

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 548**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/US2015/029905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15172033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15789628 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3139745**

54 Título: **Vacunas contra las infecciones por herpes simple genital**

30 Prioridad:

09.05.2014 US 201461990975 P

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

16.04.2021

73 Titular/es:

**BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND
MECHANICAL COLLEGE (100.0%)
104B University Administration Building 3810 W.
Lakeshore Dr.
Baton Rouge, LA 70808, US**

72 Inventor/es:

KOUSOULAS, KANSTANTIN

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 819 548 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra las infecciones por herpes simple genital

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las vacunas para tratar o prevenir una infección por el virus del herpes simple.

10 **Antecedentes de la invención**

El herpes genital tiene una prevalencia global y una carga de morbilidad muy altas. Estudios recientes de seroprevalencia para los años 2005-2010 indican que 1 de cada 2 adultos en los Estados Unidos de 14-49 años está infectado de forma latente con herpes simple tipo 1 (VHS-1) (Bradley *et al.* (2013) *J. Infect. Dis.* 209:325-333). La mayoría de las personas infectadas experimentan episodios frecuentes, pero asintomáticos de diseminación de virus que contribuyen a altas tasas de transmisión del virus (Hofstetter *et al.* (2014) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27:75-83; Tronstein *et al.* (2011) *JAMA* 305:1441-1449; Mertz (2008) *J. Infect. Dis.* 198:1098-1100). En los casos clínicos se observa un número creciente de infecciones por VHS-1 en lugar de VHS-2 (Roberts *et al.* (2003) *Sexo. Transm. Dis.* 30:797-800). De forma importante, la infección genital por VHS se considera un factor de riesgo para adquirir la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) *et al.* (2008) *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74:230-233; Mugo *et al.* (2011) *Sex. Transm. Dis.* 38:1059-1066; Reynolds *et al.* (2003) *J. Infect. Dis.* 187:1513-1521; Renzi *et al.* (2003) *J. Infect. Dis.* 187:19-25; Wald and Link (2002) *J. Infect. Dis.* 185:45-52; Sartori *et al.* (2011) *Virol. J.* 8:166) y en algunas áreas geográficas la infección por VHS-2 puede ser un factor que contribuya al 30-50 % de las nuevas infecciones por VIH (Brown *et al.* (2007) *AIDS* 21:1515-1523; Freeman *et al.* (2006) *AIDS* 20:73-83). Se prevé que una estrategia de vacunación exitosa contra la infección por VHS-2 tendrá un impacto global dramático en la propagación del VIH, la prevención de enfermedades clínicas genitales e infecciones neonatales (Freeman *et al.* (2009) *Vaccine* 27:940-946; Johnston *et al.* (2014) *Vaccine* 32:1553-1560; Gottlieb *et al.* (2014) *Vaccine* 32:1527-1535). La inmunidad previa al VHS puede conferir solo una protección parcial contra la reinfección por VHS y la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad (Hofstetter *et al.* (2014) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27:75-83; Blank y Haines (1973) *J. Invest. Dermatol.* 61:223-225). Las respuestas inmunitarias adaptativas, en particular, las células T CD4+ y CD8+ específicas de tejido son cruciales para controlar las infecciones por VHS y eliminar el virus después de la infección inicial. Estas respuestas de las células T también son importantes para contener el virus en un estado latente en las neuronas ganglionares o dorsales, así como para controlar el virus después de la reactivación de la latencia (Koelle *et al.* (1998) *J. Clin. Invest.* 101:1500-1508; Milligan *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:6093-6100; Schiffer y Corey (2013) *Nat. Med.* 19:280-290; Wakim *et al.* (2008) *Immunol. Cell Biol.* 86:666-675; Zhu *et al.* (2007) *J. Exp. Med.* 204:595-603; Dudley *et al.* (2000) *Virology* 270:454-463; St. Leger y Hendricks (2011) *J. Neurovirol.* 17:528-534). Las respuestas humorales también se han implicado en jugar un papel importante en el control de la infectividad, la propagación y la tasa de reactivación de la latencia del VHS (Li *et al.* (2011) *PNAS* 108:4388-4393; Morrison *et al.* (2001) *J. Virol* 75:1195-1204; Seppanen *et al.* (2006) *J. Infect. Dis.* 194:571-578).

Se han evaluado diversos enfoques y candidatos de vacunas en animales de laboratorio y seres humanos incluyendo péptidos purificados, subunidades de glucoproteínas recombinantes, virus enteros inactivados, atenuados vivos, competentes en replicación y defectuosos en replicación, así como vacunas basadas en ADN administradas a través de diferentes vías de inmunización (revisadas en: Koelle y Corey (2003) *Clin. Microbiol. Rev.* 16:96-113; Roth *et al.* (2012) *Microb. Pathog.* 58:45-54; Rupp and Bernstein (2008) *Expert. Opin. Emerg. Drugs* 13:41-52; Dropulic y Cohen (2012) *Expert Rev. Vaccines* 11:1429-1440; y Zhu *et al.* (2014) *Viruses* 6:371-390). En una prueba de campo de doble ciego controlado, de efectividad aleatorizada de una vacuna contra el VHS gD-2 adyuvantada con A04 (prueba Herpevac) en 8323 mujeres, se descubrió que la vacuna tenía un 82 % de protección contra la enfermedad genital del VHS-1, pero no ofreció una protección significativa contra la enfermedad genital del VHS-2 (Belshe *et al.* (2012) *N. Engl. J. Med.* 366:34-43). Esta protección se correlacionó con la inducción de anticuerpos neutralizantes contra gD-2, mientras que las respuestas inmunitarias celulares no parecían estar implicadas en la protección observada (Belshe *et al.* (2014) *J. Infect. Dis.* 209:828-836; Awasthi y Friedman (2014) *J. Infect. Dis.* 209:813-815). Un enfoque de vacuna de subunidades más reciente que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I/IIa se basa en un intento de generar una respuesta equilibrada de células T y anticuerpos a través del uso de epítopos de células T derivados de la proteína ICP4 y el anticuerpo generado por la glucoproteína gD2 junto con el adyuvante patentado Matrix-M (Roth *et al.* (2012) *Microb. Pathog.* 58:45-54).

En principio, las vacunas vivas atenuadas tienen claras ventajas sobre las vacunas de subunidades y las inactivadas, principalmente porque la replicación del patógeno permite el repertorio completo de expresión de antígenos específicos de patógenos. Dada la identidad de nucleótidos del 83 % compartida por los genomas de VHS-1 y VHS-2 (Dolan *et al.* (1998) *J. Virol* 72:2010-2021), la inmunidad protectora cruzada puede lograrse mediante una única vacuna segura y efectiva que exprese un repertorio suficientemente grande de antígenos protectores cruzados. Los intentos de generar una vacuna viva atenuada contra el VHS se han centrado en la preparación de virus atenuados que puedan generar respuestas inmunitarias robustas, minimizando al mismo tiempo la virulencia potencial en el hospedador. Generalmente, los genes enteros que desempeñan funciones importantes en el ciclo de vida del virus se han eliminado o modificado de otra manera para atenuar el virus y permitir una producción más robusta de respuestas inmunitarias

humorales y celulares. Las modificaciones del genoma vírico incluyen deleciones en la glucoproteína E (gE) (Brittle *et al.* (2008) *J. Virol* 82:8431-8441; Awasthi *et al.* (2012) *J. Virol* 86:4586-4598), deleciones múltiples en γ 34.5, UL55-56, UL43.5, US10-12 (Prichard *et al.* (2005) *Vaccine* 23:5424-5431), UL5, UL29, UL42, genes ICP27 (van Lint *et al.* (2007) *Virology* 368:227-231; Dudek *et al.* (2008) *Virology* 372:165-175; Hoshino *et al.* (2008) *Vaccine* 26:4034-4040; Da Costa *et al.* (2001) *Virology* 288:256-263), deleción de ICP0- (Halford *et al.* (2011) *PLoS One* 6:e17748) y el gen UL9 (Akhrameyeva *et al.* (2011) *J. Virol* 85:5036-5047; Brans *et al.* (2009) *J. Invest. Dermatol.* 129:2470-2479; Brans y Yao (2010) *BMC Microbiol.* 10:163; Augustinova *et al.* (2004) *J. Virol* 78:5756-5765). Otras vacunas de virus vivos en estudio incluyen el virus VHS-1 CJ9-gD diseñado para sobreexpresar gD1 y que tiene una mutación negativa dominante para prevenir la replicación del virus. Se ha informado que esta cepa de vacuna protege a las cobayas de la exposición intravaginal de VHS-2, con una marcada reducción en el título vírico y la formación de lesiones (Brans y Yao (2010) *BMC Microbiol.* 10:163).

También se ha propuesto utilizar con fines vacunales virus mutantes del VHS que carecen de glucoproteína K (gK) funcional. La deleción de los aminoácidos 31-68 dentro de la glucoproteína K (gK) de la membrana del VHS-1 evita que el virus infecte las neuronas ganglionares después de la infección ocular en ratones, sin afectar drásticamente la replicación vírica en cultivo celular (Saied *et al.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603). Se ha demostrado que gK forma con la proteína de membrana UL20 un complejo funcional que es necesario para su transporte intracelular, expresión de la superficie celular y capacidad para modular la envoltura del virión citoplasmático y la fusión celular inducida por virus (Foster *et al.* (2008) *J. Virol* 82:6310-6323) y varios dominios en el extremo amino y carboxilo de la proteína HSV-1 UL20 implicados en la producción de virus infecciosos o en la fusión celular inducida por virus o en ambos, han sido identificados (Melancon *et al.* (2004) *J. Virol* 78:7329-7343).

Stanfield *et al.* (2013 Southeast Regional IDEa Meeting, 17 de noviembre de 2013, página 51) informan de un virus atenuado VHS-1 que contiene mutaciones específicas tanto en gK como en UL20. Este virus mutante se replica eficazmente en cultivo celular pero es incapaz de infectar eficazmente neuronas o de provocar síntomas clínicos significativos en ratones, y una única inmunización intramuscular con dicho virus protege al 100 % de los ratones frente a la exposición intravaginal letal con VHS-1 o VHS-2. Sin embargo, no se proporciona información sobre las mutaciones específicas que se realizaron en gK y en UL20.

La generación de un virus VHS-1 con capacidad de replicación segura y eficaz es importante no solo para vacunar contra la infección por VHS y reducir la prevalencia del VIH, sino también como un vector de vacuna seguro que podría utilizarse para la expresión de antígenos heterólogos de otros patógenos. El VHS tiene muchos genes no esenciales y puede transportar de forma estable grandes fragmentos de ADN extraño. Esta flexibilidad genética es ideal para la expresión de antígenos específicos de otros patógenos (Murphy *et al.* (2000) *J. Virol* 74:7745-7754; Watanabe *et al.* (2007) *Virology* 357:186-198). El VHS recombinante que expresa factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), una potente quimioterapia que actúa en la maduración de los macrófagos, se está usando en combinación con otros productos quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello con resultados prometedores en fase I/II (Harrington *et al.* (2010) *Clin. Cancer Res.* 16:4005-4015). Se espera que la aprobación de la FDA para esta terapia de vacuna contra el VHS en particular para el melanoma allane el camino para el uso de vectores basados en VHS atenuados vivos para la vacunación contra el VHS y otros patógenos. Véase también, las Pub. de Sol. de Pat. de EE.UU. N.º 2013/0202639 y 2010/0297085.

Breve resumen de la invención

La presente invención, que se define en las reivindicaciones, proporciona vacunas para tratar o prevenir una infección por el virus del herpes simple (VHS). Las vacunas de la invención comprenden VHS recombinantes. Un VHS recombinante de la presente invención comprende un genoma de VHS recombinante, en particular, un genoma recombinante que deriva del genoma de un virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) o un virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2). En una realización de la invención, las vacunas comprenden VHS atenuados, recombinantes que son capaces de replicarse en una célula hospedadora e incapaces de entrar en los compartimentos axonales de las neuronas. Los genomas de VHS recombinantes de la presente invención se han diseñado para comprender una modificación específica en cada uno de los genes UL53 y UL20.

También se describen en el presente documento métodos para inmunizar a un paciente contra una infección por VHS que comprenden la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna de la presente invención.

Se proporcionan además genomas de VHS recombinantes y composiciones que comprenden un genoma de VHS recombinante de la presente invención que incluyen, pero no limitado a, virus y composiciones inmunogénicas. También se proporcionan métodos de producción de vacunas, composiciones inmunogénicas y virus que comprenden un genoma de VHS recombinante de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un esquema de la construcción de VC2. FIGURA 1A: La línea superior representa la disposición prototípica del genoma del VHS-1, con las regiones únicas largas (UL) y únicas cortas (US) flanqueadas por las

regiones de repetición terminal (TR) y de repetición interna (IR). A continuación se muestran las regiones genómicas expandidas que abarcan los marcos de lectura abiertos de UL20 y la glucoproteína K. En negro están las delecciones aproximadas dentro de sus genes respectivos. FIGURA 1B: Una representación gráfica del complejo de glucoproteína K (gK)-UL20 que interactúa con gB. Las áreas entre las líneas negras en la representación gráfica representan la ubicación aproximada de la delección en sus genes respectivos.

La FIGURA 2 describe los resultados del análisis *in vitro* de las características de replicación y entrada de VC2 frente a F BAC. FIGURA 2A: La morfología de la placa de VC2 frente a F BAC en células VERO 48 horas después de la infección visualizada por IHC y desarrollada con sustrato NovaRED. FIGURA 2B: Curva de crecimiento representativa de la cinética de replicación de VC2 frente a F BAC a una multiplicidad de infección (MOI) tanto baja (0,1) como alta (5). Las muestras recolectadas en los tiempos 0, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24 y 36 horas después de la infección se titularon en células VERO. FIGURA 2C: Ensayo de entrada que representa VC-2 frente a F BAC en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan los receptores de entrada del virus del herpes conocidos PILRa, nectina-1, HVEM y NEO para un control negativo.

