementar la expresión de proteínas recombinantes. Además, la expresión de ICPO en células AV529-19 antes de la infección con el virus HSV529 conduce a rendimientos virales significativamente incrementados.

Según la descripción, los inventores han conseguido un incremento en la expresión de proteínas a través de la coexpresión de ICPO. En un aspecto, se divulga un método para incrementar el rendimiento de la expresión de proteína recombinante in vitro, en donde se introduce ICPO en una célula que expresa una proteína recombinante, incrementando de ese modo el rendimiento de la proteína recombinante. En un aspecto, la célula es AV529-19 y la proteína recombinante es ICP8 o pUL5.

En una realización, la invención comprende un método para producir virus o vacuna viral con replicación defectuosa en cultivo. El método comprende proporcionar una célula que comprende al menos una proteína recombinante, en donde esta proteína recombinante se requiere para la replicación de un virus por lo demás con replicación defectuosa. La introducción de ICPO en la célula se realiza para incrementar la expresión de la proteína recombinante, el virus con replicación defectuosa se introduce en la célula y el virus o la vacuna viral con replicación defectuosa se aísla. La introducción de ICPO incrementa el rendimiento del virus con replicación defectuosa.

En ciertas realizaciones, la célula es AV529-19 y la proteína recombinante es ICP8 o pUL5.

En ciertas realizaciones, la proteína recombinante complementa a un virus con replicación defectuosa en trans.

En otra realización, el HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa se produce en células AV529-19 después de la introducción de ICPO. El ICPO se introduce en células AV529-19, en donde el ICPO incrementa la expresión de al menos una de las proteínas de complementación ICP8 o pUL5. Las células AV529-19 son infectadas con el virus HSV529, y la vacuna de HSV529 se aísla. La introducción de ICPO incrementa el rendimiento del HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante es episómico o está integrado en el genoma de la célula anfitriona. Este ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

El ICPO se puede introducir en la célula mediante transfección o transducción. El ICPO se puede introducir mediante transducción con HSV-2, HSV-2 con replicación defectuosa, HSV529 o HSV-1. El ICPO también se puede introducir mediante transducción con un adenovirus que exprese ICPO. El ICPO se puede introducir mediante transfección con un plásmido que codifique ICPO; este plásmido puede tener un promotor inducible o no inducible que conduzca la expresión de ICPO. El promotor inducible se puede seleccionar de promotores regulados químicamente o físicamente. La expresión de ICPO por este promotor inducible puede estar regulada por una molécula pequeña, tal como doxiciclina. El promotor no inducible se puede seleccionar del grupo que consiste en promotores de CMV y SV40, así como los que contienen elementos promotores conocidos tales como la secuencia TATA, la secuencia GC, la secuencia CCAAT, el elemento de reconocimiento B y el elemento iniciador.

En ciertas realizaciones, la cantidad de proteína recombinante producida o aislada es mayor que la cantidad de proteína recombinante producida o aislada en células de control que no comprenden ICPO.

Objetivos y ventajas adicionales se indicarán en parte en la descripción que sigue y en parte serán obvios a partir de la descripción o pueden ser aprendidos mediante la práctica. Los objetivos y la ventajas se entenderán y conseguirán por medio de los elementos y las combinaciones apuntados particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

Se ha de entender que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas de las reivindicaciones.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios descritos en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra el crecimiento de HSV529 cuando se añade a una monocapa de células que comprenden los genes de complementación tanto UL29 como UL5. Las placas de la derecha muestran monocapas de las líneas de células Vero AV529-19 (arriba a la derecha) y V529 (abajo a la derecha), ambas de las cuales expresan tanto UL5 como UL29. Las células V827 (arriba a la izquierda) expresan UL29 pero no UL5; mientras que las células L2-5 (abajo a la derecha) expresan UL5 pero no UL29.

La **Figura 2** muestra el incremento en la replicación de HSV-2 silvestre en comparación con HSV529 en células AV529-19. Las células AV529-19 se infectaron bien con HSV529 o bien con HSV-2 silvestre, y las células infectadas se recogieron y se sometieron a lisis. A continuación, los títulos de HSV-2 se determinaron mediante ensayo de placas sobre células AV529-19 de complementación. P = 0,0173, mediante la prueba de la t de 2 colas.

La **Figura 3** muestra la expresión inducida de ICP8 cuando células AV529-19 son infectadas con HSV529. Las células AV529-19 bien se infectaron simuladamente (NC) o bien se infectaron con HSV529 y a continuación se dejaron incubar durante 41 horas bajo condiciones de cultivo estándar. Las células se recogieron y se sometieron a lisis en tampón de muestra de SDS-PAGE, y las muestras resultantes se analizaron mediante transferencia Western.

La **Figura 4** muestra la inducción de la expresión de ICP8 codificada por un replicón después de la infección con HSV529. Se realizaron transferencias Western usando quimioluminiscencia después de la inducción de la expresión de ICP8 por dl5-29 (también conocido como HSV529) en células AV529-19 (etiquetadas como AV529) y en células Vero transfectadas con un replicón de VEE que expresa UL29 o UL5. La numeración en la parte superior de la transferencia indica horas después de la infección; la numeración de la izquierda indica peso molecular.

La **Figura 5** muestra concentraciones de ARNm de UL29 recombinante después de la infección con HSV-2 o HSV529. Se uso una PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) de Taqman para medir ARNm bien en células Vero no modificadas o bien en células AV529-19 después de la infección bien con HSV-2 (cepa 186 syn+1) o bien con HSV529 a las 0, 6, 24, 48 y 72 h después de la infección. Los cebadores y la sonda de qRT-PCR eran específicos para la UTR 3' del vector pcDNA3.1+ usado para expresar UL29 recombinante en células AV529-19. Las barras de error muestran la desviación estándar.

La **Figura 6** muestra el incremento en la expresión de ICP8 mediante la transducción de ICPO en la línea celular de complementación AV529-19. Las células AV529-19 se transdujeron con el vector adenoviral indicado (MOI = 25) y se recogieron 24 h más tarde.

La **Figura 7** muestra la inducción de ICP8 mediante infección con ICPO en células AV529-19. La línea celular HEK293A, una línea celular de complementación usada para producir vectores adenovirales, y la línea celular AV529-19 se infectaron con un vector adenoviral que expresa ICPO. Las células infectadas se recogieron 24 h después de la infección y se analizaron mediante transferencia Western.

Las **Figuras 8A** y **8B** muestran que la cotransducción de ICPO incrementa la expresión de proteínas recombinantes codificadas episómicamente. Las células AV529-19 se transdujeron con vectores adenovirales que expresan gD313, VP16 o luciferasa (Luc) y a continuación 24 h más tarde bien con un vector adenoviral vacío o bien con un adenovirus que expresa ICPO. Veinticuatro horas después de la cotransducción, se recogieron muestras para transferencias Western.

Las **Figuras 9A** y **9B** muestran que el ICPO no altera los patrones de expresión de proteínas de la célula anfitriona. Las células se cotransdujeron con los vectores adenovirales indicados y bien con un vector vacío o bien con un vector que expresa ICPO, según se muestra respectivamente por los símbolos - o +. En la Figura 9A, los lisados celulares se recogieron 24 h después de la transducción y se analizaron mediante transferencia Western frente a la proteína constitutiva GAPDH. En la Figura 9B, los lisados celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Simple-Blue.

La **Figura 10** muestra que ICPO potencia la expresión conducida por el promotor de CMV o SV40 de genes codificados por plásmidos. Las células AV529-19 se transfectaron transitoriamente con plásmidos y se incubaron durante 24 h. Los plásmidos usados, pGL4.50 y pGL4.13 (Promega), codifican luciferasa de luciérnaga bajo el control del CMV y el promotor de SV40, respectivamente. A continuación, las células transfectadas se transdujeron con un vector adenoviral de control o un vector que expresa ICPO. Las células se recogieron 36 h más tarde y se analizaron mediante un ensayo de luminiscencia.

La **Figura 11** muestra la expresión potenciada de genes codificados por plásmidos en células Vero inducidas por ICPO. Las células Vero se transfectaron transitoriamente con plásmidos y se dejaron recuperar durante 24 h. Estos plásmidos bien no codificaban transgén (plásmido Ctrl) o bien codificaban luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de CMV (CMV-Luc). A continuación, las células se transdujeron con un vector adenoviral (Ad) de control o un vector que exprese ICPO (Ad ICPO). Las células se recogieron 36 h más tarde y se analizaron mediante un ensayo de luminiscencia. $P < 0,0001$ para la diferencia entre el vector adenoviral de control, y el adenovirus que expresaba ICPO; las barras de error muestran una desviación estándar.

La **Figura 12** indica que los mutantes de ICPO no conservativos no inducen la expresión de ICP8 en células AV529-19. Las células AV529-19 se transdujeron con vectores adenovirales que no comprendían gen extraño (AdVect), y comprendían ICPO silvestre (AdICP0), un mutante de ICPO en el que el aproximadamente 1/3 N-terminal se elimina y el extremo C se marca con una etiqueta de polihistidina (2/3 ICPO C-H), o un mutante de ICPO en el que aproximadamente 5% de todos los aminoácidos tienen sustituciones no conservativas y una etiqueta de polihistidina C-terminal (ICPO 5% mut-H). También se incluían células no transducidas (NC) como controles negativos. Después bien de 48 o bien de 24 h de incubación después de la transducción, según se indica, las células se recogieron y se analizaron mediante transferencia Western con un anticuerpo anti-HSV-2 policlonal de conejo.

La **Figura 13** muestra que la transfección plasmídica de ICPO incrementa la expresión de proteína recombinante en células AV529-19. Las células AV529-19 bien no se transfectaban (NC), bien se transducían con un adenovirus que expresa ICPO (Ad ICP0), bien se transfectaban con el vector vacío pcDNA3.1 (pcDNA), bien se transfectaban con ICPO expresado a partir del plásmido pJ603 (ICP0wt-pJ603) o bien se transfectaban con ICPO con una etiqueta de polihistidina C-terminal (ICP0wt-His-pcDNA). Cuarenta y dos horas después de la transfección, las células se recogieron y se analizaron mediante transferencia Western. La transferencia superior se sondó con el anticuerpo policlonal anti-HSV-2 de conejo, que reacciona de forma cruzada con ICP8 de HSV-1 (flecha), mientras que la transferencia inferior usaba las mismas muestras y se sondaba con un anticuerpo monoclonal anti-ICP8 de HSV-1 de ratón (flecha).

La **Figura 14** muestra que el propio vector adenoviral no contribuye al efecto de potenciación de la expresión mediada por ICPO. Las células AV529-19 se transfectaron con los plásmidos indicados, y 24 h más tarde bien se transdujeron con un vector adenoviral (+) o bien no se transdujeron (-). Las células de control se dejaron sin transfectar y más tarde se transdujeron con adenovirus que expresa ICPO (Ad ICPO). Las muestras se recogieron 36 h después de la transducción y se llevó a cabo un análisis por transferencia Western de las células usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-ICP8 de HSV-1.

La **Figura 15** muestra que la transducción de ICPO incrementa el rendimiento de HSV529 en células AV529-19. Las células AV529-19 se transdujeron con un vector adenoviral vacío (vector Ad) o un adenovirus que expresa ICPO (Ad ICPO) y se infectaron con HSV529 bien 1 h, bien 4 h o bien 22 h más tarde. Una muestra de células de control no se infectaba con adenovirus (HSV529 solamente), proporcionando una referencia para el rendimiento de HSV529. Otras muestras se transdujeron con un vector Ad o Ad ICPO 4 h antes de una infección simulada en lugar de infectarse con HSV529. Las células se recogieron 24 h después de la infección o la infección simulada con HSV529 y el lisado se analizó mediante análisis de placas para cuantificar la producción de HSV529.

La **Figura 16** muestra la inducción de la expresión de ICP8 por doxiciclina usando un vector sensible a doxiciclina para expresar ICPO. Las células AV529 se transfectaron con el vector pTetOne (Clontech) o versiones manipuladas del plásmido que expresan ICPO (TetOne-ICP0) o un ICPO al que se adjunta una etiqueta de polihistidina en el extremo carboxilo (TetOne-ICP0 his). Las células transfectadas se incubaron en presencia de 0, 0,1 o 1 µg/ml de doxiciclina, se recogieron, se sometieron a lisis y se analizaron mediante transferencia Western usando un anticuerpo de conejo policlonal anti-HSV-2 que detecta ICP8.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La Tabla 1 proporciona una lista de ciertas secuencias mencionadas en la presente.

Tabla 1: Descripción de las Secuencias		
Descripción	**Secuencias**	**SEQ ID NO**
Cebador directo de la secuencia de UTR 3' de pcDNA3.1 usado para transfectar AV529-19	GCCAGCCATCTGTTGTTTGC	1
Cebador inverso de la secuencia de UTR 3' de pcDNA3.1 usado para transfectar AV529-19	GGGAGTGGCACCTTCCA	2
Sonda de la secuencia de UTR 3' de pcDNA3.1 usada para transfectar AV529-19	CCCCGTGCCTTCCTT	3
Cepa 17 de ICP0 de HSV-1	MEPRPGASTR RPEGRPQREP APDVWVFPCD RDLPDSSDSE AETEVGGRGD ADHHDDDSAS EADSTDTELF ETGLLGPQGV DGGAVSGGSP PREEDPGSCG GAPPREDGGS DEGDVCAVCT DEIAPHLRCD TFPCMHRFCI PCMKTWMQLR NTCPLCNAKL VYLIVGVTPS GSFSTIPIVN DPQTRMEAEE AVRAGTAVDF IWTGNQRFAP RYLTLGGHTV RALSPTHPEP TTDEDDDDLD DADYVPPAPR RTPRAPPRRG AAAPPVTGGA SHAAPQPAAA RTAPPSAPIG PHGSSNTNTT TNSSGGGGSR QSRAAAPRGA SGPSGGVGVG VGVVEAEAGR PRGRTGPLVN RPAPLANNRD PIVISDSPPA SPHRPPAAPM PGSAPRPGPP ASAAASGPAR PRAAVAPCVR APPPGPGPRA PAPGAEPAAR PADARRVPQS HSSLAQAANQ EQSLCRARAT VARGSGGPGV EGGHGPSRGA APSGAAPLPS AASVEQEAAV RPRKRRGSGQ ENPSPQSTRP PLAPAGAKRA ATHPPSDSGP GGRGQGGPGT PLTSSAASAS SSSASSSSAP TPAGAASSAA GAASSSASAS SGGAVGALGG RQEETSLGPR AASGPRGPRK CARKTRHAET SGAVPAGGLT RYLPISGVSS VVALSPYVNK TITGDCLPIL DMETGNIGAY VVLVDQTGNM ATRLRAAVPG WSRRTLLPET AGNHVMPPEY PTAPASEWNS LWMTPVGNML FDQGTLVGAL DFRSLRSRHP WSGEQGASTR DEGKQ	4