La FIGURA 3 proporciona representaciones gráficas de la morbilidad antes y después de la exposición. FIGURA 3A: Cambio porcentual del peso previo al desafío en animales simulados frente a animales vacunados. Porcentajes normalizados al peso inicial el día 0. ** $p \leq 0,01$. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. La comparación estadística se realizó por SAS usando pruebas de efectos fijos de Tipo 3 de Proc. Mixtos. FIGURA 3B: Puntuación clínica de ratones que recibieron previamente una vacunación IM simulada o vacunación IM 10^7 UFP de VC2. Dos grupos (simulados y vacunados $n=10$ cada uno) recibieron una exposición intravaginal de 10^6 UFP de VHS-2 (G) y 2 grupos (simulados y vacunados $n=10$ cada uno) recibieron una exposición intravaginal de 10^6 UFP de VHS-1 (McKrae). Los ratones se puntuaron en una escala de 0-6 (0 = sin enfermedad, 1 = pelaje erizado y morbilidad generalizada, 2 = eritema y edema genital leve, 3 = inflamación genital moderada, 4 = inflamación genital con secreción purulenta, 5 = parálisis de las extremidades traseras, 6 = muerte). FIGURA 3C: Cambio porcentual en los pesos después de la exposición en animales simulados frente a animales vacunados estimulados con VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G). Porcentajes normalizados al peso inicial el día 0. ** $p \leq 0,01$. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. La comparación estadística se realizó por SAS usando pruebas de efectos fijos de Tipo 3 de Proc. Mixtos. FIGURA 3D: Correlación entre cambio porcentual en peso frente a puntuación clínica de ratones no vacunados Aproximación gaussiana $p < 0,0001$ Spearman $r = -0,84108$.

La FIGURA 4 proporciona ilustraciones fotográficas de la patología posterior al desafío. Patología de la enfermedad entre animales simulados (FIGURAS 4A, 4B) y vacunados (FIGURAS 4C, 4D) expuestos a VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G) 5 días después de la exposición. Los ratones infectados con VHS-1 (McKrae) y VHS-2 (G) mostraron una progresión de la enfermedad y una patología similares en los grupos simulados (dos paneles superiores). Los ratones vacunados (dos paneles inferiores) no mostraron ninguna enfermedad clínica durante el período de observación posterior a la exposición. Los síntomas leves de la enfermedad incluyeron pelaje erizado, postura encorvada, inflamación y enrojecimiento de la vagina (arriba a la derecha). Las manifestaciones más graves incluyeron flujo vaginal purulento (arriba a la izquierda).

La FIGURA 5 proporciona curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los ratones vacunados y vacunados de manera simulada en los grupos de exposición fueron desafiados por vía intravaginal con 10^6 UFP de VHS-1 McKrae (FIGURA 5A) o VHS-2G (FIGURA 5B) 21 días después de la vacunación primaria y se observaron durante 14 días. El cien por ciento de los animales vacunados en el grupo expuesto a VHS-1 y VHS-2 sobrevivieron, mientras que el 100 % de los animales vacunados de forma simulada murió. FIGURA 5A: Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos vacunados y vacunados de forma simulada ($p < 0,0001$) usando la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxin. FIGURA 5B: Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos vacunados y vacunados de forma simulada ($p < 0,0001$) usando la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxin. La FIGURA 6 proporciona representaciones gráficas del desprendimiento vaginal después de la exposición. FIGURA 6A: Diseminación de VHS-1 tras la exposición en animales simulados frente a vacunados. FIGURA 6B: Diseminación de VHS-2 tras la exposición en animales simulados frente a vacunados. Las diferencias significativas en los títulos de diseminación se indicaron como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, o *** $p \leq 0,0001$. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. La comparación estadística se realizó por SAS usando pruebas de efectos fijos del Tipo 3 de Procedimiento Mixto.

La FIGURA 7 proporciona representaciones gráficas del análisis *in vitro* de la respuesta inmunitaria humoral. FIGURA 7A: Análisis colorimétrico basado en ELISA de IgG policlonal reactiva contra VHS-1 producido 21 días después de la vacunación $n=20$. Comparación estadística realizada por SAS mediante el procedimiento de prueba T. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. FIGURA 7B: Titulación de PFU fija neutralizante de suero de VHS-1 (McKrae) normalizada a un control sin suero $n=5$. Se observó una reducción significativa de las UFP en diluciones de los sueros a 1:160, 1:80, 1:40 y 1:20. Comparación estadística realizada por SAS usando El Procedimiento Mixto y Diferencias en las Medias de Mínimos Cuadrados. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. FIGURA 7C: Neutralización de reacción cruzada de VHS-1 (McKrae) y VHS-2 (G) a una dilución 1:20 de sueros de ratones vacunados e inoculados de forma simulada. Porcentaje de neutralización normalizado a controles sin suero. Comparación estadística realizada por SAS usando El Procedimiento Mixto y Diferencias en las Medias de Mínimos Cuadrados. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. Diferencias significativas señaladas como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, o *** $p \leq 0,0001$.

La FIGURA 8 proporciona representaciones gráficas del análisis *in vitro* de la respuesta inmunitaria celular. FIGURA 8A: Proliferación de células T CD4+ frente a CD8+ de ratones que recibieron la vacuna y ratones que

fueron inyectados de forma simulada y estimulados con péptidos de VHS-1 o VHS-2 combinados. (FIGURAS 8B-8F) Análisis CBA de la concentración de citocinas secretadas en el sobrenadante del cultivo celular del ensayo de proliferación de células T. Comparación estadística realizada por SAS usando El Procedimiento Mixto y Diferencias en las Medias de Mínimos Cuadrados. Las barras representan el intervalo de confianza del 95 % aproximadamente en la media. Diferencias significativas señaladas como * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, o *** $p \leq 0,0001$.

FIGURA 9. Ensayo de ligación de proximidad (PLA) para la unión del virus y la entrada del virus y fusión de célula a célula. Las neuronas corticales primarias de ratón se infectaron con VHS-1 McKrae o VHS-1 McKraegKΔ31-68 con una MOI de 5. El PLA se realizó a las 0 horas después de la infección con mAb anti-gD y anti-nectina-1 para detectar el virus unido a la superficie celular después de la absorción del virus durante 2 horas a 4 °C (paneles superior e inferior izquierdo) y con anticuerpo anti-dineína y anti-UL37 después de 1 hora de incubación a 37 °C, respectivamente (paneles superior e inferior derecho).

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos listadas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas y un código de tres letras para aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y avanzar hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo 3'. Sólo se muestra una cadena de cada secuencia de nucleótidos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida para cualquier referencia a la cadena mostrada. Las secuencias de aminoácidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo amino de la secuencia y avanzar hacia delante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo carboxi.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de nucleótidos del gen UL20 del virus del herpes simple 1 humano, cepa F ("VHS-1 (F)"). El genoma completo de la cepa F de VHS-1 está disponible públicamente como N.º de registro de GenBank GU734771.1. Puede accederse a la base de datos de GenBank en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov/genbank.

La SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la proteína UL20 que está codificada por el gen UL20 de VHS-1 (F).

La SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de nucleótidos del gen UL53 de VHS-1 (F).

La SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína K (gK), que está codificada por el gen UL53 de VHS-1 (F).

La SEQ ID NO: 5 expone la secuencia de nucleótidos del gen UL20 modificado de VC2.

La SEQ ID NO: 6 expone la secuencia de aminoácidos de la proteína UL20 modificada que está codificada por el gen UL20 modificado de VC2.

La SEQ ID NO: 7 expone la secuencia de nucleótidos del gen UL53 modificado de VC2.

La SEQ ID NO: 8 expone la secuencia de aminoácidos de la gK modificada que está codificada por el gen UL53 modificado de VC2.

La SEQ ID NO: 9 expone la secuencia de aminoácidos de la proteína UL20 que está codificada por el gen UL20 de VHS-2. El genoma completo de VHS-2 que incluye, pero no limitado a, la secuencia de nucleótidos del gen UL20 está disponible públicamente como N.º de registro de GenBank NC_001798.1.

La SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína K (gK), que está codificada por el gen UL53 de VHS-2. El genoma completo de VHS-2 que incluye, pero no limitado a, la secuencia de nucleótidos del gen UL53 está disponible públicamente como N.º de registro de GenBank NC_001798.1.

Las SEQ ID NO: 11-19 exponen las secuencias de aminoácidos de los péptidos que se muestran en la Tabla 2.

Las SEQ ID NO: 20-25 exponen las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR descritos a continuación en el Ejemplo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en donde se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de las invenciones. De hecho, la invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse estando limitada a las realizaciones establecidas en el presente documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan con el fin de que esta divulgación satisfaga los requisitos legales aplicables. Los números similares se refieren a elementos similares en todo el documento.

Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención expuesta en el presente documento se le ocurrirán a una persona experta en la materia a la que pertenece esta invención que tenga el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la invención no debe limitarse a las realizaciones específicas desveladas y que se pretende que las modificaciones y otras realizaciones estén incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, estos se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

La presente invención proporciona vacunas para tratar o prevenir una infección por VHS en un animal que es capaz de infectarse con un VHS, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano. En una realización, la

presente invención proporciona vacunas que son útiles para tratar o prevenir una infección por el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), una infección por el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) o una infección tanto por VHS-1 como por VHS-2. VHS-1 y VHS-2 establecen infecciones de por vida y provocan importantes infecciones orofaciales y genitales en humanos. El VHS-1 es la principal causa de ceguera infecciosa en el mundo occidental. En la actualidad, no hay vacunas disponibles para proteger contra las infecciones por herpes simple. Las vacunas de la presente invención comprenden un VHS recombinante, particularmente un VHS-1 recombinante, que se ha diseñado para que sea incapaz de entrar en los compartimentos axonales de las neuronas en un hospedador mientras sea capaz de replicarse eficazmente en una célula hospedadora. Las vacunas de la presente invención encuentran uso para tratar y/o prevenir infecciones orofaciales y genitales por VHS en humanos.

Las vacunas de la presente invención comprenden un VHS recombinante que se ha diseñado genéticamente para contener ciertas modificaciones en su genoma. El VHS recombinante comprende un genoma de VHS recombinante que comprende una modificación específica en cada uno de los genes UL53 y UL20. Un genoma de VHS recombinante de la presente invención es un genoma de VHS de origen no natural que se produce mediante métodos que se describen en otra parte del presente documento. Un VHS recombinante de la presente invención es un VHS que comprende un genoma de VHS recombinante de la invención.

En el genoma del VHS-1, el gen UL53 codifica la glucoproteína K (gK) y el gen UL20 codifica la proteína UL20. Tanto la gK como la proteína UL20 son proteínas de membrana y se sabe que forman un complejo que interactúa con la glucoproteína B (gB), otra proteína de membrana codificada por VHS-1. Se sabe que las regiones amino terminales tanto de gK como de la proteína UL20 interactúan con gB y que estas interacciones modulan la fusión celular inducida por virus mediada por el complejo proteico gK/UL20. Para la presente invención, las modificaciones en los genes UL53 y UL20 son deleciones de nucleótidos, que provocan deleciones de aminoácidos en las proteínas codificadas por ellos. En realizaciones preferidas de la invención, las vacunas comprenden VHS vivos, atenuados, recombinantes.

Aunque la presente invención no depende de un mecanismo biológico particular, se cree que las deleciones de aminoácidos en las regiones amino terminales de la gK y la proteína UL20 que se describen a continuación interrumpen o afectan negativamente de otro modo la interacción del complejo proteico gK/UL20 de tipo silvestre con gB de tipo silvestre. En una realización de la invención que implica modificaciones en el genoma de la cepa F de VHS-1, ("VHS-1(F)"), la modificación en el gen UL53 (SEQ ID NO: 3) es una deleción de nucleótidos, que corresponde a una deleción de los nucleótidos 112160 a 112274 en el genoma de VHS-1 (F) y que da como resultado la deleción de los aminoácidos 31 a 68 (SEQ ID NO: 4) en la región amino terminal de gK y la modificación el gen UL20 (SEQ ID NO: 1) es una deleción de los nucleótidos 10 a 66, que corresponde a una deleción de los nucleótidos 41339 a 41395 en el genoma de VHS-1 (F), respectivamente, y que da como resultado la deleción de los aminoácidos 4 a 22 (SEQ ID NO: 2) en la región amino terminal de la proteína UL20.

Un genoma de VHS recombinante preferido de la presente invención es el genoma VC2. El genoma VC2, que deriva del genoma de VHS-1(F), comprende la deleción de los nucleótidos 112160 a 112274 del genoma de VHS-1(F), que da como resultado la deleción de los aminoácidos 31 a 68 en la región amino terminal de gK y la deleción de los nucleótidos 41339 a 41395 del genoma de VHS-1, lo que da como resultado la deleción de los aminoácidos 4-22 en la región amino terminal de la proteína UL20. Un virus que comprende el genoma de VC2 se denomina en el presente documento "VC2" o un "virus VC2". Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a los genes UL20 y UL53 de VC2 se establecen en las SEQ ID NO: 1-4.

Se sabe que las proteínas gK y UL20 de VHS-2 tienen un alto grado de identidad y estructuras tridimensionales predichas en global idénticas a, las correspondientes proteínas gK y UL20 de VHS-1. Por otra parte, se sabe que la deleción de gK Δ 31-68 abarca un dominio de lámina β en el extremo amino terminal de gK que se conserva entre VHS-1 y VHS-2. Por lo tanto, se espera que deleciones similares en las proteínas gK y UL20 de VHS-2 funcionen igual que las deleciones en las proteínas gK y UL20 de VHS-1. De esta manera, la presente invención abarca las mismas modificaciones en las proteínas gK y UL20 de VHS-2 que se describieron anteriormente para las proteínas gK y UL20 de VHS-1.

En una realización de la invención que implica modificaciones en el genoma de VHS-2, la modificación en el gen UL53 es una deleción que da como resultado la deleción de los aminoácidos 31 a 68 (SEQ ID NO: 10) en la región amino terminal de gK y la modificación del gen UL20 es una deleción que da como resultado la deleción de aminoácidos 4 a 22 (SEQ ID NO: 9) en la región amino terminal de la proteína UL20.

La presente invención implica realizar las modificaciones descritas anteriormente en un genoma de VHS, para producir un genoma de VHS recombinante. Preferentemente, el genoma de VHS que se modifica es un genoma de VHS-1 o VHS-2. Más preferentemente, el genoma de VHS que se modifica es un genoma de VHS-1. Lo más preferentemente, el genoma de VHS que se modifica es un genoma de VHS-1(F). Las modificaciones pueden realizarse mediante uno o más de los métodos conocidos en la técnica para modificar una molécula de ácido nucleico que incluyen, por ejemplo, digestión de endonucleasa de restricción, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mutagénesis dirigida, ligamiento, síntesis química de ADN y similares. También puede hacerse referencia a un VHS recombinante de la presente invención que se produce modificando un genoma de VHS particular estando derivado de ese genoma de VHS particular. Normalmente, el genoma del VHS que se modifica mediante los métodos de la presente invención

es un genoma del VHS de origen natural o de tipo silvestre. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el genoma del VHS que se modifica mediante los métodos de la presente invención se ha modificado previamente mediante intervención humana que implica el uso de, por ejemplo, métodos de ADN recombinante o métodos de mutagénesis que implican mutágenos tales como, por ejemplo, mutágenos químicos y radiación.

5 La presente invención proporciona además los genomas de VHS recombinantes y los virus de VHS recombinantes descritos anteriormente, así como composiciones inmunogénicas que comprenden al menos un genoma de VHS recombinante de la presente invención. En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenden un genoma de VHS recombinante que está contenido en un virus de VHS recombinante. En otras realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenden un genoma de VHS recombinante que no está contenido en un virus de VHS recombinante.

10 Las vacunas y otras composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender un VHS recombinante vivo y/o un VHS recombinante inactivado. Preferentemente, las vacunas de la presente invención comprenden un VHS vivo, atenuado recombinante.

15 Las vacunas y composiciones inmunogénicas pueden comprender además uno o más componentes farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero no limitado a, un vehículo, un excipiente, un agente estabilizante, un conservante, un inmunoestimulante y un adyuvante. Cada uno de los componentes farmacéuticamente aceptables está presente en las vacunas y composiciones inmunogénicas en una cantidad farmacéuticamente aceptable. Dicha cantidad farmacéuticamente aceptable es una cantidad que es suficiente para producir el resultado deseado (por ejemplo, la cantidad de estabilizador suficiente para estabilizar la vacuna después de la preparación y hasta la administración) pero se considera segura para la administración a un animal, particularmente un ser humano.

20 También se describen en el presente documento métodos para inmunizar a un paciente contra una infección por VHS que comprenden la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna de la presente invención. Preferentemente, el paciente es un animal. Más preferentemente, el paciente es un ser humano.

25 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración dados. En aspectos particulares de la invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una vacuna u otra composición inmunogénica de la invención que, cuando se administra a un animal, produce una respuesta terapéutica positiva con respecto a la prevención o el tratamiento del animal para una infección por VHS. Una respuesta terapéutica positiva con respecto a la prevención de una infección por VHS incluye, por ejemplo, la producción de anticuerpos del VHS por el animal en una cantidad suficiente para proteger contra el desarrollo de la enfermedad provocada por el VHS. Similarmente, una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de una infección por VHS incluye curar o mejorar los síntomas de la enfermedad. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para significar una cantidad suficiente para producir una mejora en una afección clínicamente significativa en un animal, particularmente un ser humano.

30 En algunos métodos descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna de la invención se administra al paciente en una sola dosis. En otras realizaciones, la vacuna se administra al paciente en múltiples dosis. Se reconoce que la cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna de la invención puede variar dependiendo del régimen de dosificación e incluso puede variar de una administración a la siguiente en regímenes de dosificación múltiples.

35 La presente invención proporciona adicionalmente métodos para producir un VHS recombinante. Los métodos comprenden transfectar una célula hospedadora con el genoma del VHS recombinante de la presente invención e incubar la célula hospedadora transfectada en condiciones favorables para la formación de un virus del VHS recombinante que comprende el genoma del VHS recombinante, por lo que se produce un VHS recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula animal y puede ser una célula hospedadora contenida en un animal o una célula animal cultivada *in vitro* incluyendo, por ejemplo, una célula humana cultivada *in vitro*. Las condiciones bajo las cuales se incuba la célula hospedadora transfectada dependerán de una serie de factores que incluyen, pero no limitado a, la célula hospedadora particular, la cantidad del genoma del VHS recombinante que se transfecta en la célula hospedadora y el VHS particular que se produce a partir del genoma del VHS recombinante. Se reconoce que los expertos en la materia pueden determinar empíricamente las condiciones óptimas para producir un VHS recombinante de la presente invención en una célula hospedadora transfectada mediante métodos descritos en otra parte del presente documento o conocidos de otro modo en la técnica. Los métodos pueden comprender además la etapa opcional de purificar el virus VHS recombinante separando el VHS recombinante de los componentes celulares de la célula hospedadora usando métodos convencionales que son conocidos en la técnica. En una realización preferida, el VHS recombinante comprende un genoma de VHS recombinante que comprende la delección de los nucleótidos 41339 a 41395 y 112160 a 112274 del genoma de VHS-1(F) (N.º de registro de GenBank GU734771.1). Dicho genoma de VHS recombinante codifica tanto una gK modificada en donde los aminoácidos 31 a 68 en la región amino terminal de gK de VHS-1(F) han sido eliminados como una proteína UL20 modificada en donde los aminoácidos 4-22 en la región amino terminal han sido eliminados de la proteína UL20 de VHS-1(F). Las secuencias de aminoácidos de la proteína UL20 modificada y la gK modificada se establecen en las SEQ ID NO: 6 y

8, respectivamente. Los ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican la proteína UL20 modificada y la gK modificada se establecen en las SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente. El genoma de VC2 de la invención comprende las secuencias de nucleótidos de los genes UL20 y UL58 modificados establecidos en las SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente.

5 Se proporcionan además métodos para producir una vacuna o composición inmunogénica. Los métodos implican producir el VHS recombinante esencialmente como se describió anteriormente. En particular, los métodos para producir una vacuna o composición inmunogénica comprenden transfectar una célula hospedadora con el genoma del VHS recombinante de la invención, incubar la célula hospedadora transfectada en condiciones favorables para la
10 formación de un virus VHS recombinante que comprende el genoma del VHS recombinante, purificar el virus del VHS recombinante que comprende el genoma del VHS recombinante y, opcionalmente, combinar el virus VHS recombinante purificado con al menos un componente farmacéuticamente aceptable.

15 Debido a que se sabe que el genoma del VHS puede acomodar ADN adicional y aún así formar virus cuando se transfecta a una célula hospedadora, las composiciones y métodos de la presente invención también encuentran uso en el tratamiento y prevención de enfermedades que están provocadas por otros patógenos víricos y bacterianos. En determinadas realizaciones de la invención, se añaden uno o más genes que codifican un antígeno proteico de otro patógeno vírico y/o bacteriano a un VHS recombinante de la presente invención. La transfección de dicho genoma de VHS recombinante en una célula hospedadora y la incubación de la célula hospedadora transfectada en condiciones
20 favorables para la formación de un virus de VHS recombinante da como resultado la producción del antígeno o antígenos en la célula hospedadora, por lo que se provoca una respuesta inmunitaria en la célula hospedadora. De esta manera, puede usarse un genoma de VHS recombinante de la presente invención como vector para la expresión de otros patógenos víricos y bacterianos. En una realización de la invención, el genoma del VHS recombinante es el genoma de VC2 descrito anteriormente y comprende además un gen adicional, preferentemente un gen adicional que codifique un antígeno, particularmente un antígeno extraño. Se espera que los antígenos extraños expresados en una
25 célula hospedadora del genoma VC2 proporcionen un fuerte efecto adyuvante que provoque la generación de respuestas inmunitarias adaptativas protectoras contra patógenos transmitidos por las mucosas tales como el VIH y *Chlamydia trachomatis*. A menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto de uso, un antígeno extraño para la presente invención es un antígeno que no está codificado por un genoma de la célula hospedadora.

30 Las vacunas y otras composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender uno o más componentes farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero no limitado a, un vehículo, un excipiente, un agente estabilizante, un conservante, un inmunoestimulante y un adyuvante. En general, un componente farmacéuticamente aceptable no induce por sí mismo la producción de una respuesta inmunitaria en el animal que recibe el componente y puede administrarse sin una toxicidad indebida en la composición de la presente invención. Como se usa en el
35 presente documento, la frase "farmacéuticamente aceptable" significa ser aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de EE.UU., la Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en vertebrados, y más particularmente en seres humanos. Estas composiciones pueden ser útiles como vacuna y/o composiciones antigénicas para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

Los vehículos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril y combinaciones de los mismos. Se presenta un análisis exhaustivo de vehículos, diluyentes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.
45 Co. N.J. edición actual), incorporado en el presente documento en su totalidad como referencia. La formulación debe adecuarse al modo de administración. En una realización preferida, la formulación es adecuada para la administración a seres humanos, preferentemente es estéril, no particulada y/o pirogénica.

50 Algunos ejemplos de agentes estabilizantes, inmunoestimulantes y adyuvantes incluyen alumbre, adyuvante incompleto de Freud, MR-59 (Chiron), tripéptido de muramilo fosfatidiletanolamida y monofosforil lípido A. Los conservantes incluyen, por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico y parabenos. Dichos agentes estabilizantes, adyuvantes, inmunoestimulantes y conservantes son bien conocidos en la técnica y pueden usarse solos o en combinación.

55 Los componentes farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una forma sólida, tales como un polvo liofilizado adecuado para reconstitución, una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares.
60

Ciertos métodos de la divulgación implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna u otra composición inmunogénica a un paciente. Los métodos de la presente invención no dependen de un método particular de administración de la vacuna u otra composición inmunogénica al paciente. Por ejemplo, la vacuna u otra
65 composición inmunogénica puede administrarse por vía oral, por vía intradérmica, por vía intranasal, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía subcutánea usando métodos de rutina conocidos

en la técnica o desvelados en otra parte del presente documento.

Los genomas de VHS recombinante de la presente invención comprenden secuencias de nucleótidos que se modifican mediante métodos desvelados en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica para producir un genoma de VHS recombinante. En una realización de la invención, el genoma del VHS recombinante comprende: (a) los genes UL20 y UL53 modificados establecidos en las SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína UL20 modificada y la gK modificada que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente, o (c) una secuencia de nucleótidos variante que comprende al menos una modificación en cada uno de los genes UL53 y UL20, en donde un virus que comprende el genoma del VHS recombinante es capaz de replicarse en una célula hospedadora y es incapaz de entrar en los compartimentos axonales de las neuronas. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, genomas de VHS recombinantes que derivan del genoma de VHS-1(F), otra cepa de VHS-1 o una cepa de VHS-2. Preferentemente, los genes UL20 y UL53 de tales variantes codifican proteínas UL20 y gK que tienen al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de longitud completa establecidas en las SEQ ID NO: 6 y 8, respectivamente.

La presente divulgación abarca composiciones de polinucleótido aislado o sustancialmente purificado (también denominado en el presente documento "molécula de ácido nucleico", de "ácido nucleico" y similares) o de proteína (también denominada en el presente documento "polipéptido"). Un polinucleótido o proteína "aislados" o "purificados", o una parte biológicamente activa de los mismos, está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína que se encuentran en su entorno natural. De esta manera, un polinucleótido o proteína aislados o purificados están sustancialmente libres de otro material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes o están sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. De manera óptima, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias (secuencias que codifican proteínas de manera óptima) que flanquean de forma natural el polinucleótido (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el polinucleótido. Por ejemplo, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia de nucleótidos que flanquean de forma natural el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 % o el 1 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la divulgación o una parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, de forma óptima el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 % o el 1 % (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos que no son proteínas de interés.

"Variantes" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Para los polinucleótidos, una variante comprende un polinucleótido que tiene deleciones (es decir, truncamientos) en el extremo 5' y/o 3'; deleción y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos en el polinucleótido nativo; y/o sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Generalmente, las variantes de un genoma de VHS recombinante particular de la invención tendrán al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de secuencia con el genoma del VHS recombinante como se determina por alineación de secuencias.

Proteína "variante" pretende significar una proteína derivada de la proteína nativa por deleción (denominada truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al N terminal y/o al C terminal de la proteína nativa; deleción y/o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína nativa; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, el polimorfismo genético o de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una proteína tendrán al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos para la proteína nativa según se determinó mediante los programas y parámetros de alineación de la secuencia descritos en otra parte en el presente documento. Una variante biológicamente activa de una proteína de la invención puede diferir de esta proteína en tan solo 1-15 restos de aminoácidos, tan solo 1-10, tal como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido.

Las proteínas de la descripción pueden alterarse de diversas formas incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Son bien conocidos en la técnica métodos para mutagénesis y alteraciones de polinucleótido. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; Patente de EE.UU. N.º 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citados en los mismos. Pueden encontrarse directrices en lo que respecta a lo adecuado de las sustituciones de aminoácidos que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido con otro que tenga propiedades

similares, pueden ser óptimas.

Las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias de proteínas abarcadas en el presente documento no se espera que produzcan cambios radicales en las características de la proteína excepto por los cambios que se desvelan en el presente documento. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción, o inserción por adelantado antes de hacerlo, un experto en la materia apreciará que se evaluará el efecto mediante ensayos de cribado rutinarios. Esto es, la actividad puede evaluarse mediante ensayos que se desvelan a continuación en el presente documento.

Los polinucleótidos y proteínas variantes abarcan también secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y recombinogénico tales como la transposición del ADN. Se conocen en la técnica estrategias para dicha transposición de ADN. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore *et al.* (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer *et al.* (1998) Nature 391:288-291; y las Patentes de EE. UU. N.º 5.605.793 y 5.837.458.

Pueden usarse métodos de amplificación por PCR en la fabricación de los genomas de VHS recombinantes de la presente invención. Se conocen generalmente en la técnica métodos para diseñar cebadores de PCR y de clonación de PCR y se desvelan en Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véanse también Innis *et al.*, eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, Nueva York). Los métodos de PCR conocidos incluyen, pero no se limitan a, métodos que usan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos para genes, cebadores específicos para vectores, cebadores parcialmente desemparejados y similares.