Cepa HG52 de ICP0 de HSV-2	MEPRPGTSSR ADPGPERPPR QTPGTQPAAP HAWGMLNDMQ WLASSDSEEE TEVGISDDDL HRDSTSEAGS TDTEMFEAGL MDAATPPARP PAERQGSPTP ADAQGSCGGG PVGEEEAEAG GGGDVCAVCT DEIAPPLRCQ SFPCLHPFCI PCMKTWIPLR NTCPLCNTPV AYLIVGVTAS GSFSTIPIVN DPRTRVEAEA AVRAGTAVDF IWTGNPRTAP RSLSLGGHTV RALSPTPPWP GTDDEDDDLA DVDYVPPAPR RAPRRGGGGA GATRGTSQPA ATRPAPPGAP RSSSSGGAPL RAGVGSGSGG GPAVAAVVPR VASLPPAAGG GRAQARRVGE DAAAAEGRTP PARQPRAAQE PPIVISDSPP PSPRRPAGPG PLSFVSSSSA QVSSGPGGGG LPQSSGRAAR PRAAVAPRVR SPPRAAAAPV VSASADAAGP APPAVPVDAH RAPRSRMTQA QTDTQAQSLG RAGATDARGS GGPGAEGGPG VPRGTNTPGA APHAAEGAAA RPRKRRGSDS GPAASSSASS SAAPRSPLAP QGVGAKRAAP RRAPDSDSGD RGHGPLAPAS AGAAPPSASP SSQAAVAAAS SSSASSSSAS SSSASSSSAS SSSASSSSAS SSSASSSAGG AGGSVASASG AGERRETSLG PRAAAPRGPR KCARKTRHAE GGPEPGARDP APGLTRYLPI AGVSSVVALA PYVNKTVTGD CLPVLDMETG HIGAYVVLVD QTGNVADLLR AAAPAWSRRT LLPEHARNCV RPPDYPTPPA SEWNSLWMTP VGNMLFDQGT LVGALDFHGL RSRHPWSREQ GAPAPAGDAP AGHGE	5
Cepa Jura de virus de herpes bovino 1.1 BICP0	MAPPAAAPEL GSCCICLDAI TGAARALPCL HAFCLACIRR WLEGRPTCPL CKAPVQSLIH SVASDECFEE IPVGGGPGAD GALEPDAAVI WGEDYDAGPI DLTAADGEAS GAGGEAGAAD GSEAGGGAGG AEEAGEARGA GAGRAAGAAG GRAGRGADAA QEFIDRVARG PRLPLLPNTP EHGPGAPYLR RVVEWVEGAL VGSFAVTARE LAAMTDYVMA MLAECGFDDD GLADAMEPLI GEDDAPAFVR SLLFVAARCV TVGPSHLIPQ QSAPPGGRGV VFLDTSDSDS EGSEDDSWSE SEESSSGLST SDLTAIDDTE TEPETDAEVE SRRTRGASGA ARARRPAERQ YVSTRGRQTP AVQPAPRSLA RRPCGRAAAV SAPPSSRSRG GRRDPRLPAA PRAAPAAQAR ACSPEPREEG RGAGLGVAAG ETAGWGAGSE EGRGERRARL LGEAGPPRVQ ARRRRRTELD RAPTPAPAPA PAPAPISTVI DLTANAPARP ADPAPAAAPG PASAGAQIGT PAAAAAVTAA AAAPSVARSS APSPAVTAAA TSTAAAISTR APTPSPAGRA PAADPRRAGA PALAGAARAE VGRNGNPGRE RRPASAMARG DLDPGPESSA QKRRRTEMEV AAWVRESLLG TPRRSSAALA PQPGGRQGPS LAGLLGRCSG GSAWRQ	6

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

El ICPO estimula la expresión de proteínas recombinantes de un modo que es independiente del promotor usado para conducir la expresión de la proteína recombinante. El ICPO se puede introducir en una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante para incrementar la expresión de la proteína recombinante. El ácido nucleico puede ser episómico (codificado en un plásmido) o estar integrado en el genoma de la célula anfitriona. ICPO se puede introducir a través de transfección o transducción, y puede estar asociado con un promotor constitutivo o inducible.

Vacunas Virales con Replicación Defectuosa

Se sabe por los expertos en la técnica que los virus con replicación defectuosa son un medio para desarrollar vacunas, tales como aquellas para enfermedades no propensas al uso de vacunas de virus inactivado o virus atenuado (Véase T. Dudek y D.M. Knipe Virology 344(1):230-9 (2006)). Los virus con replicación defectuosa carecen de una o más funciones esenciales para la replicación del genoma viral o la síntesis y el ensamblaje de partículas virales. Debido al hecho de que los virus con replicación defectuosa no se propagan en células normales, se pueden usar como vacunas para presentar antígenos virales y estimular una respuesta inmunitaria. Así, existe una necesidad de producir altos rendimientos de virus con replicación defectuosa para el uso en la inmunización contra ciertos patógenos.

Se abarcan en esta invención métodos para producir virus con replicación defectuosa, tales como para el uso como vacunas. En una realización, el virus con replicación defectuosa es el candidato clínico HSV529. HSV529 es un virus con replicación defectuosa para la prevención de la infección con HSV-2. En ciertas realizaciones, el virus con replicación defectuosa incluye los conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos incluyen miembros de la familia de virus herpes, incluyendo herpesvirus alfa, virus del herpes simple tipos 1 y 2 y virus de varicela-zóster. Esta invención no se limita a virus específicos, ya que los métodos para generar un virus con replicación defectuosa para cualquier virus particular serán entendidos por los expertos en la técnica. Los métodos para producir virus con replicación defectuosa comprenden proporcionar una célula capaz de producir una proteína recombinante con ICPO, infectar la célula con el virus con replicación defectuosa (bien después o bien al mismo tiempo que el ICPO) y aislar el virus con replicación defectuosa. El método también puede comprender la etapa adicional de purificar el virus aislado.

De forma similar, se abarcan métodos para incrementar el rendimiento de virus con replicación defectuosa, tales como HSV529, que comprenden proporcionar una célula capaz de producir una proteína recombinante con ICPO, infectar la célula con el virus con replicación defectuosa (bien después o bien al mismo tiempo que el ICPO) y aislar el virus con replicación defectuosa, en donde la cantidad de virus aislado es mayor que la cantidad de virus aislado de un sistema de células de control que no reciba ICPO. El método también puede comprender la etapa adicional de purificar el virus aislado.

Líneas Celulares Complementarias para la Producción de Vacunas Virales con Replicación Defectuosa

Las líneas celulares complementarias para la producción de vacunas virales con replicación defectuosa expresan el producto o los productos génicos virales ausentes y permiten la replicación del virus defectuoso (Véase T. Dudek y D.M. Knipe Virology 5 de enero;344(1):230-9 (2006)). Los virus con replicación defectuosa son incapaces de replicarse en células normales, ya que una o más etapas de la replicación viral están bloqueadas. En ciertas realizaciones, la línea celular complementaria puede proporcionar las proteínas virales defectuosas para la propagación al virus con replicación defectuosa en *trans,* de modo que las proteínas virales específicas expresadas por la línea celular complementaria puedan ser usadas por los virus en su proceso de replicación para permitir la propagación del virus. En una realización, AV529-19 es una línea celular Vero (ATCC, CCL-81.2), que se ha transfectado establemente para suministrar las proteínas de HSV-2 UL5 e ICP8 en *trans* que son necesarias para la propagación del virus HSV529 para la generación de esta vacuna contra la infección con HSV-2. Las células AV529-19 están abarcadas en los métodos de la invención para el uso en la complementación del virus con replicación defectuosa HSV529.

Proteínas Recombinantes

Las proteínas recombinantes son proteínas formadas por secuencias de ADN que de otro modo no se encontrarían en organismos biológicos. La proteína recombinante se genera a partir de ADN recombinante, en donde el ADN comprende material genético que se suministra a partir de diferentes fuentes (p. ej., especies) o de secuencias que se han creado que de otro modo no se encontrarían en organismos biológicos. Las proteínas recombinantes se pueden modificar a partir de la secuencia natural o pueden tener diferencias en las modificaciones postraduccionales. Las proteínas recombinantes también pueden permitir la producción de proteína en las células que normalmente no la expresarían o permitir la producción de grandes cantidades de proteínas. Las proteínas recombinantes pueden ser virales o no virales. Las proteínas recombinantes no virales se pueden derivar de fuentes de proteínas de mamífero, planta, insecto u otras no virales. En ciertas realizaciones, ICP8 o pUL5 puede ser la proteína recombinante que se

exprese. En una realización, las ICP8 e pUL5 expresadas son las de HSV-2. En ciertas realizaciones, las ICP8 y pUL5 son las de HSV-1 u otros virus.

Células Que Pueden Expresar Proteínas Recombinantes

Células que pueden expresar proteínas recombinantes incluyen células de mamífero, células de planta, células de insecto, células de levadura, células bacterianas, células aviares y otras. En ciertas realizaciones, la célula puede ser Vero, BHK, CHO, HKB, HEK, NSO, U-2 OS, WI-38, MRC-5, MDCK, FRhL-2, PERC6 y otras. Células capaces de expresar proteínas recombinantes son conocidas por los expertos en la técnica. En una realización, la célula es AV529-19 y la proteína recombinante es ICP8 y pUL5.

Métodos para Introducir ICPO

El ICPO se puede introducir en una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante a través de cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante transfección o transducción. El ácido nucleico de ICPO puede ser ADN o ARN. La transfección es un procedimiento conocido por los expertos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células. La transfección, según se usa en la presente, incluye, pero no se limita a, transfección lipídica, transfección química y métodos físicos de transfección tales como electroporación. En una realización, ICPO se introduce en una célula a través de transfección. En una realización, la transfección es transfección lipídica. En otra realización, la transfección es transfección química. En otras realizaciones adicionales, la transfección es transfección física, tal como, por ejemplo, electroporación. La secuencia de ácido nucleico de ICPO se puede transfectar a una célula eucariótica o procariótica.

En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de ICPO se introduce en la célula que comprende ADN capaz de expresar una proteína recombinante a través de transducción. La transducción se usa en la presente para comprender la introducción de ADN en una célula a través de un vector viral. El término "vector viral" indica cualquier forma de ácido nucleico que se derive de un virus y que se use para la transferencia de material genético a una célula a través de transducción. El término abarca ácidos nucleicos de un vector viral, tales como ADN y ARN, formas encapsidadas de estos ácidos nucleicos y partículas virales en las que se han empaquetado los ácidos nucleicos del vector viral. La práctica de la invención no está limitada por la elección del vector viral, ya que muchas formas de vectores virales son conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el vector viral usado para la transducción puede ser retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado o herpesvirus.

También se divulga la transducción usando vectores no virales, tales como Ormosil (sílice o silicato orgánicamente modificado).

El vector/la construcción de expresión usados en los métodos de transducción y transfección contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión con todos los elementos requeridos para la expresión de la secuencia de ICPO. El vector de expresión particular que se usa para transportar la información genética a la célula puede ser cualquier vector convencional usado por los expertos en la técnica. Se pueden usar diversos medios para introducir una secuencia de ácido nucleico de ICPO en células anfitrionas, incluyendo el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, biolística, liposomas, microinyencción, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula anfitriona. La selección del vector y el método de transfección/transducción está limitada solamente por la necesidad de ser capaz de introducir satisfactoriamente ICPO en la célula anfitriona capaz de expresarlo. La práctica de la invención tampoco está limitada por la elección del promotor en la construcción genética. Los plásmidos pueden conducir la expresión de ICPO usando promotores inducibles o no inducibles. Promotores inducibles pueden incluir los controlados por tetraciclina, doxiciclina, IPTG o otros sistemas. Promotores no inducibles pueden incluir CMV, SV40, CAG u otros.

Después de que el ICPO se introduzca en la célula capaz de expresar una proteína recombinante, la secuencia de ácido nucleico de ICPO se puede incorporar en el genoma de la célula (p. ej., cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse transitoriamente (p. ej., ARNm transfectado).

En otras realizaciones, el ICPO se introduce en una célula capaz de expresar una proteína recombinante al introducir un virus que expresa naturalmente ICPO. En una realización, el ICPO se introduce al introducir virus HSV-1, HSV-2 o BHV-1. Los virus HSV-1, HSV-2 y BHV-1 expresan la proteína de ICPO según se muestra en las Id de Secuencia 4-6, respectivamente. En una realización, la infección de células capaces de expresar una proteína recombinante con un virus que codifica ICPO conduciría a un incremento en los niveles de ICPO. En ciertas realizaciones, los virus HSV-1, HSV-2 o BHV-1 se pueden usar para introducir ICPO. En una realización, se pueden usar virus con replicación defectuosa, tales como HSV529 u otros virus HSV-2 con replicación defectuosa, para expresar ICPO.

En ciertas realizaciones, ICPO ya se puede expresar en la célula en el momento en el que se introduce una proteína recombinante. En otras realizaciones, el ICPO se introduce en una célula que normalmente no lo expresa.

Métodos para Producir Virus con Replicación Defectuosa In Vitro

En una realización, se abarcan métodos para producir, y métodos para incrementar el rendimiento de, un virus con replicación defectuosa in vitro. En estos métodos, se proporciona ICPO a una célula que comprende al menos una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante es una proteína que es deficiente en el virus con replicación defectuosa. Un virus con replicación defectuosa se proporciona a la célula al mismo tiempo que, o después de, el ICPO. El ICPO incrementa la expresión de la proteína recombinante, proporcionando de ese modo la proteína recombinante en *trans* al virus con replicación defectuosa. El virus con replicación defectuosa es capaz así de replicarse, y el sistema celular in vitro produce e incrementa el rendimiento del virus con replicación defectuosa.

a. Producción de HSV529 vacunal para HSV-2

En una realización ejemplar, el virus con replicación defectuosa es HSV529. Según se describe previamente (Véase M.C. Bernard y cols., PLOS One 10(4):e0121518 (2015)), HSV529 carece de dos genes de replicación de ADN viral (UL5 y UL29) y se genera usando la línea celular cooperadora complementaria, AV529-19. AV529-19 es una línea celular Vero (ATCC, CCL-81.2), que se ha transfectado establemente para suministrar las proteínas de HSV-2 UL5 e ICP8 en *trans*. La infección de células AV529-19 por HSV529 se puede realizar siguiendo protocolos publicados (Véase S. T. Mundle y cols., PLoS One 8, e57224 (2013). Brevemente, las células AV529-19 se hacen crecer hasta confluencia y a continuación se inoculan con HSV529 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 en medio de infección (40% de OptiPro en DPBS con 0,5Xcolesterol, sacarosa 50 mM, por ejemplo). La infección puede avanzar a lo largo del tiempo, tal como permitiendo que avance a 34°C durante aproximadamente 72 h.

En una realización, el ICPO se introduce en células AV529-19 antes de la infección con HSV529 a fin de incrementar la expresión de proteínas tales como ICP8 y pUL5. En ciertas realizaciones, ICP8 y pUL5 pueden ser las de HSV-2. En otras realizaciones, ICP8 y pUL5 pueden proceder de diferentes fuentes tales como HSV-1 o BHV-1. En ciertas realizaciones, el ICPO se puede introducir mediante transfección. En ciertas realizaciones, el ICPO se puede introducir a través de transducción. En ciertas realizaciones, las células AV529-19 que expresan ICPO se pueden infectar a continuación con HSV529, conduciendo a un rendimiento incrementado de la vacuna viral. En una realización, un rendimiento incrementado es un rendimiento que es cuantitativamente una cantidad de virus obtenida después del uso de la células AV529-19 que expresan ICPO que es mayor que el rendimiento después del uso de células AV529-19 de control que no expresan ICPO.