Se reconoce que los genomas de VHS recombinantes de la presente invención abarcan otras moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que es suficientemente idéntica a una secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento. La frase "suficientemente idéntico" se usa en el presente documento para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente o mínimo de restos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar) a un segundo aminoácido o secuencia de nucleótidos de manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tengan un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos o nucleótidos que contienen un dominio estructural común que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad, preferentemente o el 85 % de identidad, más preferentemente el 90 % o el 95 % de identidad, lo más preferentemente el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad, se definen en el presente documento como suficientemente idénticos.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas a continuación, permitiendo o no huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, normalmente se cuentan las coincidencias exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul. *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de polinucleótido de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) anteriormente. Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). LAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, XBLAST y NBLAST están disponibles en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Tal algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. El alineamiento también puede llevarse a cabo manualmente mediante inspección.

A menos que se indique otra cosa, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido usando las secuencias de longitud completa de la invención usando BLAST con los parámetros por defecto; o cualquier programa equivalente de los mismos. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene emparejamientos de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con la alineación correspondiente generada por BLAST usando parámetros por defecto.

Como se usa en el presente documento, la frase "unido operativamente" se entiende que significa un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, una unión operativa entre un polinucleótido o gen de interés y una secuencia reguladora (es decir, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión del polinucleótido de interés. Los elementos unidos operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usa para hacer referencia a la unión de dos regiones codificantes de proteínas, por unido operativamente se entiende que las regiones codificantes están en el mismo marco de lectura.

Como se usa en el presente documento a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto de uso, una célula hospedadora es una célula animal, preferentemente una célula de mamífero, más preferentemente una célula humana. Similarmente, un hospedador u organismo hospedador es un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Desarrollo de una vacuna contra el virus del herpes simple atenuado

Anteriormente, se demostró que un virus gK-anulado no podía infectar neuronas ganglionares y establecer latencia después de la infección ocular de ratones (David *et al.* (2008) *Curr. Eye Res.* 33:455-467; David *et al.* (2012) *MBio* 3:e00144-00112). Además, se demostró que la vacunación intramuscular de ratones con el virus atenuado gK-anulado confirió respuestas inmunitarias celulares significativas y protección contra la exposición intravaginal de ratones con virus VHS-1(McKrae) o VHS-2(G) virulentos (Iyer *et al.* (2013) *Viol. J.* 10:317). Para seguir mejorando en este enfoque de vacunación, se construyó el virus mutante VC2 de la presente invención. El virus de la mutación VC2 tiene deleciones específicas dentro de los genes que codifican la glucoproteína K (gK) y UL20. El virus VC2 contiene la mutación gKΔ31-68 que evita que el virus infecte neuronas ganglionares después de una infección ocular en ratones (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603). En contraste con el virus gK-anulado que requiere replicación en la línea celular complementaria VK302 que expresa gK, el virus VC2 puede replicarse eficientemente en células Vero infectadas logrando títulos similares a los del virus parental HSV-1(F) de tipo silvestre en cultivo celular (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603). La inyección intramuscular de ratones con 10^7 unidades formadoras de placa VC2 no causó ninguna enfermedad clínica significativa en los ratones. Una sola vacunación intramuscular con el virus VC2 fue muy bien tolerada a una alta dosis infecciosa (10^7 UFP) produjo una sólida respuesta inmunitaria humoral y mediada por células y confirió una inmunidad estéril del 100 % contra la exposición intravaginal letal con los virus VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G). La vacuna del virus VC2 provoca fuertes respuestas inmunitarias humorales y celulares capaces de conferir inmunidad estéril a ratones infectados por vía vaginal.

Construcción y caracterización del virus de la vacuna VC2

El virus recombinante VC2 se construyó utilizando el protocolo de recombinación Rojo doble de dos etapas (Tischer *et al.* (2006) *Biotechniques* 40:191-197) implementado en el genoma clonado de VHS-1(F) en un plásmido de cromosoma artificial bacteriano (BAC) (Tanaka *et al.* (2003) *J. Virol* 77:1382-1391) como se describió anteriormente (Chouljenko *et al.* (2009) *J. Virol* 83:12301-12313; Lee *et al.* (2009) *J. Virol* 83:6115-6124) y se detalla en la sección de Materiales y Métodos a continuación. El virus VC2 contiene la deleción gKΔ31-68 (38 aa; gK aa 31-68) en el extremo amino de gK que evita que el virus entre en las neuronas ganglionares después de la infección a través de la vía ocular (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603), así como una deleción de los 19 aminoácidos amino-terminales del virus UL20 (FIGURA 1A). Se realizó la secuenciación del genoma completo de próxima generación para validar que solo se indujeron las mutaciones deseadas en el VHS-1(F) BAG. Una salida de secuencia total de calidad Q20 que deriva de las puntuaciones de calidad por base predichas y corresponde a una tasa de error del 1 % genera una cobertura de 2666 y 4436 para las dos muestras de réplicas biológicas secuenciadas. Un total de 37 cambios de nt y 13 de los que provocan diferencias de aa se detectaron en comparación con la presentación del Gene Bank GU 734771 del virus del herpes simple humano tipo 1 (cepa F, genoma completo), como se informó anteriormente para otros virus mutantes VHS-1(F) BAG (Kim *et al.* (2013) *J. Virol.* 87: 8029-8037). De forma global, no hubo cambios de nucleótidos entre el VHS-1(F) BAG parental y el virus mutante VG2 derivado con la excepción de las deleciones diseñadas dentro de los genes UL20 y gK.

Se ha demostrado previamente que los extremos amino de gK y UL20 interactúan con gB y que estas interacciones modulan la fusión celular inducida por virus mediada por el complejo proteico gK/UL20 (Chouljenko *et al.* (2009) *J. Virol* 83:12301-12313; Chouljenko *et al.* (2010) *J. Virol* 84:8596-8606; Foster *et al.* (2008) *J. Virol* 82:6310-6323)

(FIGURA 1B). La mutación UL20Δ4-22 no afecta la replicación del virus, aunque produce un fenotipo sincicial (no mostrado). Sin embargo, la presencia simultánea de las deleciones gKΔ31-68 y UL20Δ4-22 produce un fenotipo de placa no sincicial, que eran de un tamaño un 30-40 % más pequeño que el virus parental (FIGURA 2A). El virus VC2 se replicó tan eficientemente como el virus VHS-1(F) BAC de tipo silvestre parental con una multiplicidad de infección (MOI) de 5. A MOI baja (0,1), VC2 se replicó con cinéticas más lentas, pero alcanzó títulos de virus pico similares a las 36 hpi (FIGURA 2B). Los virus VC2 y VHS-1(F) BAC exhibieron eficiencias de entrada similares en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan los receptores de VHS-1 Nectina-1 y HVEM (Figura 2C). Tanto el VHS-1(F) como el VC2 no lograron entrar en células CHO que expresaban el receptor de inmunoglobulina α emparejado (PILR α), como se informó anteriormente para VHS-1(F) en comparación con VHS-1 (McKrae) (Chowdhury *et al.* (2013) J. Virol 87:3305-3313).

Vacunación y exposición intravaginal de ratones vacunados con VC2 con los virus VHS-1 (McKrae) y VHS-2 (G)

Los experimentos de seguridad iniciales indicaron que el virus VC2 no produjo síntomas clínicos significativos de enfermedad después de la inyección intranasal o intramuscular de casi 10^7 UFP por ratón, y no se detectó ADN vírico mediante PCR en los ganglios dorsal o trigémino de estos ratones (no se muestra). La estrategia de vacuna implicó la inyección intramuscular de 10^7 UFP del virus VC2 en cada ratón seguido de tratamiento de ratones el día 15 después de la vacunación mediante inyección intramuscular de Depo Provera, como se describió anteriormente (Iyer *et al.* (2013) Virol. J. 10:317) y exposición intravaginal con 10^6 UFP de cepas víricas de VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G) el día 21 después de la vacunación. Los ratones vacunados con VC2 se monitorizaron para detectar síntomas clínicos de la enfermedad y también se monitorizaron diariamente los pesos corporales. No se observaron síntomas clínicos significativos de la enfermedad durante el período de observación de 15 días. También, no se observaron diferencias significativas en los pesos corporales de los animales vacunados frente a los animales vacunados de forma simulada excepto el día 14 después de la vacunación ($p < 0,05$) (FIGURA 3A). Después de la exposición vaginal con VHS-1(McKrae) o VHS-2(G), los ratones infectados se observaron diariamente para detectar manifestaciones de la enfermedad. Durante los quince días siguientes al desafío, se registraron las puntuaciones clínicas y la medición del peso de todos los ratones vivos. Los animales vacunados de forma simulada mostraron un pronunciado, aumento dependiente del tiempo de los síntomas clínicos de la enfermedad y una disminución concomitante significativa de peso el día 5 después de la exposición (FIGURA 3: B, C). El análisis de las puntuaciones clínicas con los cambios correspondientes en los pesos de los ratones no vacunados reveló una fuerte correlación entre las puntuaciones clínicas crecientes y los pesos corporales decrecientes (FIGURA 3D). Este análisis de correlación reveló que la diferencia observada en los animales vacunados frente a los animales vacunados de forma simulada el día 10 después de la vacunación no era indicativa de una morbilidad general significativa. Los síntomas de la enfermedad en los casos más leves consistieron principalmente en pérdida de cabello, postura encorvada y arrugamiento de la piel (no se muestra). Los síntomas de la enfermedad más avanzados incluían eritema y edema vaginal y perianal significativos y secreción purulenta (FIGURA 4). Como se señaló anteriormente (Iyer *et al.* (2013) Virol. J. 10:317), VHS-1(McKrae) provocó una enfermedad clínica significativa que se aproximaba a la observada en las infecciones por VHS-2 (G) (FIGURA 4).

Los ratones vacunados fueron completamente protegidos contra una exposición letal. Los ratones del grupo de vacunación simulada comenzaron a morir el día 6 para el grupo expuesto a VHS-1 y el día 7 en el grupo expuesto a VHS-2. En ambos grupos de ratones, expuestos a VHS-1 o VHS-2, la protección frente a la exposición letal fue significativamente mayor en los animales vacunados que en los vacunados de forma simulada ($p < 0,0001$) (FIGURA 5). Se evaluó el desprendimiento vaginal durante 4 días después de la exposición. Se observaron reducciones significativas en la diseminación del virus todos los días posteriores a la exposición al VHS-1 (días 1, 2: $p = 0,0002$; día 3: $p = 0,008$; día 4: $p = 0,0244$); y grupo de ratones VHS-2 (día 1: $p = 0,0014$; días, 3-4: $p < 0,0001$). En ambos casos, los animales vacunados no desprendieron ningún virus después del día 4 después de la exposición. De forma global, se recuperaron títulos víricos más bajos de las vaginas del VHS-2 que de los ratones expuestos al VHS-1 (FIGURA 6: A, B).

Para determinar si el VHS-1(McKrae) o el VHS-2(G) pudieron infectar las neuronas de la raíz ganglionar o dorsal y establecer una infección latente, los ratones expuestos se inmunocomprometieron mediante la inyección de ciclofosfamida seguida de la inyección de dexametasona a los 100 días tras la exposición. No se recuperó ningún virus infeccioso de los frotis vaginales de ratones vacunados tratados con ciclofosfamida y dexametasona, que se sabe que induce químicamente la reactivación del virus de la latencia (Cook *et al.* (1991) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:1558-1561). Similarmente, no se detectó ADN vírico para VHS-1(McKrae) o VHS-2(G) en los tejidos neuronales extraídos mediante PCR cuantitativa específica del tipo de virus (qPCR) para los ratones vacunados; sin embargo, los tejidos de animales vacunados de forma simulada revelaron la presencia de ADN vírico de VHS-1(McKrae) o VHS-2(G) en los respectivos grupos de animales (Tabla 1).

Tabla 1. qPCR¹ de los ganglios de la raíz dorsal de animales vacunados

Exposición a VHS-1	VHS-1 gD	VHS-2 gD	Exposición a VHS-2	VHS-1 gD	VHS-2 gD
Control positivo	-1	-	Control positivo	-	-2
161	-	-	171	-	-
162	-	-	172	-	-
163	-	-	173	-	-

Exposición a VHS-1	VHS-1 gD	VHS-2 gD	Exposición a VHS-2	VHS-1 gD	VHS-2 gD
164	-	-	174	-	-
165	-	-	175	-	-
166	-	-	176	-	-
167	-	-	177	-	-
168	-	-	178	-	-
169	-	-	179	-	-
170	-	-	180	-	-

¹La qPCR resulta de los ganglios de la raíz dorsal sacra extirpados de ratones vacunados expuestos a VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G). Los controles positivos fueron ganglios de la raíz dorsal sacra extirpados de ratones no vacunados expuestos a VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G). Las muestras por debajo del límite de detección se designan como ND. Los ensayos de qPCR específicos para el ADN vírico de VHS-1 y VHS-2 detectaron tan solo 3 copias de ADN vírico/J.L (véase Materiales y Métodos).