En ciertas realizaciones, el ICPO se introduce en diferentes momentos antes de la infección con HSV529. En una realización, el ICPO se introduce 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 horas antes de introducir el virus con replicación defectuosa. En ciertas realizaciones, la MOI de la infección y el tiempo hasta la recogida se optimizan con el protocolo que incluye la introducción de ICPO para asegurar la máxima producción de HSV529. En ciertas realizaciones, los niveles de ICP8 y/o pUL5 se comprueban después de la expresión de ICPO para ayudar a optimizar la cronología de la introducción de ICPO.

Se han descrito diversos medios de purificación viral de HSV529, incluyendo ultracentrifugación y purificación basada en sacarosa, así como purificación basada en cromatografía (Véase S. T. Mundle y cols., PLoS One 8, e57224 (2013). En algunas realizaciones, el virus con replicación defectuosa producido después de que se introduzca ICPO se purifica, tal como mediante ultracentrifugación o purificación con cloruro de cesio. En ciertas realizaciones, se puede realizar en primer lugar una alteración mecánica de células o una elución química de HSV529 desde la superficie de las células AV529-19 infectadas, con evidencia de que la elución química puede permitir una purificación viral de pureza superior. En una realización, la purificación del virus se puede realizar mediante una combinación de elución con sulfato de dextrano seguida por tratamiento con Benzonase, filtración profunda, cromatografía de intercambio aniónico y ultrafiltración/diafiltración. En una realización, el procedimiento de aislamiento del virus sigue a protocolos de GMP y produce una preparación de vacuna que se va a usar para investigación clínica, tal como HSV529. En una realización, el procedimiento de purificación del virus sigue a protocolos de GMP y es una terapia profiláctica para infección con HSV-2.

Métodos para Incrementar la Expresión de Proteínas Recombinantes In Vitro

Se divulgan métodos para incrementar la expresión de proteínas recombinantes in vitro. En un aspecto, la proteína recombinante es un anticuerpo o un antígeno vacunal. En otros aspectos, la proteína recombinante es una hormona, una enzima u otra proteína mamífera. En otros aspectos, la proteína recombinante es un péptido usado con propósitos de obtención de imágenes, diagnósticos o terapéuticos. En otros aspectos, la proteína recombinante es un anticuerpo. Métodos para incrementar la expresión de proteínas recombinantes in vitro comprenden introducir ICPO en una célula capaz de expresar una proteína recombinante y aislar la proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se incrementa en células a las que se ha introducido ICPO en comparación con células a las que no se ha introducido ICPO.

Polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") con virus del herpes simple

El ICPO de la invención puede ser cualquier ICPO procedente de un virus de herpes simple (HSV), incluyendo, pero no limitado a, ICPO procedente de HSV-1, HSV-2 o BHV-1. En una realización, se abarca un ICPO de HSV-1. En otra realización, se abarca ICPO de HSV-2. En otras realizaciones más, se abarca ICPO de BHV-1 bovino.

En ciertas realizaciones, el ICPO previsto es cualquier proteína que tenga un dominio de dedo RING, y que tenga actividad de ubiquitina ligasa.

El dominio de dedo RING es conocido por los expertos en la técnica y es como se describe en Barlow, J. Mol. Biol. (1994) 237, 201-211 y Boutell y Everett, J. Gen. Virol (2013) 94:465-481 en la Figura 1. El experto en la técnica puede determinar mediante análisis de secuencias si cualquier posible ICPO tiene un dominio de dedo RING.

El experto en la técnica también puede determinar si cualquier posible ICPO tiene actividad de ubiquitina ligasa, al, por ejemplo, efectuar un "Ensayo de Actividad de Ubiquitina Ligasa" (véase, p. ej. Boutell y cols (enero 2002) J Virology. 76(2):841-50). Si un posible ICPO exhibe actividad de ubiquitina ligasa E3 in vitro, según se evidencia por la formación de la cadena de ubiquitina, el candidato a ICPO satisface la "Prueba de Actividad de Ubiquitina Ligasa". De forma similar, si un posible ICPO carece de actividad de ubiquitina ligasa in vitro, dicho ICPO no satisface la "Prueba de Actividad de Ubiquitina Ligasa".

"Ensayo de Actividad de Ubiquitina Ligasa": El ICPO, como una ubiquitina ligasa E3, interactúa con las enzimas de conjugación de ubiquitinación tanto E1 como E2 para catalizar la formación de cadenas de poliubiquitinación sobre proteínas de sustrato. Así, un Ensayo de Actividad de Ubiquitina Ligasa determina si una posible proteína puede catalizar la formación de cadenas de poliubiquitinación sobre proteínas de sustrato en presencia de E1 y E2. Un ensayo de actividad de las muestras se describe posteriormente. Véanse, además, métodos detallados en Boutell y Davido, Methods (2015) S1046-2023(15):00150-4, y Everett y cols. (Abr 2010) J Virol 84(7):3476-87.

Componentes de la Mezcla de Reacción:

a. Enzima activadora de ubiquitina E1, que se puede purificar de extractos celulares infectados con baculovirus o, alternativamente, la enzima se puede expresar con una etiqueta de polihistidina N-terminal mediante un baculovirus recombinante seguido por purificación a partir de extractos mediante cromatografía de afinidad con níquel. Por ejemplo, la enzima E1 se puede purificar a partir de extractos de células HeLa S100 usando cromatografía de afinidad con ubiquitina, según se describe en *Boutell 2002,* o enzima E1 etiquetada con polihistidina se puede expresar y purificar mediante cromatografía de afinidad con níquel, según se describe en *Everett 2010.*

b. Las enzimas de conjugación de ubiquitinación E2 se pueden expresar en Escherichia coli recombinante como una polihistidina o proteínas de fusión de GST y purificarse mediante cromatografía de afinidad con níquel o glutationa. Se han descrito en la bibliografía *(Boutell 2015; Everett 2010)* ejemplos de UBE2D1 etiquetada con polihistidina (UbcH5a) que se pueden usar en la Prueba de Actividad de Ubiquitina Ligasa.

c. Ubiquitina silvestre (tal como de Sigma Aldrich; U6253)

Prueba Ejemplar de Actividad de Ubiquitina Ligasa: Un ejemplo de ensayo de ubiquitinación es un volumen de reacción final de 10 µl en Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM y ATP 5 mM (Sigma-Aldrich; A7699) complementado con 10 ng de E1 y 40 ng de E2 (UBE2D1). Se añaden a esta mezcla 90 ng de posible proteína de ICPO purificada *(Boutell 2015;* con una reacción similar descrita en *Everett 2010*). La reacción se activa mediante la adición de 1 µg de ubiquitina silvestre (Sigma-Aldrich; U6253) o metilada (BostonBiochem; U-501) por reacción y se incuba a 37°C durante un intervalo de tiempo, por ejemplo a lo largo de 0-90 min. Los ensayos se pueden terminar mediante la adición de 3X tampón de carga de SDS-PAGE complementado con urea 8 M y ditiotreitol (DTT) 100 mM, seguido por desnaturalización térmica a 95°C durante 10 min y a continuación SDS-PAGE (12% Bis-Tris NuPAGE; Life Technologies). Después de la transferencia a membranas de nitrocelulosa, las membranas se pueden bloquear en PBS con suero de ternero fetal al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las transferencias se pueden incubar con anticuerpo antiubiquitina (p. ej., P4D1 [1/1000]), seguido por incubación con anticuerpos secundarios apropiados, basándose en el sistema de análisis de cuantificación preferido. La cuantificación de la ubiquitinación se puede realizar usando estas membranas, tal como mediante obtención de imágenes del IR cercano usando un sistema de obtención de imágenes del infrarrojo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, *Boutell 2015)* a una resolución de 84 mm o mediante un reactivo de quimioluminiscencia potenciado (NEN, *Boutell 2002)* y exposición a película. La producción de cadenas de poliubiquitina se puede medir usando la cuantificación de la ubiquitina marcada. Por ejemplo, se pueden medir los niveles de ubiquitina después de una reacción de 1 h (*Everett 2010*) o se puede medir un transcurso con el tiempo de los niveles de ubiquitina a lo largo de un período de 90 minutos (*Boutell 2015*).

En una realización, el ICPO es idéntico a los aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. El ICPO puede ser 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71 o 70% idéntico a cualquiera de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6, con la condición de que el ICPO mantenga la actividad de ICPO en el Ensayo de Actividad de Ubiquitina Ligasa.

Líneas Celulares Estables que Expresan ICPO para Incrementar la Expresión de Proteínas Recombinantes

Se divulgan métodos para generar líneas estables que expresan ICPO. En ciertos aspectos, un plásmido que contiene ICPO se transfecta a una línea celular, tal como HEK, CHO, HeLa u otras, y se genera una línea celular estable que expresa ICPO usando un método de selección apropiado, tal como, por ejemplo, resistencia a antibióticos. Clones de la línea transfectada establemente de ICPO se congelan y a continuación la línea se mantiene bajo selección con respecto a la expresión de ICPO estable. En un aspecto, se abarca un método para incrementar la producción de una proteína recombinante en la célula transfectada establemente, que comprende mantener la línea celular transfectada establemente en cultivo, e introducir un ácido nucleico que comprende una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se expresa a niveles superiores que en células que no comprenden ICPO. En otro aspecto, se usa una línea celular que expresa establemente ICPO para cribar con respecto a proteínas recombinantes cuya producción se puede incrementar mediante coexpresión con ICPO.

Líneas Celulares Complementarias que Expresan Establemente ICPO para Incrementar la Expresión de Virus con replicación defectuosa

Se divulgan métodos para generar una línea celular complementaria transfectada establemente con ICPO para la producción de una vacuna viral con replicación defectuosa. En un aspecto, la línea celular complementaria transfectada establemente con ICPO es la línea celular AV529-19, y la vacuna viral con replicación defectuosa es HSV529. En ciertos aspectos, la transfección estable de ICPO en el sistema celular complementario incrementa el rendimiento del virus con replicación defectuosa después de la infección de las células en comparación con el sistema celular de control que no expresa ICPO.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. La infección con HSV529 de la línea celular AV529-19 induce la transcripción y la expresión de ICP8.

El HSV529 vacunal es una cepa vacunal con replicación defectuosa de virus del herpes simple 2 (HSV-2) que carece de dos genes, UL5 y UL29. HSV529 y su línea celular de complementación AV529-19 se han descrito previamente. Véase S. T. Mundle y cols., PLoS One 8, e57224 (2013); S. Delagrave y cols., PLoS One 7, e46714 (2012).

Los genes UL5 y UL29 son necesarios para la replicación de HSV529, y su eliminación da como resultado un virus que puede aportar ADN genómico viral a células humanas y provocar una respuesta inmunitaria contra las proteínas virales, pero no se puede replicar. La incapacidad para replicarse da como resultado una vacuna que es segura para el receptor de la vacuna. HSV529 no se puede replicar en células de complementación parcial, es decir, HSV529 no crece si se expresa uno solo de los genes UL5 y UL29 (**Fig. 1**). HSV529 no era capaz de crecer ni en células V827 (que expresan solamente UL29 y no UL5) ni en células L2-5 (que expresan solamente UL5 y no UL29); sin embargo, se observaba crecimiento en células AV529-19 que expresan ambos genes de complementación.

La línea celular de complementación AV529-19 es una línea celular Vero en la que estaban establemente integrados ortólogos de HSV-1 de los dos genes eliminados, UL5 y UL29. Las células AV529-19 proporcionan HSV529 con las proteínas ausentes pUL5 (helicasa codificada por UL5, donde 'p' indica el producto polipeptídico del gen UL5) y ICP8, respectivamente, en *trans.* Véase A. Azizi y cols., J Biotechnol 168, 382 (Dic. 2013). Debido a que un promotor de CMV conduce la expresión de UL5 y UL29, se esperaba que ambos genes se expresaran constitutivamente en células AV529-19 y que, tras la infección con HSV529, el genoma de la vacuna viral se replicara y nuevos viriones de descendencia que comprendían el genoma de HSV529 fueran producidos por las células AV529-19 de complementación.

Sin embargo, sorprendentemente, se observó que la complementación de HSV529 en células AV529-19 da hasta 12 veces menos virus por célula que cuando las células AV529-19 se infectan con HSV-2 silvestre (**Fig. 2**). Como parte de un esfuerzo por comprender la base de la complementación imperfecta, se estudió la expresión de ICP8. Estaban disponibles anticuerpos apropiados para la detección por transferencia Western de ICP8. La expresión de ICP8 era indetectable en células AV529-19 no infectadas, a pesar de estar regulada por un promotor constitutivo, y a pesar de la clara capacidad de las células para complementar HSV529 **(Fig. 3).** La inmunodetección con un anticuerpo anti-HSV-1-ICP8 de ratón (Abcam, ab20194) indicaba que la infección con HSV529 en células AV529-19 conduce a la expresión de ICP8 fácilmente detectable a las 41 horas después de la infección (panel superior de la **Fig. 3**). No se observaba expresión de ICP8 en células infectadas simuladamente (NC). El producto génico constitutivo GAPDH no

se veía afectado por la infección con HSV529 (anti-GAPDH de ratón; Santa Cruz, sc32233) según se muestra en el panel medio de la Figura 3. La expresión de proteínas virales solo se observaba en células HSV529 infectadas usando la inmunodetección con anticuerpo anti-HSV-2 de conejo (Abcam, ab9534) según se muestra en la transferencia inferior de la Figura 3.

Los presentes inventores observaron que el ICP8 se podía detectar solamente después de que las células fueran infectadas con HSV529, pero no antes **(Fig. 3** y **Fig. 4).**

Ejemplo 2. La infección con HSV529 de la línea celular AV529-19 incrementa la expresión de ICP8 codificado por un sistema de replicón.

Usando un sistema de replicón de encefalitis equina venezolana (VEE), se probó la expresión de un ICP8 codificado por replicón en células Vero después de la infección con HSV529 **(Fig. 4).** El gen UL29 se clonó en el plásmido p5'VEErep/GFP/Pac, descrito en Petrakova y cols., J Virol 79, 7597 (Jun 2005), reemplazando el ORF de GFP por el ORF de UL29. En los replicones de VEE, que es un episoma de ARN, la expresión de UL29 o UL5 es conducida por el promotor de VEE subgenómico codificado por el plásmido p5'VEErep/GFP/Pac El ARN del replicón se produjo mediante la transcripción in vitro del plásmido conducida por un promotor de SP6. El ARN del replicón de UL29 resultante se transfectó en las células Vero mediante electroporación usando un BioRad Gene Pulser II (320 V, 950 µF) y las células transfectadas se pusieron bajo selección usando puromicina (10 µg/ml) para asegurar la retención del replicón. Un replicón similar que codificaba UL5 se realizó en paralelo como un control. Se tomaron muestras de células 0, 4, 8 o 24 horas después de la infección con HSV529 y se probaron con respecto a la expresión de ICP8 mediante transferencia Western (Fig. 4). El suero de conejo anti-ICP8 de HSV 1 3-83 se usó como un anticuerpo primario y un anticuerpo para conejo policlonal caprino marcado con peroxidasa de rábano picante como uno secundario. El sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico se uso para la detección.