Respuestas inmunitarias humorales y celulares inducidas por VC2

- 5 Para evaluar los niveles relativos de anticuerpos específicos de VHS-1 producidos por la vacunación VC2, se utilizó un ELISA disponible en el mercado para medir la cantidad relativa de IgG específica de VHS. En este ELISA, las placas se recubrieron con extractos de células infectadas con VHS-1 y los anticuerpos unidos a VHS-1 se cuantificaron por colorimetría (véase Materiales y Métodos). Todos los ratones vacunados con VC2 produjeron anticuerpos específicos contra el VHS-1, mientras que ninguno de los animales vacunados de forma simulada produjo anticuerpos anti-VHS detectables (FIGURA 7A). Se ensayó la capacidad de los anticuerpos inducidos por VC-2 para neutralizar el virus VHS-1(McKrae). Los antisueros de cinco ratones vacunados y vacunados de forma simulada se probaron individualmente en diluciones seriadas para determinar su capacidad para neutralizar el virus, como se describe en Materiales y Métodos. Se observó una neutralización sustancial de VHS-1(McKrae) a diluciones 1:160, 1:80, 1:40 y 1:20 de cada suero de ratón (FIGURA 7B). Para investigar más a fondo las actividades de neutralización de estos sueros, se eligió la dilución 1:20 para probar la capacidad de neutralizar tanto VHS-1(McKrae) como VHS-2(G). Se observaron diferencias significativas entre la neutralización de VHS-1(McKrae) y VHS-2(G) por sueros de animales vacunados contra VHS-1 (VC2) en comparación con los ratones vacunados de forma simulada, así como entre animales vacunados contra VHS-1(McKrae) y VHS-2(G). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos vacunados de forma simulada (FIGURA 7C).
- 10
- 15
- 20 Para probar la generación de respuestas inmunitarias celulares específicas de VC2, se utilizó un ensayo de marcaje de membrana CFSE para detectar la proliferación celular de células T CD4+ y CD8+ en presencia de un conjunto de péptidos específicos que representan epítomos T CD4+ y CD8+ conocidos o predichos (Tabla 2). Los esplenocitos de ratones vacunados produjeron proliferación de células T CD8+ y CD4+, mientras que los linfocitos de ratones vacunados de forma simulada no respondieron a los estímulos peptídicos combinados (FIGURA 8A). Se realizó un análisis adicional determinando los niveles relativos de citocinas Th1/Th2 en respuesta al conjunto de péptidos. Se observó la inducción significativa de IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-5, mientras que la IL-2 no se indujo significativamente en los ratones vacunados frente a los vacunados de forma simulada (FIGURAS 8B-8F).
- 25

Tabla 2. Péptidos usados en conjuntos para ensayos de estimulación de esplenocitos

Virus	Glucoproteína	Locus	Aminoácidos	Referencia
VHS-1	gD	70-78	SLPITVYYA (SEQ ID NO: 11)	J. Immunol. 2010; 184: 2561-71
VHS-2	gD	77-85	SIPITVYYA (SEQ ID NO: 12)	NA
VHS-1	gD	270-287	YTSTLLPPELSETPN (SEQ ID NO: 13)	NA
VHS-2	gD	270-287	YTSTLLPPELSDTTN (SEQ ID NO: 14)	Cell Immunol. 2006; 239: 113-20
VHS-1	gD	278-286	ALLEDPVGT (SEQ ID NO: 15)	J. Immunol. 2010; 184: 2561-71
VHS-2	gD	250-258	ALLEDPAGT (SEQ ID NO: 16)	NA
VHS-1	gB	566-580	HVNDMLGRIAVAWCE (SEQ ID NO: 17)	Vaccine 2011; 29:7058-66
VHS-1/VHS-2	gB	161-176	ATMYKDVTVSQVWF (SEQ ID NO: 18)	J. Immunol. 2010; 184: 2561-71

VHS-1/VHS-2	gB	499-506	SSIEFARL (SEQ ID NO: 19)	J. Immunol. 2011; 186: 3927-3933
-------------	----	---------	--------------------------	-------------------------------------

Análisis

Debido a que se sabía que la gK es necesaria para la infección de las neuronas ganglionares después de la infección ocular, se investigó el uso de un virus gK-anulado como posible vacuna para la infección genital por VHS-1 y VHS-2. Este trabajo inicial demostró que la vacunación con gK-anulado producía fuertes respuestas inmunitarias celulares eficaces y proporcionaba una protección significativa en ratones (Iyer *et al.* (2013) *Viol. J.* 10:317). Sin embargo, la replicación del virus gK-anulado requiere el uso de una línea celular complementaria, impactando negativamente la posibilidad de que este virus pueda producirse para uso humano. Por el contrario, el virus diseñado VC2 puede replicarse eficientemente en cultivos celulares convencionales, mientras retiene las características avirulentas *in vivo* del virus gK-anulado. El virus VC2 fue altamente inmunogénico y confirió inmunidad estéril a los ratones vacunados contra la exposición intravaginal letal con cepas de VHS-1 y VHS-2 altamente virulentas.

Construcción del virus VC2

Se informó previamente que gK forma un complejo proteico funcional con la proteína de membrana UL20 que se requiere para su transporte intracelular, expresión de la superficie celular y capacidad para modular la fusión de membranas mediada por gB (Foster *et al.* (2008) *J. Virol* 82:6310-6323; Foster *et al.* (2004) *J. Virol* 78:13262-13277). La modulación de las propiedades fusogénicas de gB está mediada por interacciones proteína-proteína directas entre los extremos amino de gK y gB, así como entre el extremo carboxilo de gB y el extremo amino de UL20 (Chouljenko *et al.* (2009) *J. Virol* 83:12301-12313; Chouljenko *et al.* (2010) *J. Virol* 84:8596-8606). El virus VC2 se construyó basándose en la hipótesis de que la interrupción de la interacción gK/UL20 con gB conducirá a una atenuación vírica. Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que la delección de 38 aa del extremo amino de gK impidió que el virus infectara neuronas ganglionares después de la infección ocular de ratones. Las delecciones en serie de los aminoácidos 4-22, 4-27, 4-47 y 4-48 del extremo amino de la proteína UL20 han revelado que los aminoácidos 4-27 son prescindibles para la replicación del virus en cultivo celular produciendo la delección 4-22 títulos de virus similares a los del virus parental VHS-1(F). Por lo tanto, la delección 4-22 UL20 se diseñó en el virus VC2 para proporcionar una característica de seguridad adicional debido a que el rescate del virus VC2 por un genoma de tipo silvestre *in vivo* requeriría que se produjera un evento de rescate de recombinación doble. Por otra parte, la interrupción del extremo amino UL20 proporcionaría una desregulación adicional de las funciones de gB, como lo demuestra el hecho de que el virus mutante UL20Δ4-22 provocó la fusión celular inducida por virus en cultivo celular (no mostrado). Sin embargo, la incorporación de la mutación gKΔ31-68 eliminó la fusión celular inducida por UL20Δ4-22 proporcionando apoyo adicional para la hipótesis de largo tiempo de que UL20 y gK cooperan para regular las propiedades fusogénicas de gB principalmente a través de interacciones de los extremos amino de gK y gB (Chouljenko *et al.* (2009) *J. Virol* 83:12301-12313; Chouljenko *et al.* (2010) *J. Virol* 84:8596-8606). Como era de esperar, el virus VC2 se replicó de manera eficiente en células Vero en comparación con su virus parental VHS-1(F), mientras que produjo placas víricas más pequeñas en promedio como se ha demostrado anteriormente para la mutación gKΔ31-68 en los antecedentes genéticos de VHS-1(F) y VHS-1(McKrae) (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603; Chouljenko *et al.* (2009) *J. Virol* 83:12301-12313). También, el virus VC2 utilizó eficientemente los receptores nectina-1 y HVEM para la entrada del virus, excepto el receptor PILRreceptor, como se mostró anteriormente para el virus VHS-1(F) (Chowdhury *et al.* (2013) *J. Virol* 87:3305-3313).

Experimentos de vacunación

Anteriormente se demostró que VHS-1(F) BAC no provoca síntomas sustanciales de enfermedad después de la infección ocular de ratones, en contraste con la cepa altamente virulenta VHS-1(McKrae), aunque ambos virus se transmiten fácilmente a las neuronas ganglionares y establecen latencia (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603; Kim *et al.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:1169-77). De acuerdo con estos resultados informados anteriormente, los experimentos de seguridad realizados por infección intranasal con 10^6 UFP de los virus VHS-1(F) BAC o VC2 no revelaron síntomas clínicos aparentes y ausencia de genomas virales detectables en los ganglios del trigémino. Similarmente, las dosis infecciosas de hasta 10^7 UFP de VHS-1(F) BAC o VC2 administradas por vía intramuscular no produjeron ningún síntoma clínico significativo de enfermedad y no se detectó ADN vírico en los ganglios de la raíz dorsal o del trigémino de los ratones infectados.

La glucoproteína K se ha asociado a un aumento de la virulencia y la inmunopatogénesis. Específicamente, la infección ocular de ratones previamente vacunados con gK exacerbó la inmunopatogénesis corneal, mientras que un virus VHS-1 que expresaba dos copias del gen gK era significativamente más virulento que el virus de tipo silvestre (Allen *et al.* (2014) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55:2442-2451; Allen *et al.* (2010) *Virology* 399:11-22; Ghiasi H *et al.* (2000) *Virus Res.* 68:137-144; Mott *et al.* (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:2903-2912; Mott *et al.* (2007) *J. Virol* 81:12962-12972). Recientemente, se ha informado que la mutación gKΔ31-68 atenúa la cepa ocular VHS-1(McKrae) altamente virulenta y previene la infección de las neuronas ganglionares del trigémino después de la infección ocular (Saied *et al.* *KG.* (2014) *Curr. Eye Res.* 39:596-603). La cepa de la vacuna VC2 contiene la mutación gKΔ31-68, que se espera que atenúe el virus y prevenga la infección de las neuronas ganglionares. Por lo tanto, es razonable suponer que VC2

es sustancialmente más seguro que VHS-1(F) BAC, ya que contiene delecciones de genes dobles en gK y UL20 asociadas con defectos en la entrada neuronal.

5 En general, las vacunas víricas atenuadas imitan infecciones naturales e inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares más robustas contra un amplio espectro de proteínas víricas. Por el contrario, las vacunas de subunidades solo pueden portar un número limitado de epítomos inmunogénicos y no inducen directamente respuestas inmunitarias innatas, como es el caso de las vacunas de virus vivos. La inmunización intramuscular con el virus VC2 produjo anticuerpos neutralizantes contra los virus VHS-1(McKrae) y VHS-2(G). VHS-1 y VHS-2 comparten un grado relativamente alto de homología de secuencia de proteínas y se sabe que inducen anticuerpos de tipo común (reactividad cruzada entre VHS-1 y VHS-2) que reconocen los principales determinantes víricos antigénicos, la mayoría de los cuales constituyen dominios secuenciales y conformacionales de glucoproteínas víricas (Kousoulas *et al.* (1988) *Virology* 166:423-431; Pereira *et al.* (1980) *Infect. Immun.* 29:724-732). Por otra parte, se sabe que la exposición preexistente al VHS-1 reduce la gravedad y la duración de la infección por VHS-2 (Koelle y Corey (2003) *Clin. Microbiol. Rev.* 16:96-113) sugiriendo la provocación de respuestas inmunitarias de tipo común.

15 La evaluación de las respuestas de las células T se facilitó mediante el uso de grupos de péptidos seleccionados y bien caracterizados que representan epítomos de células T CD4+ y CD8+ específicos de gB y gD, como se informó anteriormente (Iyer *et al.* (2013) *Virol. J.* 10:317), que incluyen algunos péptidos víricos más (figura suplementaria 1B). La proliferación de células T cultivadas con péptidos combinados es una medida directa de las células T de memoria capaces de reconocer los epítomos presentes en el conjunto de péptidos únicamente. Como tal, pueden subestimar la respuesta global de las células T contra el proteoma del VHS que expresa la vacuna VC2. Como se informó anteriormente, la respuesta de células T más prominente observada en ratones vacunados con gK-anulado fue de linfocitos T CD8+ específicos de gB (específicamente péptido 161-176). Curiosamente en pacientes humanos, este epítomo de células T en particular se ha identificado como inmunodominante, recordando la proliferación de células T CD4+ dependiente de HLA-DR y la producción de IFN- γ más fuertes en contraste con otros epítomos (Chentoufi *et al.* (2008) *J. Virol* 82:11792-11802). Las secuencias de péptidos gB (161-176) y gB (499-506) son idénticas entre VHS-1 y VHS-2, por lo tanto, se planteó la hipótesis de que las respuestas inmunitarias dirigidas hacia estos dos epítomos pueden contribuir a la protección cruzada observada contra las infecciones por VHS-1 y VHS-2. Además, la mayoría de los demás péptidos utilizados para los ensayos de proliferación mostraron un alto nivel de conservación de aminoácidos y homología en los proteomas de VHS-1 y VHS-2, lo que sugiere que también pueden estar implicados en la inducción de inmunidad protectora cruzada.

35 La vacunación intramuscular con el virus VC2 seguida de una exposición letal intravaginal con VHS-1 (McK-rae) o bien VHS-2 (G) protegió al 100 % de los ratones vacunados, mientras que todos los ratones vacunados de forma simulada murieron. De forma importante, el virus infeccioso no pudo recuperarse después de la inmunosupresión de ratones vacunados y expuestos y los ganglios de estos ratones no contenían ADN vírico detectable. Colectivamente estos resultados, con la rápida inhibición observada de la replicación del virus en los tejidos vaginales infectados en ratones vacunados frente a ratones vacunados de forma simulada, sugieren que la protección contra los virus desafiantes se confirió en gran parte limitando la replicación del virus en los tejidos vaginales infectados.

40 Las respuestas inmunitarias adaptativas son esenciales para brindar protección contra las infecciones por VHS-1 y VHS-2 (Dropulic y Cohen (2012) *Expert Rev. Vaccines* 11:1429-1440; Coleman y Shukla (2013) *Hum. Vaccin. Immunother.* 9:729-735; Dervillez *et al.* (2012) *Future Virol.* 7:371-378). Recientemente, se demostró que las células T CD8+ específicas de VHS-2 generadas después de la terapia quimio-atrayente administrada por vía vaginal en ratones median la protección de larga duración contra la exposición al VHS-2 (Shin e Iwasaki (2012) *Nature* 491:463-467). Las observaciones de los presentes inventores de la inhibición de la replicación vírica en tejidos vaginales dentro de los primeros 3-4 días posteriores a la infección sugieren que la inducción de anticuerpos neutralizantes y el rápido reclutamiento local de células T citotóxicas son suficientes para proteger contra la infección por VHS. Esta teoría está respaldada por la presencia de anticuerpos IgG neutralizantes y el desarrollo de potentes reservas de células T de memoria en los ratones vacunados. Se necesitan estudios adicionales para evaluar el nivel de inmunidad intravaginal específica de tejido a infecciones por VHS-1 y VHS-2 después de una sola dosis de VC2.