El ICP8 no se detectaba en los puntos temporales más tempranos (**Fig. 4:** puntos temporales de 0 h y 4 h). Se observaban bandas del peso molecular esperado (> 100 kD) a las 24 h para la línea celular del replicón de UL29, y tanto a las 8 h como a las 24 h en las células AV529-19. Según se esperaba, las células UL5 no producen ICP8 en ningún punto temporal incluso con infección por HSV529. Inesperadamente, la expresión de ICP8 se inducía cuando se expresaba a partir de un replicón. La expresión incrementada de ICP8 parece estar mediada por HSV529 incluso cuando ICP8 se expresa a partir de una molécula de ARN (el replicón). Por lo tanto, la capacidad de HSV529 para incrementar la expresión de un gen de interés, en este caso ICP8, no depende del gen que sea codificado por ADN.

Ejemplo 3. La infección con HSV529 de la línea celular AV529-19 incrementa la cantidad de transcrito de UL29 en las células.

Para un entendimiento adicional por parte de los presentes inventores del incremento en la expresión de ICP8 en células infectadas con HSV529 que expresan UL29 recombinante, los presentes inventores probaron si se podía detectar un incremento correspondiente en el ARNm de UL29 después de la infección. Se puso en práctica una reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) que elige como diana la región no traducida (UTR) 3' del ARNm de UL29 recombinante usando el cebador directo SEQ ID1; el cebador inverso SEQ ID2; y la sonda SEQ ID3; según se muestra en la **Tabla 2** . La secuencia usada para generar estos cebadores está asociada exclusivamente con la expresión del gen de UL29 recombinante. El gen UL5, por ejemplo, se expresa usando un vector diferente que tiene una UTR 3' diferente y, por lo tanto, no se elegirá como diana. AV529-19 o células Vero no modificadas se infectaron bien con HSV-2 (cepa 186 syn+1) o bien con HSV529 (**Fig. 5**). Según se esperaba, las células Vero no modificadas tenían cantidades indetectables de ARNm de UL29 recombinante en todos los puntos temporales, mientras que AV529-19 tenía cantidades detectables pero muy bajas del ARNm de UL29 recombinante a las 0 y 6 h después de la infección. La concentración de ARNm se incrementaba en 22 y 26 veces después de la infección para las células infectadas con HSV529 y HSV-2, respectivamente. La inducción de ARNm de UL29 alcanzaba un máximo a las 24 h después de la infección en células infectadas con HSV-2 y a las 48 h después de la infección en células infectadas con HSV529. Estos resultados indican que la concentración intracelular del transcrito de UL29 se incrementa mediante la infección de las células bien con HSV-2 silvestre o bien con HSV529. La cinética de la expresión incrementada de ARNm de UL29 es consecuente con el incremento observado en los niveles de proteína de ICP8, el producto génico de UL29.

Tabla 2: Descripción Recombinante UL29 de los Cebadores ARNm Usado para la Cuantificación por TaqMan de					
Diana	**Descripción**	**Cebador Directo**	**Cebador Inverso**	**Sonda**	**Longitud del Amplicón**
UL29	Secuencia de UTR 3' de pcDNA3.1 usado para transfectar AV529-19	GCCAG CCATC TGTTG TTTGC (SEQ ID NO:1)	GGGAG TGGCA CCTTCC A (SEQ ID NO:2)	CCCCG TGCCT TCCTT (SEQ ID NO:3)	62 pb

Ejemplo 4. ICPO incrementa la expresión de ICP8 en la línea celular de complementación AV529-19.

Los presentes inventores establecieron como hipótesis que una proteína temprana inmediata (IE) de HSV-2 podría ser responsable de la inducción de la expresión de UL29. Por lo tanto, se probó un grupo de vectores adenovirales que expresan las 5 proteínas IE de HSV-2: ICPO, ICP4, ICP22 (fragmento C-terminal), ICP27 (combinación de fragmentos N-terminal y C-terminal) e ICP47. Las células AV529-19 se transdujeron a una MOI de 20 con estos diversos vectores y se recogieron 24 h después para transferencia Western usando un anticuerpo anti-ICP8 (Fig. 6). Una sola banda que mostraba la expresión de ICP8 se observa solamente en las células transducidas con el vector que expresaba ICPO. Ninguno de los otros vectores adenovirales que expresan otras proteínas IE de HSV-s mostraba ningún efecto sobre la expresión de ICP8. Tampoco el propio vector adenoviral 'vacío' provoca la expresión de ICP8. Este resultado sugiere con fuerza que la inducción de ICP8 observada en los Ejemplos 1-3 se debe a la proteína ICPO expresada tanto por HSV-2 como por HSV529 después de la infección de AV529-19.

En un experimento de control, la transducción del adenovirus que expresa ICPO daba como resultado la expresión de ICP8 en células AV529-19, pero no en células HEK293A **(Fig. 7).** Las células HEK293A, una línea celular de complementación usada para producir vectores adenovirales, y la línea celular AV529-19 se infectaron con un vector adenoviral que expresa ICPO. El análisis por transferencia Western a las 24 h después de la infección indicaba que ICPO no es detectable en células AV529-19, presumiblemente debido a que su nivel de expresión estaba por debajo del límite de detección del anticuerpo policlonal. La inmunotinción de la banda de ICP8 en las células AV529-19 parecía haberse reforzado, lo que es coherente con la especificidad del anticuerpo policlonal, mientras que no se observaba señal en células HEK293A. Estos resultados indican que la expresión de ICPO no da como resultado la expresión de ICP8 en células que no sean capaces de expresar ICP8, tales como células HEK293A.

Ejemplo 5. ICPO incrementa la expresión de proteínas recombinantes codificadas episómicamente, así como de proteínas de origen no viral.

Se probó si ICPO podía potenciar la expresión de proteínas recombinantes distintas de ICP8, como también si esta potenciación se podía observar usando genes recombinantes trasportados sobre moléculas de ADN episómicas en lugar del ADN cromosómico del anfitrión. Las células se cotransdujeron con vectores adenovirales (MOI de 20) que expresan diversas proteínas y, 24 horas más tarde, bien con un vector adenoviral vacío o bien con un vector adenoviral que expresa ICPO (MOI de 20). En este experimento, las proteínas recombinantes de interés eran proteínas de HSV-2 gD313, VP16 y luciferasa de luciérnaga. Aunque se usaron células AV529-19, se podían usar en su lugar otras líneas celulares (como se mostrara en Ejemplos posteriores). Veinticuatro horas después de la cotransducción, las células infectadas se analizaron en transferencias Western usando anticuerpos disponibles comercialmente **(Fig. 8A** y **Fig. 8B).** Notablemente, en cada caso, la expresión de proteínas cotransducidas se incrementaba mediante ICPO pero no mediante el vector adenoviral vacío (resultados para gD mostrados en la Figura 8A y resultados para VP16 y luciferasa de luciérnaga mostrados en la Figura 8B). Estos resultados muestran que no solo se incrementa la expresión de proteínas de HSV-2 (ICP8, gD y VP16) mediante ICPO, sino que también lo hace la expresión de una enzima eucariótica (luciferasa de luciérnaga). Por otra parte, el ICPO incrementa la expresión de proteínas codificadas episómicamente, además de los incrementos de ICP8 codificado cromosómicamente mostrados en los Ejemplos previos.

Para investigar si la expresión inducida de proteínas recombinantes por ICPO era específica o se debía a un efecto global sobre la expresión de proteínas en la célula, se analizó la expresión del gen constitutivo GAPDH mediante transferencia Western de células cotransducidas con una proteína recombinante y bien con ICPO o bien con un vector adenoviral de control negativo **(Fig. 9A).** No se detectaron cambios obvios en la expresión de esta proteína como resultado de la expresión de ICPO. Los presentes inventores también usaron SDS-PAGE y análisis por tinción con

Simple-Blue de un subgrupo de las mismas muestras para una visión más amplia de la expresión de proteínas en estas células **(Fig. 9B).** Células no traducidas de control negativo (NC), células de vector vacío (AdV) y células cotransducidas con gD o VP16 muestran un patrón de bandas similar. Por lo tanto, el efecto de ICPO sobre la expresión de proteínas parece ser específico de las proteínas recombinantes o de un pequeño subgrupo de proteínas celulares que incluye las proteínas recombinantes.

Ejemplo 6. ICPO incrementa la expresión de proteínas recombinantes codificadas por diferentes plásmidos y usando diferentes promotores.

En los Ejemplos anteriores, las proteínas recombinantes eran codificada por un transgén conducido por promotor de CMV integrado establemente (ICP8) o por un vector adenoviral que también conduce la expresión usando el promotor de CMV. Por lo tanto, los presentes inventores probaron la capacidad de ICPO para incrementar la expresión de una proteína recombinante codificada por dos plásmidos diferentes que conducen la expresión del transgén bien con el promotor de CMV o bien con el promotor de SV40. La transducción de ICPO incrementaba la expresión de luciferasa de luciérnaga en 2,8 veces y 5,1 veces para plásmidos con los promotores de SV40 y CMV, respectivamente, en comparación con la transducción del vector de control **(Fig. 10).** Por lo tanto, la potenciación mediada por ICPO de la expresión del gen recombinante transportado en plásmido es independiente del promotor usado.

Los datos mostrados en la Fig. 10 se obtuvieron usando células AV529-19. Según se indica anteriormente, estas son células Vero manipuladas con copias cromosómicamente integradas de los genes UL29 y UL5. Para mostrar que UL29 y UL5 no son necesarios para el efecto observado del ICPO, los presentes inventores reprodujeron parte del experimento usando células Vero (Fig. 11). Como se observa en la Fig. 11, la transducción de ICPO producía un incremento de 9 veces en la expresión de luciferasa en células Vero, confirmando que el efecto potenciador de ICPO se puede conseguir sin la expresión de UL29 o UL5. La diferencia entre el vector adenoviral de control y el vector que expresa ICPO era extremadamente significativa estadísticamente mediante análisis de ANOVA ($P < 0,0001$).

Para confirmar que el polipéptido de ICPO es responsable del efecto de expresión potenciado, se determinó la capacidad de dos mutantes de ICPO diferentes para inducir la expresión de ICP8. Se aportaron ICPO silvestre y mutante a células AV529-19 a través de un vector adenoviral. La transferencia Western con un anticuerpo anti-HSV-2 policlonal de conejo que reacciona de forma cruzada con ICP8 de HSV-1 muestra claramente la expresión de ICP8 en células tratadas con ICPO silvestre, pero no en células tratadas con una versión de ICPO en la que se eliminaba el 1/3 N-terminal (construcción 2/3 ICPO C-H), u otra versión en la que se sustituye aproximadamente 5% de aminoácidos en la proteína (ICPO 5% mut-H) **(Fig. 12).** Por lo tanto, la secuencia polipeptídica del ICPO se debe conservar en gran parte para incrementar la expresión de ICP8 en células AV529-18.

Ejemplo 7. ICP0 incrementa la expresión de proteína recombinante cuando se proporciona a células a través de un plásmido.

En los Ejemplos anteriores, el ICPO se expresó usando bien HSV-2, bien HSV529 o bien un vector adenoviral. Por lo tanto, los presentes inventores probaron la capacidad de ICPO expresado a partir de un plásmido para incrementar la expresión de proteína. Células AV529-19 se transfectaron transitoriamente con un plásmido vacío o con ICPO expresado a partir de un promotor de CMV en dos plásmidos diferentes (pcDNA3.1 y pJ603), y a continuación se midieron los niveles de expresión de ICP8 mediante transferencia Western. La expresión de ICP8 era claramente inducida por transfección de ICPO por cualquier plásmido en células recogidas 42 h después de la transfección **(Fig. 13).** La transferencia superior de la Figura 13 se sondó con el anticuerpo policlonal anti-HSV-2 de conejo que reacciona de forma cruzada con ICP8 de HSV-1 (flecha roja). La inducción de ICP8 se detectaba claramente en el carril de AdICP0 así como en células transfectadas con ICPO expresado a partir de un plásmido. Para confirmar la identidad de ICP8 en las células, se llevó a cabo otra transferencia Western con las mismas muestras y se sondó con un anticuerpo monoclonal anti-ICP8 de HSV-1 de ratón y mostraba resultados similares (transferencia inferior de la Fig. 13). El ICPO expresado a partir de pcDNA3.1 tiene una etiqueta de polihistidina C-terminal, y esta etiqueta no impediría la inducción de ICP8. Las muestras de control, bien sin transfección (NC) o bien en las que se transfectaba un vector vacío (pcDNA), no mostraban expresión de ICP8.

Aunque la transfección de plásmidos que contenían ADN de ICPO eran claramente capaz de inducir ICP8, esta inducción era más débil que la que estaba mediada por transducción con un vector adenoviral que expresaba ICPO (Fig. 13). Los presentes inventores establecieron como hipótesis que la eficacia inferior de la transfección transitoria en comparación con la transducción mediada por adenovirus puede explicar esta observación. Para descartar la posibilidad de que componentes del adenovirus hayan incrementado la eficacia de la potenciación de ICPO, los presentes inventores transfectaron células AV529-19 con plásmidos de ICPO y 24 horas más tarde transdujeron las células transfectadas con vector adenoviral 'vacío'. A continuación, las células se ensayaron 36 h más tarde con respecto a la expresión de proteína de ICP8. La transducción con vector adenoviral después de la transfección del plásmido no potenciaba la expresión de proteína de ICP8 **(Fig. 14).** Estos resultados sugieren que una eficacia de transfección de plásmido de ICPO inferior limitaba la potenciación en la expresión de proteína para células transfectadas con plásmido en comparación con células transducidas con adenovirus.

Ejemplo 8. ICPO incrementa el rendimiento de HSV529.

Según se analiza en los Ejemplos 1 y 3, HSV-2 se replicaba más eficazmente en células AV529-19 que HSV529 (Fig. 2). Los datos también indicaban que la infección con HSV529 provoca un incremento más lento y ligeramente inferior en la expresión del transcrito de UL29 recombinante en comparación con HSV-2 (Fig. 5). Dada esta correlación entre la expresión de ICP8 y los rendimientos virales, los presentes inventores establecieron como hipótesis que las células AV529-19 que expresan ICPO antes de la infección con HSV529 inducirían la expresión de ICP8 y por lo tanto complementarían al virus más eficazmente y producirían rendimientos superiores cuando estuvieran infectadas con HSV529. La transducción de AV529-19 con vector adenoviral que expresa ICPO antes de la infección con HSV529 mostraba un incremento claro en los rendimientos de HSV529 en comparación con la transducción con un vector adenoviral vacío **(Fig. 15).** La transducción con ICPO se llevó a cabo a las 1 h, 4 h o 22 h antes de la infección con HSV529 y, en comparación con los rendimientos obtenidos con vector vacío, daba como resultado incrementos de 2,8, 4,3 y 2,2 veces, respectivamente. En comparación con una referencia, una muestra no transducida de células infectadas con HSV529 (HSV529 solamente), la mayor potenciación en el rendimiento (5,5 veces) se conseguía mediante infección de HSV529 atlh después de la transducción de adenovirus que expresa ICPO. Así, la expresión en el momento apropiado de ICPO recombinante puede desencadenar una producción incrementada del HSV529 vacunal en células AV529-19.