55 En el mejor de los casos, podría usarse una vacuna viva atenuada con fines profilácticos y terapéuticos. La obtención de respuestas robustas de memoria de células T específicas de tejido conferiría una ventaja sustancial al limitar la replicación de virus reactivados, así como inhibir infecciones secundarias. Es también posible, que las células T CD8+ pueden ser suficientes para prevenir la reactivación vírica de neuronas infectadas de forma latente. El virus VC2 podría utilizarse eficazmente como vector para la expresión de otros patógenos víricos y bacterianos. Los antígenos extraños expresados en VC2 pueden aprovechar las respuestas inmunitarias innatas provocadas por el virus VC2 que conducen a una fuerte respuesta inmunitaria adaptativa que permite la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas protectoras contra patógenos adicionales transmitidos por las mucosas tales como el VIH y *Chlamydia trachomatis*.

65 En resumen, los resultados desvelados en el presente documento demuestran que se ha desarrollado una vacuna atenuada contra el VHS-1 con al menos dos propiedades importantes. Primera, la vacuna es avirulenta porque no puede entrar en las neuronas debido a dos pequeñas delecciones en los extremos amino de la glucoproteína K (gK) y la proteína de membrana UL20. Segunda, el virus vacuna, cuando se inoculó por vía intramuscular en ratones, los

protegió al 100 % contra la exposición intravaginal letal con virus del herpes simple virulento tipo 1 (McKrae) y herpes simple virulento tipo 2 (VHS-2G). No hubo síntomas de ningún tipo asociados a la enfermedad herpética en los ratones expuestos. De forma importante, los ratones vacunados desarrollaron inmunidad "estéril", ya que no se detectó ADN vírico de VHS-1 (McKrae) o VHS-2G en los ganglios dorsales de los ratones expuestos. La protección se asoció a anticuerpos altamente neutralizantes contra ambos virus y la inducción de respuestas robustas de células T citotóxicas. Se espera que la vacuna produzca resultados similares en seres humanos.

No existe una vacuna disponible contra el virus del herpes simple. Sin embargo, hay al menos unas pocas vacunas que otros están buscando, más notablemente un virus vivo atenuado producido por Sanofi-Pasteur. Sin embargo, la vacuna de la presente invención es muy superior al virus de Pasteur-Sanofi, ya que no infecta a neuronas y establece latencia y procedimientos de inmunidad estéril nunca antes demostrada para ninguna otra vacuna contra el herpes simple.

Materiales y Métodos

Virus

La construcción del virus recombinante VC2 se realizó usando un sistema de recombinación rojo doble en células *E. coli* SW 105 como se describió anteriormente (Tischer *et al.* (2006) *Biotechniques* 40:191-197). Brevemente, los oligonucleótidos específicos diseñados para eliminar (aa 31-68) dentro del ORF que codifica el gen UL53 (gK) del VHS-1 se usaron primero para generar el BAC respectivo clonado en *E. coli*. Después de la transfección de las células Vero, se recuperó el virus VHS-1 recombinante gKΔ31-68. Se infectaron células Vero frescas con este virus y se aisló ADN vírico circular 6 horas después de la infección (hpi) usando el método descrito previamente (Hirt (1967) *J. Mol. Biol.* 26:365-369). El ADN del virus se sometió a electroporación en células SW 105 y se realizó una segunda ronda de recombinación usando oligonucleótidos específicos diseñados para eliminar (aa 4-22) dentro del ORF que codifica el gen UL20 del VHS-1. El virus recombinante VC2 se recuperó después de la transfección de células Vero. Las deleciones dobles dentro de los genes gK y UL20 se confirmaron mediante secuenciación de ADN capilar. La ausencia de cualquier otra mutación dentro de todas las proteínas estructurales de VHS-1 fue confirmada por secuenciación NGS usando Ion Torrent Personal Genome Machine. Las soluciones madre de VC2, VHS-1 (McKrae) y VHS-2 (G), se cultivaron hasta títulos altos y se valoraron en células Vero.

Secuenciación de ADN genómico de próxima generación

La secuenciación del ADN del virus mutante VHS-1 VC2 se realizó usando la Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) y el chip de secuenciación 316 (Life Technologies). Se aislaron dos muestras de ADN total independientes derivadas de células Vero infectadas y de viriones parcialmente purificados usando el mini kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). El kit de biblioteca de fragmentos Ion Xpress Plus (Life Technologies) se usó para preparar bibliotecas de fragmentos de alta calidad a partir de aproximadamente 1 mg de ADN total. Se produjeron partículas de esfera de iones (ISP) con plantilla positiva que contenían ADN amplificado clonalmente utilizando el kit de plantilla Ion OneTouch 200 v2 DL (para bibliotecas de lectura de 200 bases) con el instrumento Ion OneTouch. El instrumento Ion OneTouch ES se usó para enriquecer los ISP destinados al sistema Ion PGM mediante el kit de secuenciación Ion PGM 200.

Caracterización in vitro

El ensayo de la cinética de replicación se realizó en monocapas confluentes de células de riñón de mono africano verde (Vero) en placas de 12 pocillos. Las infecciones con VHS-1 (F) o con el virus mutante VC2 se realizaron con una MOI de, 1 y 5. Las placas inoculadas se colocaron a 4 °C durante 1 hora para permitir la unión del virión y se devolvieron a 37 °C durante otra hora para permitir la entrada. Después las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 1x y un volumen final de 1 ml de DMEM completo al 10 % FBS inactivado por calor aplicado a cada uno. Las placas se congelaron a -80 °C hasta que se titularon para los siguientes tiempos después de la infección; 0, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24 y 36 horas. Las muestras se valoraron en monocapas confluentes de células Vero. Los cultivos de células infectadas se fijaron a 48 hpi usando formalina-ácido acético-alcohol (FAA) y se tiñeron con cristal violeta. Las placas se contaron usando un microscopio óptico y se derivaron los títulos de virión expresados como UFP/ml para cada muestra.

El ensayo de entrada en células CHO que expresan receptores de entrada de VHS-1 conocidos se realizó como se describe en Chowdhury *et al.* (Chowdhury *et al.* (2013) *J. Virol* 87:3305-3313). Los ensayos de morfología de la placa se realizaron en monocapas confluentes de células Vero en formatos de 6 pocillos. El virus se diluyó en serie hasta que fueron visibles placas aisladas individuales. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpo primario policlonal de conejo anti-VHS-1 (Dako, Dinamarca), anticuerpo secundario conjugado HRP inmunoglobulinas anti-conejo de cabra policlonal (Dako, Dinamarca) y se visualizaron usando el kit de sustrato Vector® NovaRED (Vector, Burlingame, CA). Se dejó que el sustrato se desarrollara hasta una coloración suficiente para las imágenes microscópicas.

Seguridad y neurovirulencia

La vía de administración para la evaluación de la neurovirulencia se llevó a cabo mediante la inoculación de 20 ratones con 10^6 UFP ya sea por vía intranasal o intramuscular, 10 en cada grupo. Los ratones se controlaron diariamente durante 20 días después de la inoculación para detectar la manifestación de la enfermedad. El día 21, se sacrificaron los ratones y se recogieron los ganglios del trigémino para las inoculaciones intranasales y los ganglios de la raíz dorsal (para las inoculaciones intramusculares). Se extrajo el ADN tisular total usando el kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y se estimaron los genomas víricos mediante PCR cuantitativa.

Vacunación

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo después de obtener las aprobaciones correspondientes del Louisiana State University Institutional Animal Care and Use Committee. Se usaron ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad (LSU DLAM Breeding Colony, Baton Rouge, LA) en este estudio. Cada ratón se identificó con una etiqueta en la oreja (National Band and Tag Company, KY, EE.UU.). Los ratones se dividieron en dos grupos para recibir la vacuna o bien las inoculaciones simuladas. Ochenta ratones, 40 en cada grupo, fueron anestesiados levemente por inhalación de isoflurano al 2-3 % y se les administró una única inyección intramuscular de 100 μ l de 1×10^7 UFP de VC-2 o volumen equivalente de medio acondicionado. Después se observó a los ratones recogiendo las observaciones del peso y clínicas diariamente.

Recolección y análisis de tejidos

El día 21 después de la vacunación, se anestesió a 20 ratones de cada grupo mediante inhalación de isoflurano al 2-3 % y se les extrajo sangre mediante una sonda cardíaca. Se recogió el volumen máximo de sangre y los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se dejó coagular la sangre a 4 °C durante la noche en tubos Falcon de 5 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y el suero se recogió en microtubos con tapón de rosca Sarstedt de 2 ml (Sarstedt Inc, Newton, NC) y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Los bazo fueron extirpados de animales sacrificados, se picaron y se trituraron a través de un colador celular de malla de nailon de 10 μ m (Fisher Scientific) en solución salina equilibrada de Hank. A continuación, las suspensiones de células se sedimentaron mediante centrifugación a 300 xg durante 5 minutos y se congelaron en suero bovino fetal inactivado por calor con DMSO al 5 % a una concentración de 10^7 células/ml. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Los ganglios de la raíz dorsal se extirparon como se describe en Murphy *et al.* (2000) J. Virol 74:7745-7754. Brevemente, se abrió la cavidad peritoneal del ratón y se evisceraron todos los órganos. Se extrajeron los tejidos que cubren la porción ventral de la columna. La disección se realizó con aumento con un microscopio de disección. Con cuidado, con unas tijeras curvas, se cortó la columna vertebral medialmente y se insertaron unas tijeras en el espacio subaracnoideo para hacer dos cortes laterales a lo largo de la columna. Se extrajeron las médulas espinales con los ganglios de la raíz dorsal adheridos. El ADN se extrajo utilizando el kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen Sciences, Maryland, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante y el ADN se precipitó con un volumen igual de isopropanol más acetato de sodio 0,3 M, se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió hasta un volumen final de 50 μ l de agua libre de nucleasa.

Citometría y análisis de flujo policromático

Las células criopreservadas se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml y se marcaron con la tinción de membrana éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). Después las células marcadas se cultivaron a una concentración de 10^5 células/pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos y se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 7 días en presencia de péptidos combinados específicos para VHS-1 o VHS-2 a una concentración de 10 μ g/ml. Las células se tiñeron después con anticuerpo policlonal anti-CD4 de ratón conjugado con PE (BD Biosciences) y anticuerpo policlonal anti-CD8a de ratón conjugado con APC (BD Biosciences). La proliferación de subconjuntos de células T marcadas se evaluó usando un citómetro de flujo personal Accuri C6. Se usaron esplenocitos no estimulados marcados con CFSE para establecer la población CFSE^{brillante} y para definir la selección usada para cuantificar las células T CFSE^{oscúras} (proliferativas).

Los sobrenadantes de los esplenocitos cultivados se almacenaron a -20 °C hasta el análisis. Las respuestas a las citocinas de los esplenocitos cultivados se analizaron usando el kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine (BD Biosciences, San Diego, CA) leídas usando un analizador Bioplex (Bio-Rad, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante.

Exposición

El día 15 después de la vacunación a los ratones se les administró Depo Provera (Upjohn, Kalamazoo, MI) mediante inyección intramuscular como se describió anteriormente Iyer *et al.* (Iyer *et al.* (2013) Virol. J. 10:317) El día de la exposición, se limpiaron las vaginas de los ratones con puntas de aplicador de poliestireno estériles sumergidas en 100 μ l de DMEM que contenía 50 mg/l de primocina. Se instilaron 10^6 unidades formadoras de placa de VHS-1 (McKrae) o VHS-2 (G) altamente virulentas en la bóveda vaginal y los ratones se controlaron de cerca a diario para determinar la manifestación clínica de la enfermedad, registrando el peso diario y las puntuaciones clínicas. Los ratones se puntuaron en una escala de 0-6 (0 = sin enfermedad, 1 = pelaje erizado y morbilidad generalizada, 2 =

eritema y edema genital leve, 3 = inflamación genital moderada, 4 = inflamación genital con secreción purulenta, 5 = parálisis de las extremidades traseras, 6 = muerte). El día en que un animal sucumbió a la enfermedad, o el día del sacrificio, los tejidos pertinentes se recolectaron y conservaron en formalina tamponada neutra al 10 % (American Mastertech, Lodi, CA). Se extirparon vaginas y cerebros enteros y se sometieron a tinción histológica. Los tejidos expuestos no vacunados se recogieron de manera similar y se tiñeron para detectar la presencia del virus en el momento de la muerte.

Reactivación de latencia

La reactivación se llevó a cabo como se describe en Cook *et al.* (1991) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:1558-1561. Brevemente, el día 100 después de la exposición a los ratones vacunados, que ya habían sobrevivido al desafío, recibieron una serie de inyecciones intravenosas. Primero 5 mg de ciclofosfamida (Baxter, Deerfield, IL) seguido 24 horas después de 0,2 mg de dexametasona (Butler Schein, Dublin, OH) se inyectaron a través de la misma vía. Los ratones se controlaron diariamente para detectar cualquier manifestación clínica de la enfermedad. Se tomaron diariamente muestras de frotis vaginales durante 5 días antes y después de la administración de ciclofosfamida y dexametasona, después de lo cual se sacrificaron los ratones supervivientes para el análisis del tejido nervioso extirpado para detectar la presencia de ADN vírico.

PCR cuantitativa

Se resecaron los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratones vacunados y controles no vacunados, expuestos a VHS1 McKrae o bien VHS2-G. Los DRG se aspiraron vigorosamente y el ADN se extrajo usando el Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue™ según las instrucciones del fabricante. El ADN eluido se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000™. Se usaron cantidades iguales de ADN de cada muestra para realizar un análisis de PCR cuantitativo en tiempo real en un sistema de PCR rápido en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems. Se usaron ADN víricos de VHS-1 (McKrae) y HSV-2(G) purificados como controles positivos. Las siguientes combinaciones de cebador/sonda se usaron para detectar específicamente VHS-1(McKrae) o VHS-2(G) (véase también la Tabla 1):

(1) HSV1gDFP (SEQ ID NO: 20)
ACGTACCTGCGGCTCGTGAAGA
(2) Sonda VHS1 (SEQ ID NO: 21)
Fam-AGCCAAGGGCTCCTGTAAGTACGCCCT-Tamra
(3) HSV1 gD RP (SEQ ID NO: 22)
TCACCCCTGCTGGTAGGCC
(4) HSV2gDFP (SEQ ID NO: 23)
CCGCGGGTACGTACCTGCGGCTAG
(5) Sonda VHS2 (SEQ ID NO: 24)
HEX-GGCC GCGC/ZEN/CTCCTGCAAGTACGCTCT-IABkFQ y
(6) HSV2 gD RP (SEQ ID NO: 25)
GCCCTGTTGGTAGGCCTTCGAGGTG.

Para determinar la sensibilidad del ensayo qPCR, Se cuantificó el ADN genómico de VHS-1 y VHS-2 y se calcularon sus respectivas concentraciones molares usando la fórmula: $-\{\mu\text{g ADN} \times (\text{pmol}/660) \times (10^6 \text{ pg}/1 \mu\text{g}) \times (1/N) = \text{pmol de ADN, donde N} = \text{número de nucleótidos}\}$. Se usaron diluciones seriadas en diez veces que varían de 10^5 - $10^{0.1}$ moléculas como muestras de plantilla en las reacciones de PCR Taqman y se usó agua como control sin plantilla. La qPCR se realizó en el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT de Applied biosystems. El ADN diana del VHS se detectó en la dilución más baja ($2,7 \times 10^{-8}$ μg de ADN) que contiene 3 copias por μl . No se detectó ADN vírico en la muestra de control sin plantilla. El intervalo lineal de detección varió de 3 a 10^6 copias de ADN vírico con ratones vacunados de forma simulada que muestran más de 10^6 copias de ADN vírico por muestra.

Diseminación de virus

En el día de la exposición, antes de la administración del virus y diariamente después de la inoculación, las vaginas se limpiaron con puntas de aplicador de poliestireno estériles sumergidas en 100 μl de DMEM que contenían 50 mg/l de Primocin (InvivoGen, San Diego, CA). Las muestras de frotis se almacenaron a -80°C hasta la titulación. La titulación de muestras de hisopos se llevó a cabo en monocapas confluentes de células Vero. Las muestras se resuspendieron en 900 μl de DMEM + 50 mg/l de Primocin para una dilución inicial de 10^{-1} y se diluyó en aumentos de 10 veces hasta 10^{-6} . Se sembraron 250 μl de cada dilución por duplicado y se incubaron a 24°C durante 1 hora. Después se aspiraron las diluciones y se cubrieron los pocillos con metilcelulosa DMEM al 1 % que contenía FBS al 1 % y Primocin 50 mg/l. Después las placas se incubaron a 37°C con 5 % de CO_2 durante 36-48 horas hasta que se hubieron formado placas visibles. A continuación, las placas se fijaron con FAA y se tiñeron con cristal violeta. Las placas se contaron a diluciones que produjeron más de 20 placas por pocillo.

ELISA de anticuerpos y neutralización del suero

Las concentraciones séricas relativas de IgG anti-VHS-1 se cuantificaron usando ELISA de IgG de VHS-1 de ratón/rata

disponible en el mercado (Calbiotech, Spring Valley, CA). El suero recogido el día 21 se usó para neutralizar 50 µl de solución madre de VHS-1 McKrae y VHS-2 G. El suero se diluyó primero 1:10 en DMEM completo que contenía FBS inactivado por calor al 10 %. A continuación, el suero diluido se diluyó en serie dos veces hasta 1:160. Después se añadieron 50 µl de solución madre de virus a cada dilución de suero, 50 µl cada una, hasta un volumen total de 100 µl. La adición de virus hizo diluciones de suero 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320. Después, las mezclas de virus en suero se colocaron en una placa oscilante a temperatura ambiente durante 1 hora y se congelaron a -80 °C hasta la titulación en células Vero.

EJEMPLO 2: La mutación gKΔ31-68 evita la entrada del VHS en los axones neuronales

Recientemente, se desarrolló un ensayo novedoso para la evaluación de la entrada del virión en el citoplasma de las células mediante la adaptación del ensayo de ligación de proximidad (PLA) (Jarvius *et al.* (2007) *Mol. Cell. Proteomics* 6:1500-1509; Soderberg *et al.* (2006) *Nat. Methods* 3:995-1000; Soderberg *et al.* (2008) *Methods* 45:227-232). El PLA se ha utilizado ampliamente para determinar si dos proteínas diferentes se colocan y probablemente interactúan en el citoplasma de las células. El PLA se realiza uniendo primero anticuerpos específicos a las dos proteínas de interés y después uniendo a estos anticuerpos primarios dos anticuerpos secundarios unidos covalentemente con un cebador de ADN corto. Cuando los dos cebadores están muy cerca uno del otro, pueden interactuar con otros dos cebadores formadores de círculos que se agregan más adelante. La ligadura enzimática de estos dos oligonucleótidos marcados con fluorescencia seguida de la amplificación del círculo rodante dependiente de la polimerasa da como resultado la generación de fluorescencia intensa visualizada como una mancha brillante distinta utilizando un microscopio de fluorescencia (Jarvius *et al.* (2007) *Mol. Cell. Proteomics* 6:1500-1509; Soderberg *et al.* (2006) *Nat. Methods* 3:995-1000). Se utilizó PLA para detectar las interacciones conocidas de gD/Nectina-1 en las superficies de las células infectadas inmediatamente después de una adsorción de 2 horas del virus a 4 °C en las neuronas ganglionares, cuando el virus se adhirió a las superficies celulares, pero aún no había entrado a las células (FIGURA 9). Para determinar la entrada citoplásmica se marcó como diana específicamente la proteína del tegumento UL37 y la dineína, ya que la bibliografía publicada ha sugerido que el complejo proteico UL37/UL36 interactúa con el complejo motor dineína. El PLA usando anticuerpos anti-UL37 y anti-dineína detectó la colocación de UL37 con dineína en el citoplasma después de la incubación de las células infectadas a 37 °C durante una hora (FIGURA 9). Este ensayo demuestra eficazmente que VHS-1 (McKrae) gKΔ31-68 se unió de manera eficiente, pero era defectuoso para entrar en los axones neuronales.

El artículo "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos.

A lo largo de la memoria descriptiva, la frase "que comprende", o variaciones como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, citados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de aquellos expertos en la materia a la que pertenece la presente invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, será obvio que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kousoulas, Konstantin

<120> VACUNAS CONTRA LAS INFECCIONES POR HERPES SIMPLE GENITAL

<130> 070114.0006

<150> US 61/990.975

<151> 09/05/2014

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 669

<212> ADN

<213> Virus del herpes simple 1, cepa F

ES 2 819 548 T3

<400> 1

```

atgaccatgc gggatgacct tcctctggtg gatcgagatc tggtcgacga ggccgccttc      60
gggggggagg agggagaact gccgctggag gaacagtttt cattgtcctc gtacggcacc      120
tctgattttt ttgtcagttc ggcatactcg cgtcttccgc cccataccca gccggtcttt      180
tcaaagcgcg tgattctggt cctttggtcg tttttggtcc tgaagccgtt ggagatggtg      240
gcagcgggca tgtattacgg gctgaccgga agggtggtgg cgccggcctg tatcctggcc      300
gccatcgtcg gctactacgt tacgtgggog gtgcgggggc tcctcctgta cgттаacatc      360
aagagggatc gtctgccggt gtcggcgccc gtgttttggg ggatgtccgt gtttttggga      420
ggcacggccc tgtgtgcctt gttcgccgcc gcccacgaga cttcagtc ccggacgggctt      480
ttccacttta tcgccaccaa ccaaatgctg ccaccaccg atcccctgcg cacacggggc      540
ctggggatag cctgtgcggc cggggcctcg atgtgggtgg cggcggcgga cagctttgcc      600
gcctctgcca atttcttctt ggcacgcttt tggaccaggg ccatcttgaa tgcacccgct      660
gcgttctaa                                     669
  
```

5 <210> 2
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 1, cepa F

10 <400> 2

```

Met Thr Met Arg Asp Asp Leu Pro Leu Val Asp Arg Asp Leu Val Asp
1           5           10           15

Glu Ala Ala Phe Gly Gly Glu Glu Gly Glu Leu Pro Leu Glu Glu Gln
20           25           30

Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Thr Ser Asp Phe Phe Val Ser Ser Ala
35           40           45
  
```

ES 2 819 548 T3

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

<210> 3
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple 1, cepa F
 <400> 3

5

ES 2 819 548 T3

```

atgctgcgcg tccgttccct gcagcacctc tcaaccgtcg tcttgataac ggcgtacggc      60
ctcgtgctcg tgtggtacac cgtcttcggt gccagtccgc tgcaccgatg tatttacgcg      120
gtacgccccca ccggcaccaa caacgacacc gccctcgtgt ggatgaaaat gaaccagacc      180
ctattgtttc tgggggcccc gacgcacccc cccaacgggg gctggcgcaa ccacgccccat      240
atctgctacg ccaatcttat cgcgggtagg gtcgtgccct tccaggtccc acccgacgcc      300
atgaatcgtc ggatcatgaa cgtccacgag gcagttaact gtctggagac cctatggtac      360
acacgggtgc gtctggtggt cgtaggggtg ttctgtatc tggcgttcgt cgccctccac      420
caacgccgat gtatgtttgg tgtcgtgagt cccgcccaca agatggtggc cccggccacc      480
tacctcttga actacgcagg ccgcatcgta tcgagcgtgt tcctgcagta cccctacacg      540
aaaattaccg gcctgctctg cgagctgtcg gtccagcggc aaaacctggt tcagttgttt      600
gagacggacc cggtcacctt cttgtaccac cgccccgcca tcggggtcac cgtaggctgc      660
gagttgatgc tacgctttgt ggccgtgggt ctcacgtcgc gcaccgcttt catatcccgg      720
ggggcatgtg caatcacata ccccctgttt ctgaccatca ccacctggtg ttttgtctcc      780
accatcggcc tgacagagct gtattgtatt ctgcggcggg gcccggcccc caagaacgca      840
gacaaggccg ccgccccggg gcgatccaag gggctgtcgg gcgtctgcgg gcgctgctgt      900
tccatcatcc tctcgggcat cgcagtgcga ttgtgttata tcgccgtggt ggccggggtg      960
gtgctcgtgg cgcttcaact cgagcaggag atccagaggc gcctgtttga tgtatga      1017

```

<210> 4

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Virus del herpes simple 1, cepa F

<400> 4

ES 2 819 548 T3

Met Leu Ala Val Arg Ser Leu Gln His Leu Ser Thr Val Val Leu Ile
 1 5 10 15

Thr Ala Tyr Gly Leu Val Leu Val Trp Tyr Thr Val Phe Gly Ala Ser
 20 25 30

Pro Leu His Arg Cys Ile Tyr Ala Val Arg Pro Thr Gly Thr Asn Asn
 35 40 45

Asp Thr Ala Leu Val Trp Met Lys Met Asn Gln Thr Leu Leu Phe Leu
 50 55 60

Gly Ala Pro Thr His Pro Pro Asn Gly Gly Trp Arg Asn His Ala His
 65 70 75 80

Ile Cys Tyr Ala Asn Leu Ile Ala Gly Arg Val Val Pro Phe Gln Val
 85 90 95

Pro Pro Asp Ala Met Asn Arg Arg Ile Met Asn Val His Glu Ala Val
 100 105 110

Asn Cys Leu Glu Thr Leu Trp Tyr Thr Arg Val Arg Leu Val Val Val
 115 120 125

ES 2 819 548 T3

Gly Trp Phe Leu Tyr Leu Ala Phe Val Ala Leu His Gln Arg Arg Cys
 130 135 140

Met Phe Gly Val Val Ser Pro Ala His Lys Met Val Ala Pro Ala Thr
 145 150 155 160

Tyr Leu Leu Asn Tyr Ala Gly Arg Ile Val Ser Ser Val Phe Leu Gln
 165 170 175

Tyr Pro Tyr Thr Lys Ile Thr Arg Leu Leu Cys Glu Leu Ser Val Gln
 180 185 190

Arg Gln Asn Leu Val Gln Leu Phe Glu Thr Asp Pro Val Thr Phe Leu
 195 200 205

Tyr His Arg Pro Ala Ile Gly Val Ile Val Gly Cys Glu Leu Met Leu
 210 215 220

Arg Phe Val Ala Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Ala Phe Ile Ser Arg
 225 230 235 240

Gly Ala Cys Ala Ile Thr Tyr Pro Leu Phe Leu Thr Ile Thr Thr Trp
 245 250 255

Cys Phe Val Ser Thr Ile Gly Leu Thr Glu Leu Tyr Cys Ile Leu Arg
 260 265 270

Arg Gly Pro Ala Pro Lys Asn Ala Asp Lys Ala Ala Ala Pro Gly Arg
 275 280 285

Ser Lys Gly Leu Ser Gly Val Cys Gly Arg Cys Cys Ser Ile Ile Leu
 290 295 300

Ser Gly Ile Ala Val Arg Leu Cys Tyr Ile Ala Val Val Ala Gly Val
 305 310 315 320

Val Leu Val Ala Leu His Tyr Glu Gln Glu Ile Gln Arg Arg Leu Phe
 325 330 335

Asp Val

<210> 5
 <211> 612
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética derivada de VHS-1(F)

5

10

ES 2 819 548 T3

<400> 5

atgacatgg aggagggaga actgccgctg gaggaacagt tttcattgtc ctcgtacggc 60
 acctctgatt tttttgtcag ttccggcatac tcgcgtcttc cgccccatac ccagccggtc 120
 ttttcaaagc gcgtgattct gttccttttg tcgttttttg tcctgaagcc gttggagatg 180
 gtggcagcgg gcatgtatta cgggctgacc ggaaggggtg tggcgccggc ctgtatcctg 240
 gccgccatcg tcggctacta cgttacgtgg gcggtgcggg cgctcctcct gtacgttaac 300
 atcaagaggg atcgtctgcc gttgtcggcg cccgtgtttt gggggatgtc cgtgtttttg 360
 ggaggcacgg ccctgtgtgc cttgttcgcc gccgccacg agaccttcag tccggacggg 420
 cttttccact ttatcgccac caaccaaagc ctgccacca ccgatcccct gcgcacacgg 480
 gccctgggga tagcctgtgc ggccggggcc tcgatgtggg tggcggcggc ggacagcttt 540
 gccgcctctg ccaatttctt cctggcacgc ttttgacca gggccatctt gaatgcacc 600
 gtcgcgttct aa 612

5 <210> 6
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética derivada de VHS-1(F)