Ejemplo 9. Expresión inducible de ICP8

Se probó si es posible inducir la expresión de ICP8 en células AV529 usando un compuesto de molécula pequeña. El vector TetOne se usó para construir un plásmido que expresa ICPO bajo el control de un promotor sensible a doxiciclina (TetOne-ICP0). Este plásmido se transfectó en la línea celular AV529. El incremento en la concentración de doxiciclina en el medio de cultivo de células transfectadas inducía la expresión de la proteína ICP8, que es codificada por el gen UL29 insertado establemente en esta línea **(Fig. 16).** Se observaron resultados similares para una versión manipulada del plásmido a la que se adjuntaba una etiqueta de polihistidina en el extremo carboxilo (TetOne-ICP0 his). Células AV529 de control transfectadas con un vector TetOne vacío no mostraban un incremento en la expresión de ICP8. Por lo tanto, estos datos muestran que la expresión de ICP8 se puede inducir, mediante un mecanismo de expresión inducida de ICPO, usando un fármaco de molécula pequeña.

Se considera que la memoria descriptiva escrita precedente es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica las realizaciones. La descripción y los Ejemplos precedentes detallan ciertas realizaciones y describen el mejor modo contemplado por los inventores.

Según se usa en la presente, el término aproximadamente se refiere a un valor numérico, incluyendo, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, estén o no indicados explícitamente. El término aproximadamente se refiere generalmente a un intervalo de valores numéricos (p. ej., +/-5-10% del intervalo citado) que un experto normal en la técnica consideraría equivalente al valor citado (p. ej., que tiene la misma función o resultado). Cuando términos tales como al menos y aproximadamente preceden a una lista de valores o intervalos numéricos, los términos modifican todos los valores o intervalos proporcionados en la lista. En algunos casos, el término aproximadamente puede incluir valores numéricos que se redondean a la cifra significativa más próxima.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sanofi Pasteur Biologies, LLC

<120> SISTEMA DE EXPRESIÓN POTENCIADA MEDIADA POR ICPO

<130> 1121-5-PCT

<150> US 62/161.194

<151> 2015-05-13

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo de la secuencia de 3'UTR de pcDNA3.1 usado para transfectar AV529-19

<400> 1

gccagccatc tgttgtttgc 20

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso de la secuencia de 3'UTR de pcDNA3.1 usado para transfectar AV529-19

<400> 2

gggagtggca ccttcca 17

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda de la secuencia de 3'UTR de pcDNA3.1 usada para transfectar AV529-19

<400> 3

ccccgtgcct tcctt 15

<210> 4

<211> 775

<212> PRT

<213> Cepa 17 de herpesvirus humano 1

<400> 4

```
Met Glu Pro Arg Pro Gly Ala Ser Thr Arg Arg Pro Glu Gly Arg Pro
1               5                   10                  15
```

```
Gln Arg Glu Pro Ala Pro Asp Val Trp Val Phe Pro Cys Asp Arg Asp
            20                  25                  30

Leu Pro Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ala Glu Thr Glu Val Gly Gly Arg
        35                  40                  45

Gly Asp Ala Asp His His Asp Asp Asp Ser Ala Ser Glu Ala Asp Ser
    50                  55                  60

Thr Asp Thr Glu Leu Phe Glu Thr Gly Leu Leu Gly Pro Gln Gly Val
65                  70                  75                  80

Asp Gly Gly Ala Val Ser Gly Gly Ser Pro Pro Arg Glu Glu Asp Pro
                85                  90                  95

Gly Ser Cys Gly Gly Ala Pro Pro Arg Glu Asp Gly Gly Ser Asp Glu
            100                 105                 110

Gly Asp Val Cys Ala Val Cys Thr Asp Glu Ile Ala Pro His Leu Arg
        115                 120                 125

Cys Asp Thr Phe Pro Cys Met His Arg Phe Cys Ile Pro Cys Met Lys
    130                 135                 140

Thr Trp Met Gln Leu Arg Asn Thr Cys Pro Leu Cys Asn Ala Lys Leu
145                 150                 155                 160

Val Tyr Leu Ile Val Gly Val Thr Pro Ser Gly Ser Phe Ser Thr Ile
                165                 170                 175

Pro Ile Val Asn Asp Pro Gln Thr Arg Met Glu Ala Glu Glu Ala Val
            180                 185                 190

Arg Ala Gly Thr Ala Val Asp Phe Ile Trp Thr Gly Asn Gln Arg Phe
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Tyr Leu Thr Leu Gly Gly His Thr Val Arg Ala Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Thr His Pro Glu Pro Thr Thr Asp Glu Asp Asp Asp Asp Leu Asp
225                 230                 235                 240

Asp Ala Asp Tyr Val Pro Pro Ala Pro Arg Arg Thr Pro Arg Ala Pro
                245                 250                 255

Pro Arg Arg Gly Ala Ala Ala Pro Pro Val Thr Gly Gly Ala Ser His
            260                 265                 270
```

```
Ala Ala Pro Gln Pro Ala Ala Ala Arg Thr Ala Pro Pro Ser Ala Pro
        275                 280                 285

Ile Gly Pro His Gly Ser Ser Asn Thr Asn Thr Thr Thr Asn Ser Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gln Ser Arg Ala Ala Ala Pro Arg Gly Ala
305                 310                 315                 320

Ser Gly Pro Ser Gly Gly Val Gly Val Gly Val Gly Val Val Glu Ala
                325                 330                 335

Glu Ala Gly Arg Pro Arg Gly Arg Thr Gly Pro Leu Val Asn Arg Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Leu Ala Asn Asn Arg Asp Pro Ile Val Ile Ser Asp Ser Pro
        355                 360                 365

Pro Ala Ser Pro His Arg Pro Pro Ala Ala Pro Met Pro Gly Ser Ala
    370                 375                 380

Pro Arg Pro Gly Pro Pro Ala Ser Ala Ala Ala Ser Gly Pro Ala Arg
385                 390                 395                 400

Pro Arg Ala Ala Val Ala Pro Cys Val Arg Ala Pro Pro Pro Gly Pro
                405                 410                 415

Gly Pro Arg Ala Pro Ala Pro Gly Ala Glu Pro Ala Ala Arg Pro Ala
            420                 425                 430

Asp Ala Arg Arg Val Pro Gln Ser His Ser Ser Leu Ala Gln Ala Ala
        435                 440                 445

Asn Gln Glu Gln Ser Leu Cys Arg Ala Arg Ala Thr Val Ala Arg Gly
    450                 455                 460

Ser Gly Gly Pro Gly Val Glu Gly Gly His Gly Pro Ser Arg Gly Ala
465                 470                 475                 480

Ala Pro Ser Gly Ala Ala Pro Leu Pro Ser Ala Ala Ser Val Glu Gln
                485                 490                 495

Glu Ala Ala Val Arg Pro Arg Lys Arg Arg Gly Ser Gly Gln Glu Asn
            500                 505                 510

Pro Ser Pro Gln Ser Thr Arg Pro Pro Leu Ala Pro Ala Gly Ala Lys
```

```
        515                 520                 525

Arg Ala Ala Thr His Pro Pro Ser Asp Ser Gly Pro Gly Gly Arg Gly
    530                 535                 540

Gln Gly Gly Pro Gly Thr Pro Leu Thr Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ser
545                 550                 555                 560

Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Thr Pro Ala Gly Ala Ala
                565                 570                 575

Ser Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Gly
            580                 585                 590

Gly Ala Val Gly Ala Leu Gly Gly Arg Gln Glu Glu Thr Ser Leu Gly
        595                 600                 605

Pro Arg Ala Ala Ser Gly Pro Arg Gly Pro Arg Lys Cys Ala Arg Lys
    610                 615                 620

Thr Arg His Ala Glu Thr Ser Gly Ala Val Pro Ala Gly Gly Leu Thr
625                 630                 635                 640

Arg Tyr Leu Pro Ile Ser Gly Val Ser Ser Val Val Ala Leu Ser Pro
                645                 650                 655

Tyr Val Asn Lys Thr Ile Thr Gly Asp Cys Leu Pro Ile Leu Asp Met
            660                 665                 670

Glu Thr Gly Asn Ile Gly Ala Tyr Val Val Leu Val Asp Gln Thr Gly
        675                 680                 685

Asn Met Ala Thr Arg Leu Arg Ala Ala Val Pro Gly Trp Ser Arg Arg
    690                 695                 700

Thr Leu Leu Pro Glu Thr Ala Gly Asn His Val Met Pro Pro Glu Tyr
705                 710                 715                 720

Pro Thr Ala Pro Ala Ser Glu Trp Asn Ser Leu Trp Met Thr Pro Val
                725                 730                 735

Gly Asn Met Leu Phe Asp Gln Gly Thr Leu Val Gly Ala Leu Asp Phe
            740                 745                 750

Arg Ser Leu Arg Ser Arg His Pro Trp Ser Gly Glu Gln Gly Ala Ser
        755                 760                 765

Thr Arg Asp Glu Gly Lys Gln
    770                 775
```

<210> 5

<211> 825

<212> PRT

<213> Cepa HG52 de herpesvirus humano 2

<400> 5

```
Met Glu Pro Arg Pro Gly Thr Ser Ser Arg Ala Asp Pro Gly Pro Glu
1               5                  10                  15

Arg Pro Pro Arg Gln Thr Pro Gly Thr Gln Pro Ala Ala Pro His Ala
            20                  25                  30

Trp Gly Met Leu Asn Asp Met Gln Trp Leu Ala Ser Ser Asp Ser Glu
        35                  40                  45

Glu Glu Thr Glu Val Gly Ile Ser Asp Asp Asp Leu His Arg Asp Ser
    50                  55                  60

Thr Ser Glu Ala Gly Ser Thr Asp Thr Glu Met Phe Glu Ala Gly Leu
65                  70                  75                  80

Met Asp Ala Ala Thr Pro Pro Ala Arg Pro Pro Ala Glu Arg Gln Gly
                85                  90                  95

Ser Pro Thr Pro Ala Asp Ala Gln Gly Ser Cys Gly Gly Gly Pro Val
            100                 105                 110

Gly Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly Gly Gly Gly Asp Val Cys Ala Val
        115                 120                 125

Cys Thr Asp Glu Ile Ala Pro Pro Leu Arg Cys Gln Ser Phe Pro Cys
    130                 135                 140

Leu His Pro Phe Cys Ile Pro Cys Met Lys Thr Trp Ile Pro Leu Arg
145                 150                 155                 160

Asn Thr Cys Pro Leu Cys Asn Thr Pro Val Ala Tyr Leu Ile Val Gly
                165                 170                 175

Val Thr Ala Ser Gly Ser Phe Ser Thr Ile Pro Ile Val Asn Asp Pro
            180                 185                 190

Arg Thr Arg Val Glu Ala Glu Ala Ala Val Arg Ala Gly Thr Ala Val
        195                 200                 205
```

```
Asp Phe Ile Trp Thr Gly Asn Pro Arg Thr Ala Pro Arg Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Gly Gly His Thr Val Arg Ala Leu Ser Pro Thr Pro Pro Trp Pro
225                 230                 235                 240

Gly Thr Asp Asp Glu Asp Asp Asp Leu Ala Asp Val Asp Tyr Val Pro
                245                 250                 255

Pro Ala Pro Arg Arg Ala Pro Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala
            260                 265                 270

Thr Arg Gly Thr Ser Gln Pro Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Pro Gly
        275                 280                 285

Ala Pro Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ala Pro Leu Arg Ala Gly Val
    290                 295                 300

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Pro Ala Val Ala Ala Val Val Pro Arg
305                 310                 315                 320

Val Ala Ser Leu Pro Pro Ala Ala Gly Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
                325                 330                 335

Arg Val Gly Glu Asp Ala Ala Ala Ala Glu Gly Arg Thr Pro Pro Ala
            340                 345                 350

Arg Gln Pro Arg Ala Ala Gln Glu Pro Pro Ile Val Ile Ser Asp Ser
        355                 360                 365

Pro Pro Pro Ser Pro Arg Arg Pro Ala Gly Pro Gly Pro Leu Ser Phe
    370                 375                 380

Val Ser Ser Ser Ser Ala Gln Val Ser Ser Gly Pro Gly Gly Gly Gly
385                 390                 395                 400

Leu Pro Gln Ser Ser Gly Arg Ala Ala Arg Pro Arg Ala Ala Val Ala
                405                 410                 415

Pro Arg Val Arg Ser Pro Pro Arg Ala Ala Ala Ala Pro Val Val Ser
            420                 425                 430

Ala Ser Ala Asp Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Ala Val Pro Val Asp
        435                 440                 445

Ala His Arg Ala Pro Arg Ser Arg Met Thr Gln Ala Gln Thr Asp Thr
    450                 455                 460
```

```
Gln Ala Gln Ser Leu Gly Arg Ala Gly Ala Thr Asp Ala Arg Gly Ser
465                 470                 475                 480

Gly Gly Pro Gly Ala Glu Gly Gly Pro Gly Val Pro Arg Gly Thr Asn
                485                 490                 495

Thr Pro Gly Ala Ala Pro His Ala Ala Glu Gly Ala Ala Ala Arg Pro
            500                 505                 510

Arg Lys Arg Arg Gly Ser Asp Ser Gly Pro Ala Ala Ser Ser Ser Ala
        515                 520                 525

Ser Ser Ser Ala Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Gln Gly Val Gly
    530                 535                 540

Ala Lys Arg Ala Ala Pro Arg Arg Ala Pro Asp Ser Asp Ser Gly Asp
545                 550                 555                 560

Arg Gly His Gly Pro Leu Ala Pro Ala Ser Ala Gly Ala Ala Pro Pro
                565                 570                 575

Ser Ala Ser Pro Ser Ser Gln Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ser
            580                 585                 590

Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser
        595                 600                 605

Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
    610                 615                 620

Ser Ser Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Ser Gly
625                 630                 635                 640

Ala Gly Glu Arg Arg Glu Thr Ser Leu Gly Pro Arg Ala Ala Ala Pro
                645                 650                 655

Arg Gly Pro Arg Lys Cys Ala Arg Lys Thr Arg His Ala Glu Gly Gly
            660                 665                 670

Pro Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Ala Pro Gly Leu Thr Arg Tyr Leu
        675                 680                 685

Pro Ile Ala Gly Val Ser Ser Val Val Ala Leu Ala Pro Tyr Val Asn
    690                 695                 700

Lys Thr Val Thr Gly Asp Cys Leu Pro Val Leu Asp Met Glu Thr Gly
705                 710                 715                 720
```

```
His Ile Gly Ala Tyr Val Val Leu Val Asp Gln Thr Gly Asn Val Ala
                725                 730                 735

Asp Leu Leu Arg Ala Ala Ala Pro Ala Trp Ser Arg Arg Thr Leu Leu
            740                 745                 750

Pro Glu His Ala Arg Asn Cys Val Arg Pro Pro Asp Tyr Pro Thr Pro
        755                 760                 765

Pro Ala Ser Glu Trp Asn Ser Leu Trp Met Thr Pro Val Gly Asn Met
    770                 775                 780

Leu Phe Asp Gln Gly Thr Leu Val Gly Ala Leu Asp Phe His Gly Leu
785                 790                 795                 800

Arg Ser Arg His Pro Trp Ser Arg Glu Gln Gly Ala Pro Ala Pro Ala
                805                 810                 815

Gly Asp Ala Pro Ala Gly His Gly Glu
            820                 825
```

<210> 6

<211> 676

<212> PRT

<213> Virus de rinotraqueitis bovina infecciosa

<400> 6

```
Met Ala Pro Pro Ala Ala Ala Pro Glu Leu Gly Ser Cys Cys Ile Cys
1               5                   10                  15

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Ala Ala Arg Ala Leu Pro Cys Leu His Ala
            20                  25                  30

Phe Cys Leu Ala Cys Ile Arg Arg Trp Leu Glu Gly Arg Pro Thr Cys
        35                  40                  45

Pro Leu Cys Lys Ala Pro Val Gln Ser Leu Ile His Ser Val Ala Ser
    50                  55                  60

Asp Glu Cys Phe Glu Glu Ile Pro Val Gly Gly Gly Pro Gly Ala Asp
65                  70                  75                  80

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

Ala Gly Pro Ile Asp Leu Thr Ala Ala Asp Gly Glu Ala Ser Gly Ala
            100                 105                 110
```

```
Gly Gly Glu Ala Gly Ala Ala Asp Gly Ser Glu Ala Gly Gly Gly Ala
        115                 120                 125

Gly Gly Ala Glu Glu Ala Gly Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Arg
    130                 135                 140

Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Arg Ala Gly Arg Gly Ala Asp Ala Ala
145                 150                 155                 160

Gln Glu Phe Ile Asp Arg Val Ala Arg Gly Pro Arg Leu Pro Leu Leu
                165                 170                 175

Pro Asn Thr Pro Glu His Gly Pro Gly Ala Pro Tyr Leu Arg Arg Val
            180                 185                 190

Val Glu Trp Val Glu Gly Ala Leu Val Gly Ser Phe Ala Val Thr Ala
        195                 200                 205

Arg Glu Leu Ala Ala Met Thr Asp Tyr Val Met Ala Met Leu Ala Glu
    210                 215                 220

Cys Gly Phe Asp Asp Asp Gly Leu Ala Asp Ala Met Glu Pro Leu Ile
225                 230                 235                 240

Gly Glu Asp Asp Ala Pro Ala Phe Val Arg Ser Leu Leu Phe Val Ala
                245                 250                 255

Ala Arg Cys Val Thr Val Gly Pro Ser His Leu Ile Pro Gln Gln Ser
            260                 265                 270

Ala Pro Pro Gly Gly Arg Gly Val Val Phe Leu Asp Thr Ser Asp Ser
        275                 280                 285

Asp Ser Glu Gly Ser Glu Asp Asp Ser Trp Ser Glu Ser Glu Glu Ser
    290                 295                 300

Ser Ser Gly Leu Ser Thr Ser Asp Leu Thr Ala Ile Asp Asp Thr Glu
305                 310                 315                 320

Thr Glu Pro Glu Thr Asp Ala Glu Val Glu Ser Arg Arg Thr Arg Gly
                325                 330                 335

Ala Ser Gly Ala Ala Arg Ala Arg Arg Pro Ala Glu Arg Gln Tyr Val
            340                 345                 350

Ser Thr Arg Gly Arg Gln Thr Pro Ala Val Gln Pro Ala Pro Arg Ser
```

```
        355                 360                 365

Leu Ala Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Ala Ala Val Ser Ala Pro Pro
    370                 375                 380

Ser Ser Arg Ser Arg Gly Gly Arg Arg Asp Pro Arg Leu Pro Ala Ala
385                 390                 395                 400

Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ser Pro Glu Pro
                405                 410                 415

Arg Glu Glu Gly Arg Gly Ala Gly Leu Gly Val Ala Ala Gly Glu Thr
            420                 425                 430

Ala Gly Trp Gly Ala Gly Ser Glu Glu Gly Arg Gly Glu Arg Arg Ala
        435                 440                 445

Arg Leu Leu Gly Glu Ala Gly Pro Pro Arg Val Gln Ala Arg Arg Arg
    450                 455                 460

Arg Arg Thr Glu Leu Asp Arg Ala Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ala
465                 470                 475                 480

Pro Ala Pro Ala Pro Ile Ser Thr Val Ile Asp Leu Thr Ala Asn Ala
                485                 490                 495

Pro Ala Arg Pro Ala Asp Pro Ala Pro Ala Ala Ala Pro Gly Pro Ala
            500                 505                 510

Ser Ala Gly Ala Gln Ile Gly Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr
        515                 520                 525

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Val Ala Arg Ser Ser Ala Pro Ser Pro
    530                 535                 540

Ala Val Thr Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ala Ala Ala Ile Ser Thr Arg
545                 550                 555                 560

Ala Pro Thr Pro Ser Pro Ala Gly Arg Ala Pro Ala Ala Asp Pro Arg
                565                 570                 575

Arg Ala Gly Ala Pro Ala Leu Ala Gly Ala Ala Arg Ala Glu Val Gly
            580                 585                 590

Arg Asn Gly Asn Pro Gly Arg Glu Arg Arg Pro Ala Ser Ala Met Ala
        595                 600                 605
```

```
Arg Gly Asp Leu Asp Pro Gly Pro Glu Ser Ser Ala Gln Lys Arg Arg
    610                 615                 620

Arg Thr Glu Met Glu Val Ala Ala Trp Val Arg Glu Ser Leu Leu Gly
625                 630                 635                 640

Thr Pro Arg Arg Ser Ser Ala Ala Leu Ala Pro Gln Pro Gly Gly Arg
                645                 650                 655

Gln Gly Pro Ser Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Cys Ser Gly Gly Ser
            660                 665                 670

Ala Trp Arg Gln
        675
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un virus con replicación defectuosa en cultivo, que comprende:

a. proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se requiere para la replicación de un virus con replicación defectuosa y en donde la célula es una célula mamífera o aviar;

b. introducir en la célula un polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") por virus de herpes simple, incrementando de ese modo la expresión de la proteína recombinante;

c. introducir en la célula un virus con replicación defectuosa, en donde la proteína recombinante complementa al virus con replicación defectuosa en trans; y

d. aislar el virus con replicación defectuosa;

en donde el ICPO se introduce mediante transducción con un vector viral seleccionado de vectores de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociado.

2. Un método para producir un virus con replicación defectuosa en cultivo, que comprende las siguientes etapas separadas:

a. proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína recombinante, en donde la proteína recombinante se requiere para la replicación de un virus con replicación defectuosa y en donde la célula es una célula mamífera o aviar;

b. introducir en la célula un polipéptido cero de células infectadas ("ICPO") por virus de herpes simple, incrementando de ese modo la expresión de la proteína recombinante;

c. introducir en la célula un virus con replicación defectuosa, en donde la proteína recombinante complementa al virus con replicación defectuosa en trans; y

d. aislar el virus con replicación defectuosa;

en donde el virus con replicación defectuosa es un miembro de la familia de virus herpes, y:

i. la proteína recombinante es ICP8 y/o pUL5 y el virus con replicación defectuosa se introduce en la célula después del ICPO; o

ii. la proteína recombinante es ICP8 y/o pUL5 y el ICPO se introduce con un vector o una construcción de expresión que codifica ICPO.

3. Un método para producir HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa o para incrementar el rendimiento de HSV529 vacunal para HSV-2 con replicación defectuosa, que comprende las siguientes etapas, en orden:

a. introducir ICPO en células AV529-19, en donde el ICPO incrementa la expresión de al menos una de ICP8 o pUL5;

b. infectar las células AV529-19 con HSV529; y

c. aislar HSV529.

4. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la célula es AV529-19.

5. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es ICP8 y el virus con replicación defectuosa es un miembro de la familia de virus herpes.

6. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es pUL5 y el virus con replicación defectuosa es un miembro de la familia de virus herpes.

7. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la célula es una célula mamífera.

8. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la célula se selecciona de Vero, BHK, CHO, HKB, HEK, NSO y U-2 OS, WI-38, MRC-5, MDCK, FRhL-2 o PERC6.

9. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el ICPO se introduce mediante un ácido nucleico que es episómico o está integrado en el genoma de la célula anfitriona.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína recombinante es episómico o está integrado en el genoma de la célula anfitriona.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ICPO se introduce mediante transducción.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ICPO se introduce mediante transfección, opcionalmente en el que el ICPO se introduce mediante transfección con un plásmido que codifica ICPO.

13. El método según la reivindicación 12, en el que el plásmido comprende un promotor inducible que conduce la expresión de ICPO, que se selecciona del grupo que consiste en promotores regulados químicamente o físicamente.

14. El método según la reivindicación 12, en el que el plásmido comprende un promotor no inducible que conduce la expresión de ICPO, que se selecciona del grupo que consiste en promotores de CMV, promotores de SV40 y promotores que contienen una secuencia TATA, una secuencia GC, una secuencia CCAAT, un elemento de reconocimiento B y un elemento iniciador.

15. El método según la reivindicación 1, en el que el virus con replicación defectuosa es un miembro de la familia de virus herpes.

16. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el virus con replicación defectuosa es un virus HSV-2.

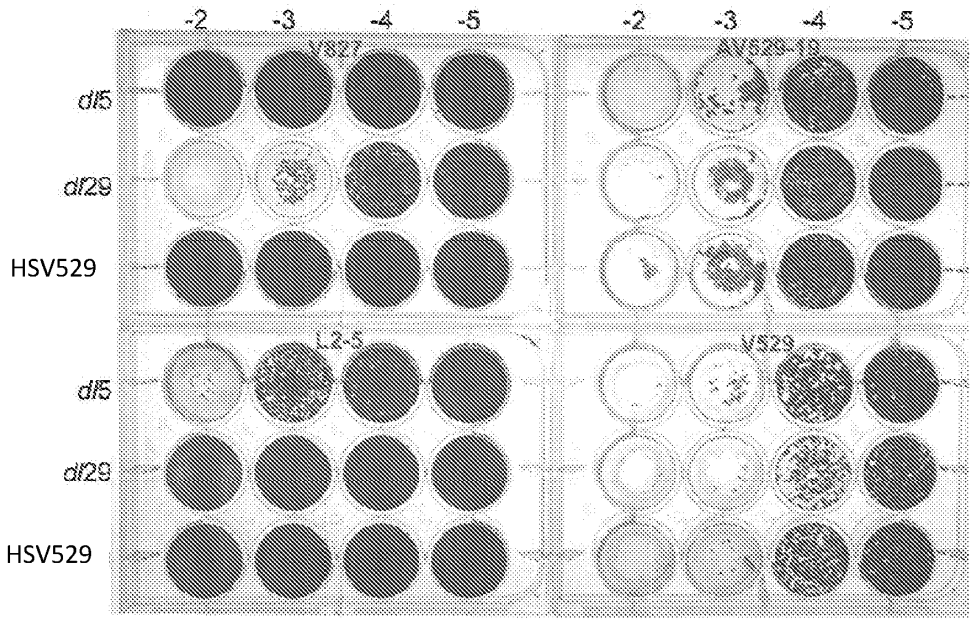

-2
-3
-4
-5
-2
-3
-4
-5
V827
AV529-10
dl5
dl29
HSV529
L2-5
V529
dl5
dl29
HSV529

FIG. 1

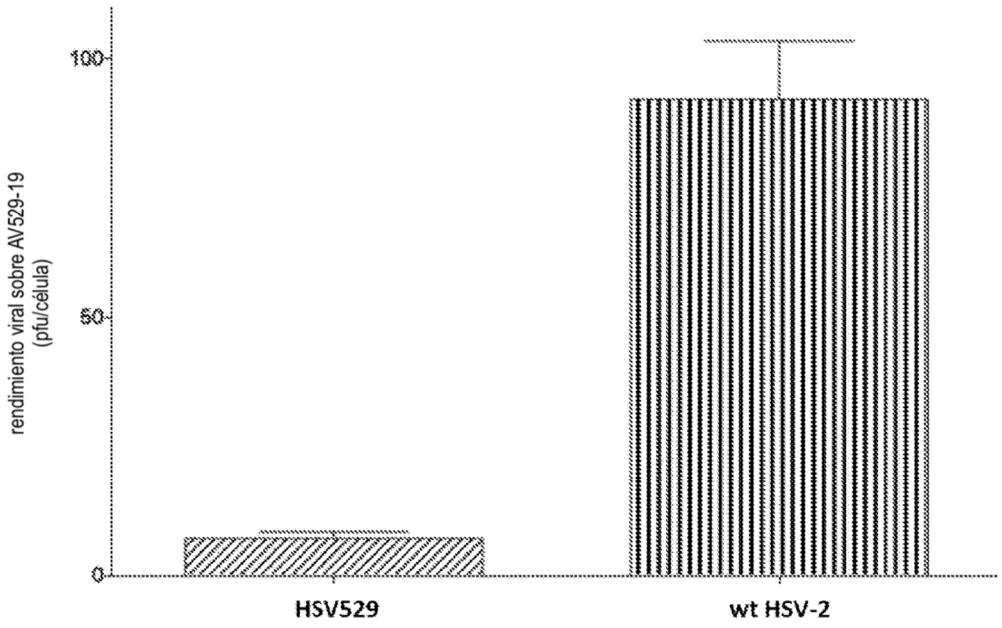

rendimiento viral sobre AV529-19
(pfu/célula)
100
50
0
HSV529
wt HSV-2

FIG. 2

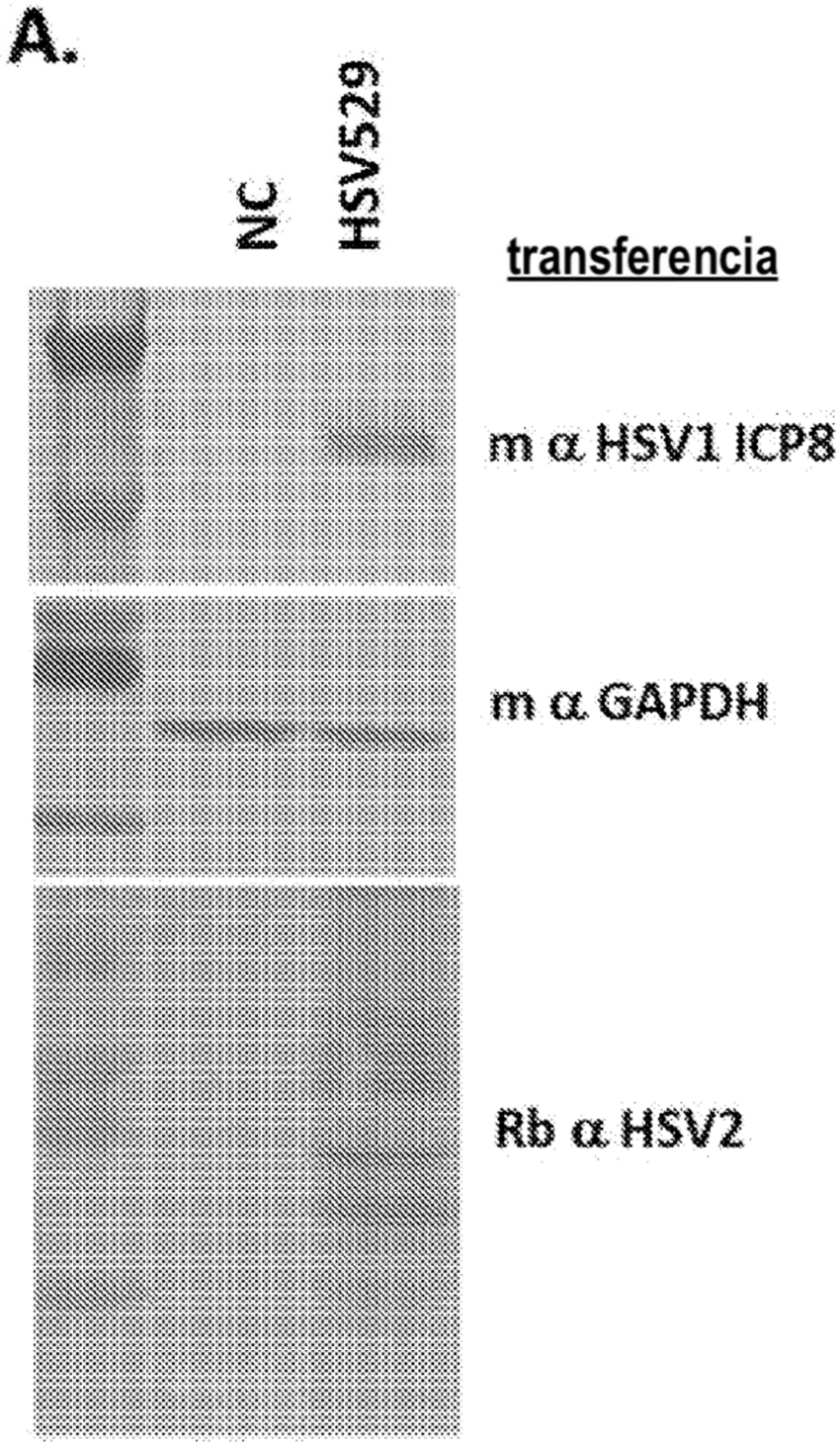


FIG. 3

FIG. 4

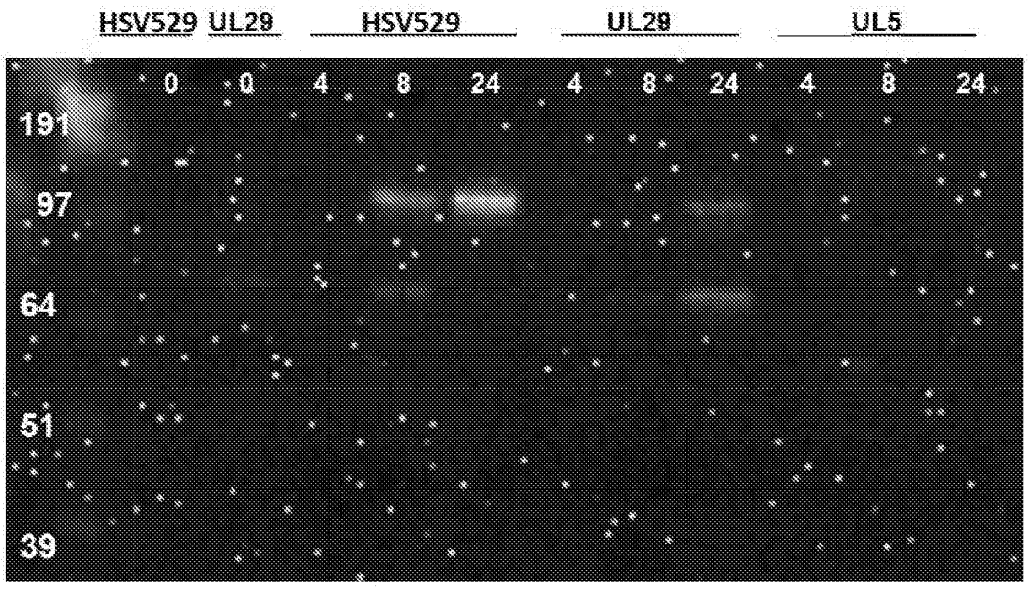
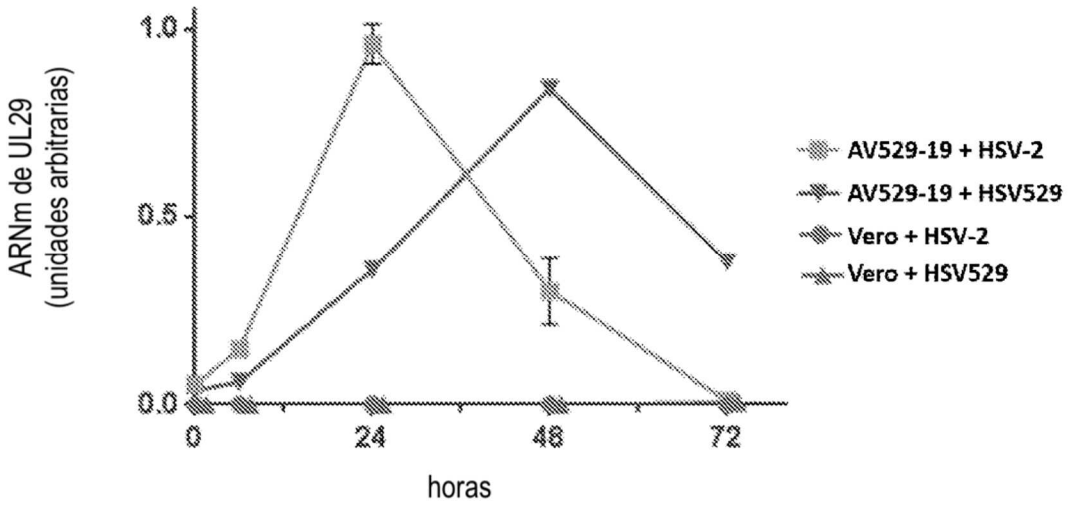


FIG. 5


ARNm de UL29
(unidades arbitrarias)
1.0
0.5
0.0
0
24
48
72
horas
AV529-19 + HSV-2
AV529-19 + HSV529
Vero + HSV-2
Vero + HSV529

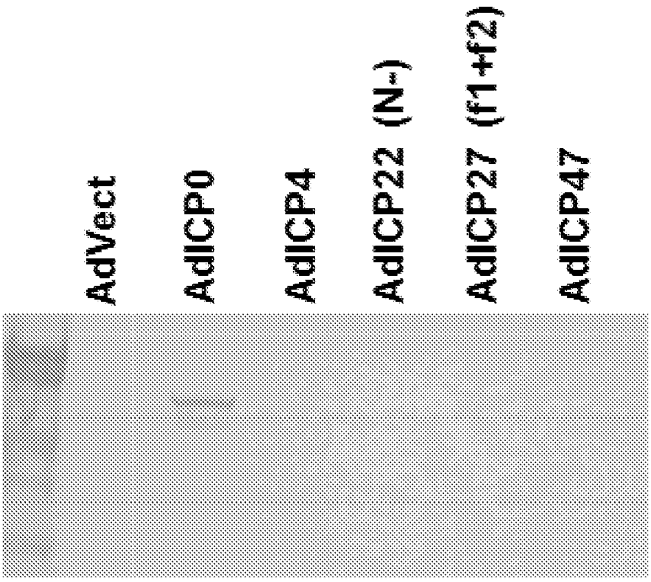


FIG. 6

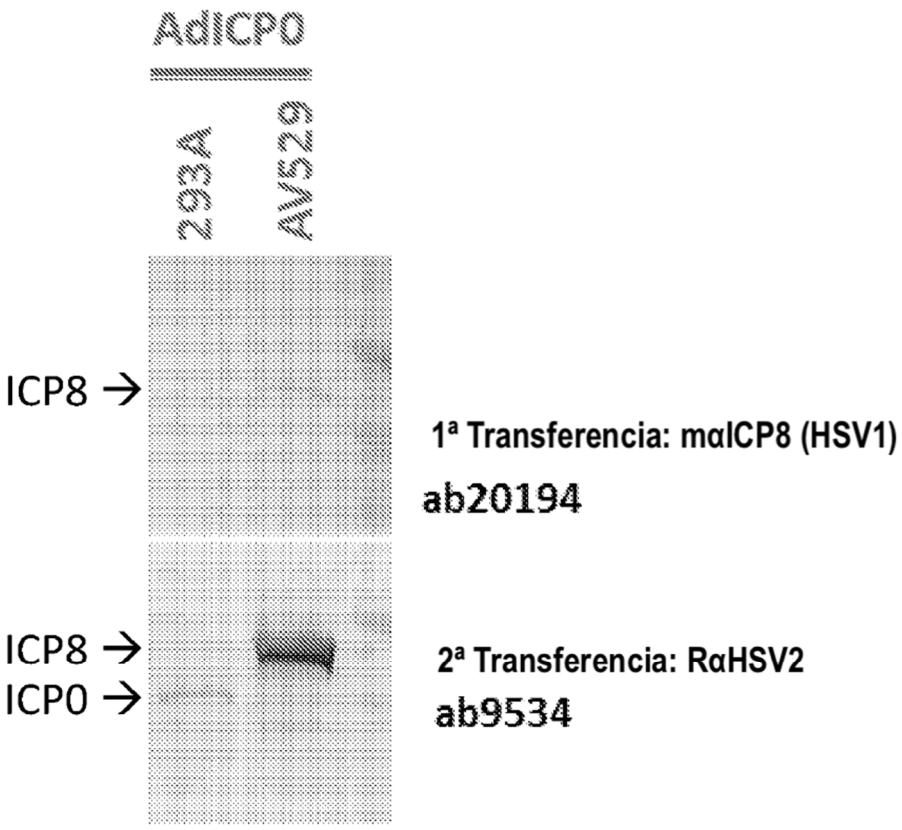

AdICP0
293A
AV529
ICP8 →
1ª Transferencia: mαICP8 (HSV1)
ab20194
ICP8 →
ICP0 →
2ª Transferencia: RαHSV2
ab9534

FIG. 7

FIG. 8A

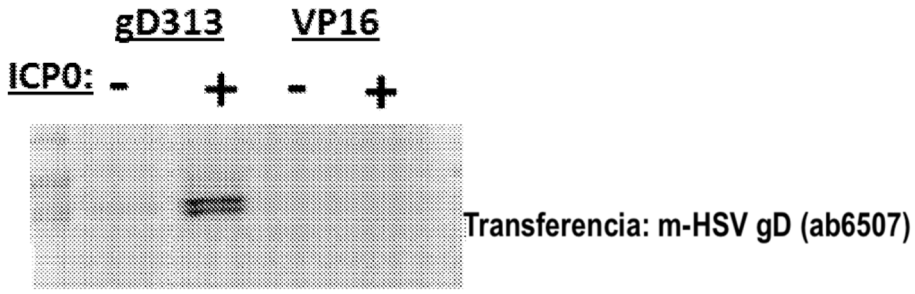
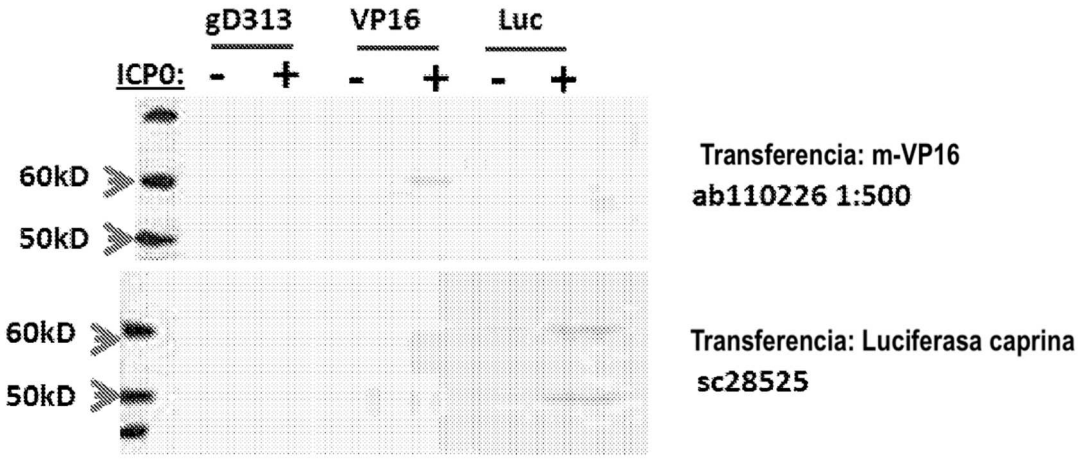

gD313
VP16
ICP0: - + - +
Transferencia: m-HSV gD (ab6507)

FIG. 8B


gD313
VP16
Luc
ICP0: - + - + - +
60kD
50kD
Transferencia: m-VP16
ab110226 1:500
60kD
50kD
Transferencia: Luciferasa caprina
sc28525

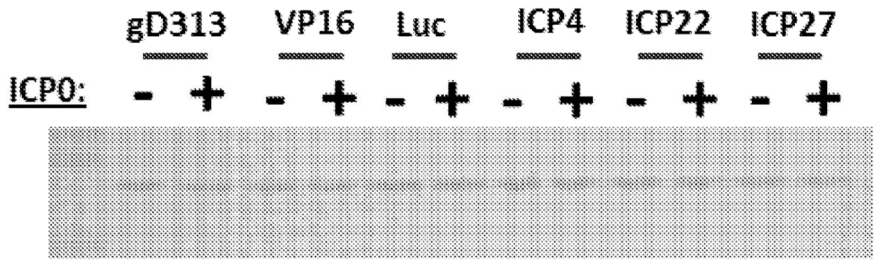

gD313
VP16
Luc
ICP4
ICP22
ICP27
ICP0:
- + - + - + - + - + - +
Transferencia de m-GAPDH

FIG. 9A

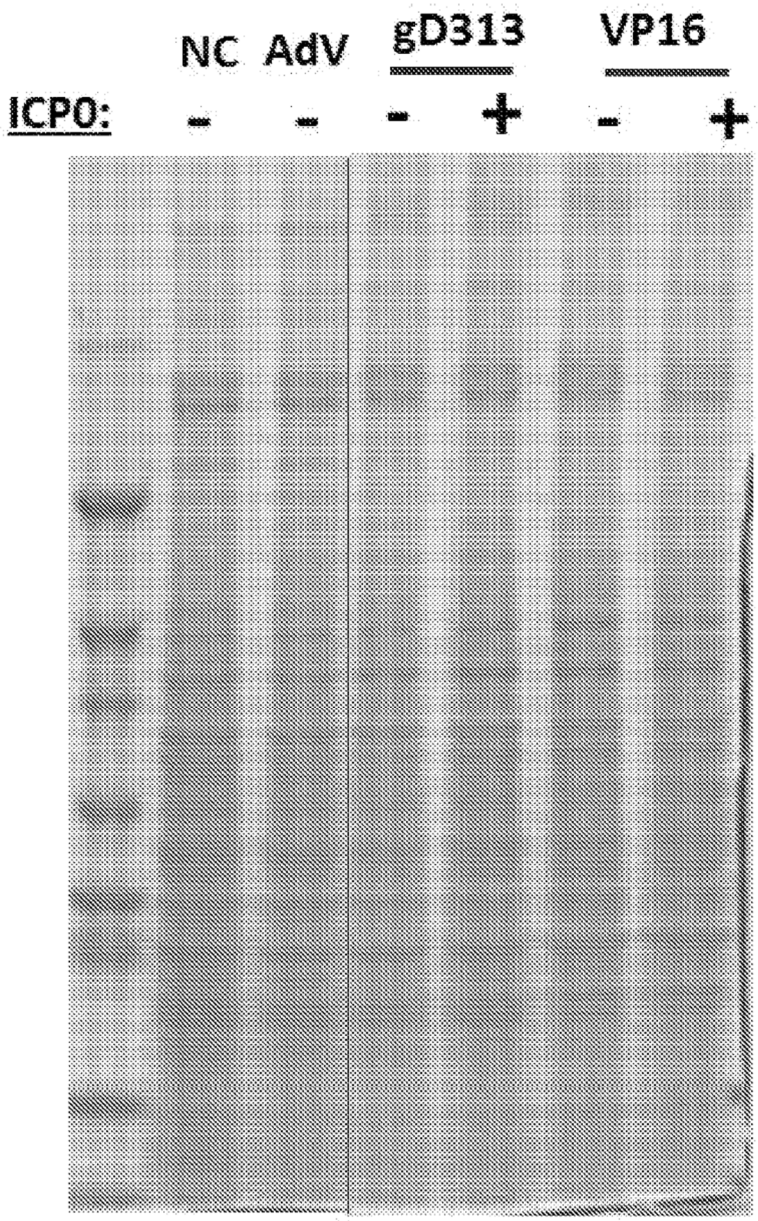


FIG. 9B

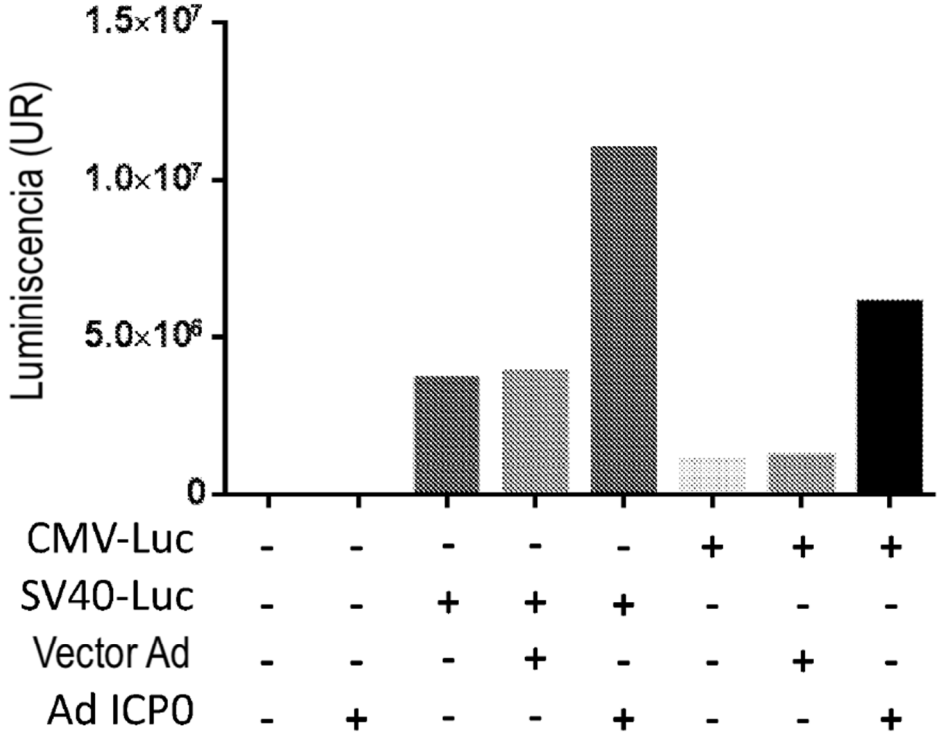

1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
Luminiscencia (UR)
CMV-Luc - - - - - + + +
SV40-Luc - - + + + - - -
Vector Ad - - - + - - + -
Ad ICP0 - + - - + - - +

FIG. 10

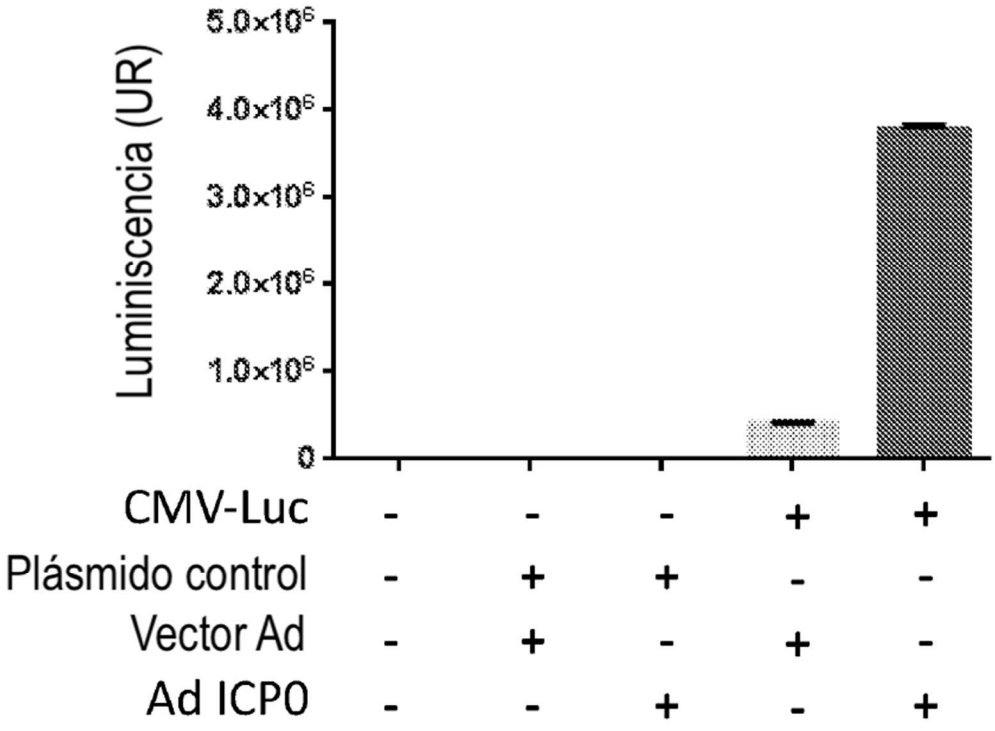
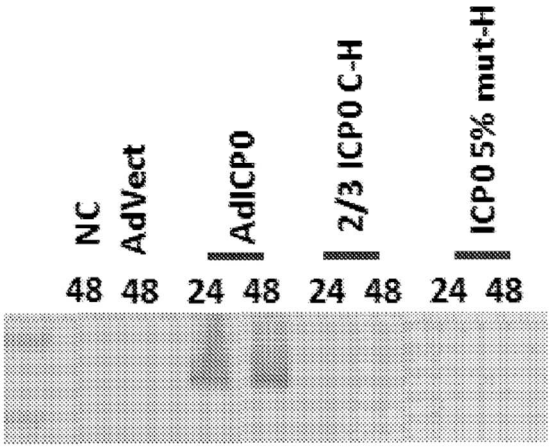

Luminiscencia (UR)
5.0×10^6
4.0×10^6
3.0×10^6
2.0×10^6
1.0×10^6
0
CMV-Luc - - - + +
Plásmido control - + + - -
Vector Ad - + - + -
Ad ICP0 - - + - +

FIG. 11

FIG. 12


NC
AdVect
AdICP0
2/3 ICP0 C-H
ICP0 5% mut-H
48 48 24 48 24 48 24 48
Transferencia: R-HSV2 (ab95334)

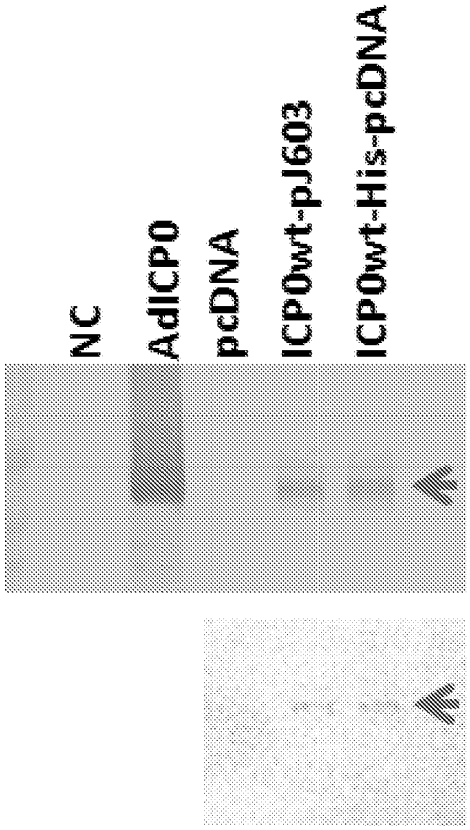


FIG. 13

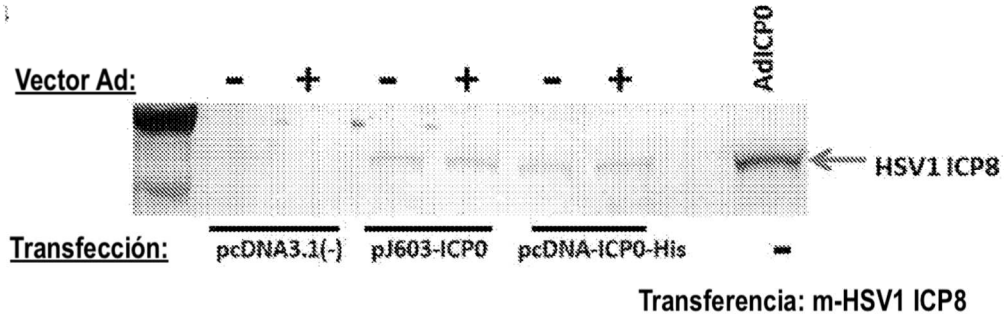

Vector Ad:
-
+
-
+
-
+
AdICP0
HSV1 ICP8
Transfección:
pcDNA3.1(-)
pJ603-ICP0
pcDNA-ICP0-His
-
Transferencia: m-HSV1 ICP8

FIG. 14

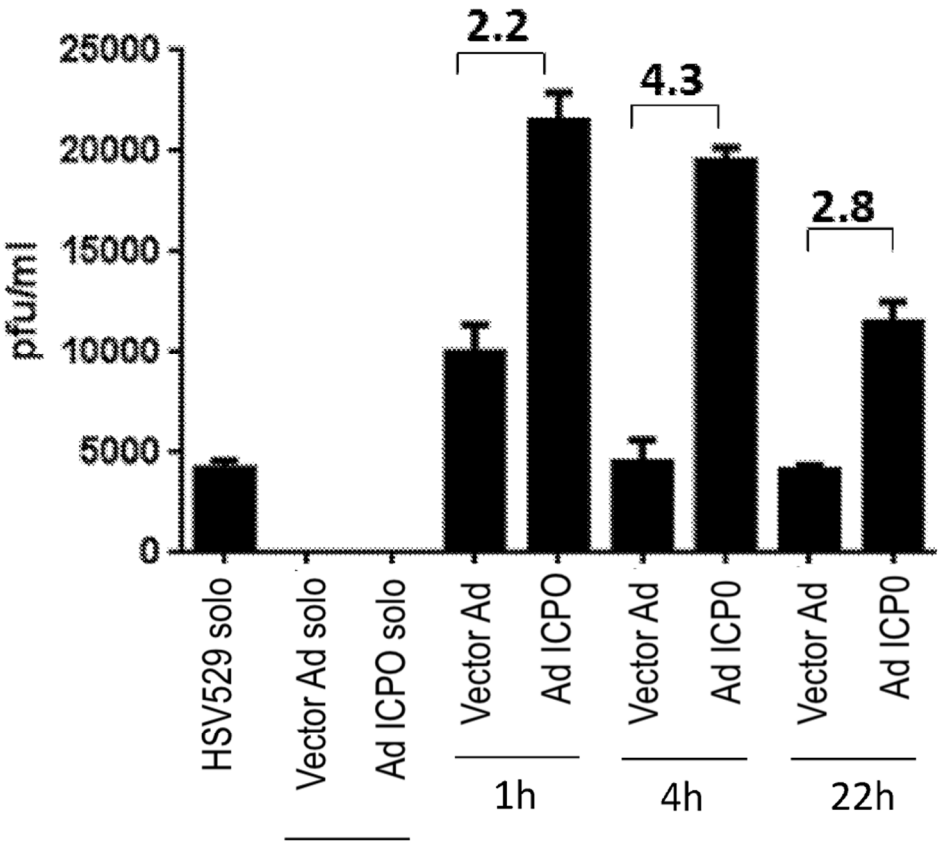

2.2
4.3
2.8
25000
20000
15000
10000
5000
0
pfu/ml
HSV529 solo
Vector Ad solo
Ad ICPO solo
Vector Ad
Ad ICPO
Vector Ad
Ad ICP0
Vector Ad
Ad ICP0
1h
4h
22h

FIG. 15

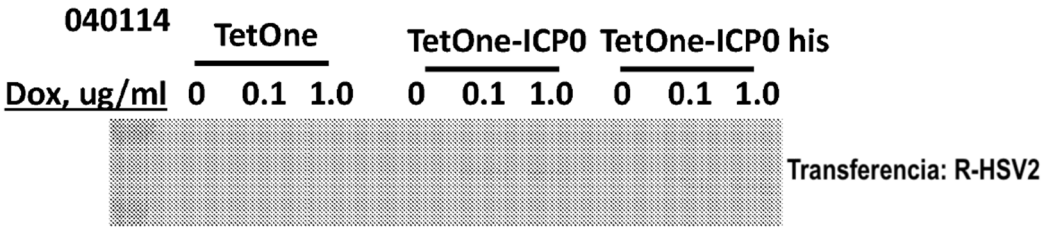

040114
TetOne
TetOne-ICP0
TetOne-ICP0 his
Dox, ug/ml 0 0.1 1.0 0 0.1 1.0 0 0.1 1.0
Transferencia: R-HSV2

FIG. 16