<400> 6

Met	Thr	Met	Glu	Glu	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Gln	Phe	Ser	Leu	1	5	10	15
Ser	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Asp	Phe	Phe	Val	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Arg	20	25	30	
Leu	Pro	Pro	His	Thr	Gln	Pro	Val	Phe	Ser	Lys	Arg	Val	Ile	Leu	Phe	35	40	45	
Leu	Trp	Ser	Phe	Leu	Val	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Met	Val	Ala	Ala	Gly	50	55	60	
Met	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Ile	Leu	65	70	75	80
Ala	Ala	Ile	Val	Gly	Tyr	Tyr	Val	Thr	Trp	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Leu	85	90	95	
Leu	Tyr	Val	Asn	Ile	Lys	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Val	100	105	110	

15

ES 2 819 548 T3

Phe Trp Gly Met Ser Val Phe Leu Gly Gly Thr Ala Leu Cys Ala Leu
 115 120 125

Phe Ala Ala Ala His Glu Thr Phe Ser Pro Asp Gly Leu Phe His Phe
 130 135 140

Ile Ala Thr Asn Gln Met Leu Pro Pro Thr Asp Pro Leu Arg Thr Arg
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Ile Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ser Met Trp Val Ala Ala
 165 170 175

Ala Asp Ser Phe Ala Ala Ser Ala Asn Phe Phe Leu Ala Arg Phe Trp
 180 185 190

Thr Arg Ala Ile Leu Asn Ala Pro Val Ala Phe
 195 200

<210> 7
 <211> 903
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética derivada de VHS-1(F)

10

<400> 7

atgctcgccg tccgttccct gcagcacctc tcaaccgtcg tcttgataac ggcgtacggc 60
 ctctgtctcg tgtggtacac cgtcttcggt cccccccca acgggggctg gcgcaaccac 120
 gcccatatct gctacgcaa tcttatcgcg ggtagggctg tggccttcca ggtcccaccc 180
 gacgccatga atcgtcggat catgaacgtc cacgaggcag ttaactgtct ggagacccta 240
 tggtagacac ggggtcgtct ggtggtcgtg ggggtggttcc tgtatctggc gttcgtcgcc 300
 ctccaccaac gccgatgtat gtttgggtgc gtgagtcctc cccacaagat ggtggccccg 360
 gccacctacc tcttgaacta cgcaggccgc atcgtatcga gcgtgttcct gcagtacccc 420
 tacacgaaaa ttaccgcct gctctgcgag ctgtcgggtcc agcggcaaaa cctggttcag 480
 ttgtttgaga cggaccggt caccttcttg taccaccgcc cggccatcgg ggtcatcgta 540
 ggctgcgagt tgatgctacg ctttgtggcc gtgggtctca tcgtcggcac cgctttcata 600
 tcccgggggg catgtgcaat cacatacccc ctgtttctga ccatcaccac ctggtgtttt 660
 gtctccacca tcggcctgac agagctgtat tgtattctgc ggcggggccc ggcccccaag 720
 aacgcagaca aggccgccc cccggggcga tccaaggggc tgtcgggctg ctgcgggcgc 780
 tgctgttcca tcatcctctc gggcatcgca gtgcgattgt gttatatcgc cgtggtggcc 840
 ggggtggtgc tcgtggcgct tcaactacgag caggagatcc agaggcgcct gtttcatgta 900
 tga 903

15 <210> 8

ES 2 819 548 T3

<211> 300
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética derivada de VHS-1(F)

<400> 8

Met Leu Ala Val Arg Ser Leu Gln His Leu Ser Thr Val Val Leu Ile
 1 5 10 15

Thr Ala Tyr Gly Leu Val Leu Val Trp Tyr Thr Val Phe Gly His Pro
 20 25 30

Pro Asn Gly Gly Trp Arg Asn His Ala His Ile Cys Tyr Ala Asn Leu
 35 40 45

Ile Ala Gly Arg Val Val Pro Phe Gln Val Pro Pro Asp Ala Met Asn
 50 55 60

Arg Arg Ile Met Asn Val His Glu Ala Val Asn Cys Leu Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Trp Tyr Thr Arg Val Arg Leu Val Val Val Gly Trp Phe Leu Tyr Leu
 85 90 95

Ala Phe Val Ala Leu His Gln Arg Arg Cys Met Phe Gly Val Val Ser
 100 105 110

Pro Ala His Lys Met Val Ala Pro Ala Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ala
 115 120 125

Gly Arg Ile Val Ser Ser Val Phe Leu Gln Tyr Pro Tyr Thr Lys Ile
 130 135 140

Thr Arg Leu Leu Cys Glu Leu Ser Val Gln Arg Gln Asn Leu Val Gln
 145 150 155 160

Leu Phe Glu Thr Asp Pro Val Thr Phe Leu Tyr His Arg Pro Ala Ile
 165 170 175

Gly Val Ile Val Gly Cys Glu Leu Met Leu Arg Phe Val Ala Val Gly
 180 185 190

Leu Ile Val Gly Thr Ala Phe Ile Ser Arg Gly Ala Cys Ala Ile Thr
 195 200 205

10

ES 2 819 548 T3

Tyr Pro Leu Phe Leu Thr Ile Thr Thr Trp Cys Phe Val Ser Thr Ile
 210 215 220

Gly Leu Thr Glu Leu Tyr Cys Ile Leu Arg Arg Gly Pro Ala Pro Lys
 225 230 235 240

Asn Ala Asp Lys Ala Ala Ala Pro Gly Arg Ser Lys Gly Leu Ser Gly
 245 250 255

Val Cys Gly Arg Cys Cys Ser Ile Ile Leu Ser Gly Ile Ala Val Arg
 260 265 270

Leu Cys Tyr Ile Ala Val Val Ala Gly Val Val Leu Val Ala Leu His
 275 280 285

Tyr Glu Gln Glu Ile Gln Arg Arg Leu Phe Asp Val
 290 295 300

<210> 9
 <211> 222
 5 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2

<400> 9

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

Glu Ala Ala Cys Gly Gly Glu Asp Gly Glu Leu Pro Leu Asp Glu Gln
 20 25 30

Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Thr Ser Asp Phe Phe Val Ser Ser Ala
 35 40 45

Tyr Ser Arg Leu Pro Pro His Thr Gln Pro Val Phe Ser Lys Arg Val
 50 55 60

Val Met Phe Ala Trp Ser Phe Leu Val Leu Lys Pro Leu Glu Leu Val
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Met Tyr Tyr Gly Trp Thr Gly Arg Ala Val Ala Pro Ala
 85 90 95

Cys Ile Ile Ala Ala Val Leu Ala Tyr Tyr Val Thr Trp Leu Ala Arg
 100 105 110

Ala Leu Leu Leu Tyr Val Asn Ile Lys Arg Asp Arg Leu Pro Leu Ser
 115 120 125

10

ES 2 819 548 T3

Pro Pro Val Phe Trp Gly Leu Cys Val Ile Met Gly Gly Ala Ala Leu
 130 135 140

Cys Ala Leu Val Ala Ala Ala His Glu Thr Phe Ser Pro Asp Gly Leu
 145 150 155 160

Phe His Trp Ile Thr Ala Ser Gln Leu Leu Pro Arg Thr Asp Pro Leu
 165 170 175

Arg Ala Arg Ser Leu Gly Ile Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Met Trp
 180 185 190

Val Ala Ala Ala Asp Cys Phe Ala Ala Phe Thr Asn Phe Phe Leu Ala
 195 200 205

Arg Phe Trp Thr Arg Ala Ile Leu Lys Ala Pro Val Ala Phe
 210 215 220

<210> 10
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2

5

<400> 10

Met Leu Ala Val Arg Ser Leu Gln His Leu Thr Thr Val Ile Phe Ile
 1 5 10 15

Thr Ala Tyr Gly Leu Val Leu Ala Trp Tyr Ile Val Phe Gly Ala Ser
 20 25 30

Pro Leu His Arg Cys Ile Tyr Ala Val Arg Pro Ala Gly Ala His Asn
 35 40 45

Asp Thr Ala Leu Val Trp Met Lys Ile Asn Gln Thr Leu Leu Phe Leu
 50 55 60

Gly Pro Pro Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ala Trp Thr Pro His Ala Arg
 65 70 75 80

Val Cys Tyr Ala Asn Ile Ile Glu Gly Arg Ala Val Ser Leu Pro Ala
 85 90 95

Ile Pro Gly Ala Met Ser Arg Arg Val Met Asn Val His Glu Ala Val
 100 105 110

Asn Cys Leu Glu Ala Leu Trp Asp Thr Gln Met Arg Leu Val Val Val
 115 120 125

10

ES 2 819 548 T3

Gly Trp Phe Leu Tyr Leu Ala Phe Val Ala Leu His Gln Arg Arg Cys
 130 135 140

Met Phe Gly Val Val Ser Pro Ala His Ser Met Val Ala Pro Ala Thr
 145 150 155 160

Tyr Leu Leu Asn Tyr Ala Gly Arg Ile Val Ser Ser Val Phe Leu Gln
 165 170 175

Tyr Pro Tyr Thr Lys Ile Thr Arg Leu Leu Cys Glu Leu Ser Val Gln
 180 185 190

Arg Gln Thr Leu Val Gln Leu Phe Glu Ala Asp Pro Val Thr Phe Leu
 195 200 205

Tyr His Arg Pro Ala Ile Gly Val Ile Val Gly Cys Glu Leu Leu Leu
 210 215 220

Arg Phe Val Ala Leu Gly Leu Ile Val Gly Thr Ala Leu Ile Ser Arg
 225 230 235 240

Gly Ala Cys Ala Ile Thr His Pro Leu Phe Leu Thr Ile Thr Thr Trp
 245 250 255

Cys Phe Val Ser Ile Ile Ala Leu Thr Glu Leu Tyr Phe Ile Leu Arg
 260 265 270

Arg Gly Ser Ala Pro Lys Asn Ala Glu Pro Ala Ala Pro Arg Gly Arg
 275 280 285

Ser Lys Gly Trp Ser Gly Val Cys Gly Arg Cys Cys Ser Ile Ile Leu
 290 295 300

Ser Gly Ile Ala Val Arg Leu Cys Tyr Ile Ala Val Val Ala Gly Val
 305 310 315 320

Val Leu Val Ala Leu Arg Tyr Glu Gln Glu Ile Gln Arg Arg Leu Phe
 325 330 335

Asp Leu

- <210> 11
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Virus del herpes simple 1
- <400> 11

5

ES 2 819 548 T3

Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala
 1 5
 5 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 12

Ser Ile Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala
 1 5
 10 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Virus del herpes simple 1
 <400> 13

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn
 1 5 10 15
 20 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 14

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Asp Thr Thr Asn
 1 5 10 15
 30 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 1
 35 <400> 15

Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr
 1 5
 40 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 45 <400> 16

Ala Leu Leu Glu Asp Pro Ala Gly Thr
 1 5
 50 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 1
 <400> 17

His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Ile Ala Val Ala Trp Cys Glu
 1 5 10 15
 55

ES 2 819 548 T3

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Virus del herpes simple 1

 <400> 18

 Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe
 1 5 10 15
 10
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 1
 15
 <400> 19

 Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu
 1 5
 20
 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 20
 acgtacctgc ggctcgtgaa ga 22
 30
 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 21
 agccaagggc tcctgtaagt acgccct 27
 40
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 22
 tcacccctg ctggtaggcc 20
 50
 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 23
 ccgcggttac gtacctgagg ctag 24
 60

ES 2 819 548 T3

5 <210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda

10 <400> 24
ggcccgcgcc tcctgcaagt acgctct 27

15 <210> 25
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 25
gccctgttg taggccttcg aggtg 25

REIVINDICACIONES

1. Un virus del herpes simple recombinante (VHS), en donde el VHS recombinante comprende un genoma VHS recombinante que comprende:
- 5 (a) un gen UL53 modificado que comprende una delección de la región del gen UL53 que codifica los aminoácidos 31-68 de gK de tipo silvestre; y
 (b) un gen UL20 modificado que comprende una delección de la región del gen UL20 que codifica los aminoácidos 4-22 de la proteína UL20 de tipo silvestre; y en donde el VHS recombinante es capaz de replicarse en una célula hospedadora y es incapaz de entrar en los compartimentos axonales de las neuronas.
- 10 2. El VHS recombinante de la reivindicación 1, en donde el genoma del VHS recombinante se produce modificando el genoma del VHS-1 o VHS-2, en donde el VHS-1 es preferentemente la cepa F de VHS-1.
- 15 3. El VHS recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde el gen UL53 modificado comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 7; y
 (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.
- 20 4. El VHS recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el gen UL20 modificado comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (iii) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 5; y
 (iv) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.
- 25 5. El VHS recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde el gen UL53 modificado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8 y el gen UL20 modificado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.
- 30 6. El VHS recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el genoma del VHS recombinante comprende además un gen adicional que codifica un antígeno extraño.
- 35 7. El VHS recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un virus vivo.
8. El VHS recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un virus inactivado.
- 40 9. Un genoma de un VHS recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Una vacuna que comprende un VHS recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o un genoma de VHS recombinante de la reivindicación 9.
- 45 11. La vacuna de la reivindicación 10, que comprende además un componente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en un vehículo, un excipiente, un agente estabilizante, un conservante, un inmunoestimulante y un adyuvante.
- 50 12. Un método *in vitro* para producir una vacuna, comprendiendo el método:
- (a) transfectar una célula hospedadora con el genoma de VHS recombinante de la reivindicación 9;
 (b) incubar la célula hospedadora transfectada en condiciones favorables para la formación de un virus VHS recombinante que comprende el genoma del VHS recombinante;
 (c) purificar el virus VHS recombinante que comprende el genoma VHS recombinante; y opcionalmente
 (d) combinar el virus VHS recombinante purificado con al menos un componente farmacéuticamente aceptable.
- 55 13. Un método *in vitro* para producir un VHS recombinante, comprendiendo el método:
- (a) transfectar una célula hospedadora con el genoma de VHS recombinante de la reivindicación 9; y
 (b) incubar la célula hospedadora transfectada en condiciones favorables para la formación de un virus VHS recombinante que comprende el genoma del VHS recombinante, por lo que se produce un VHS recombinante.
- 60

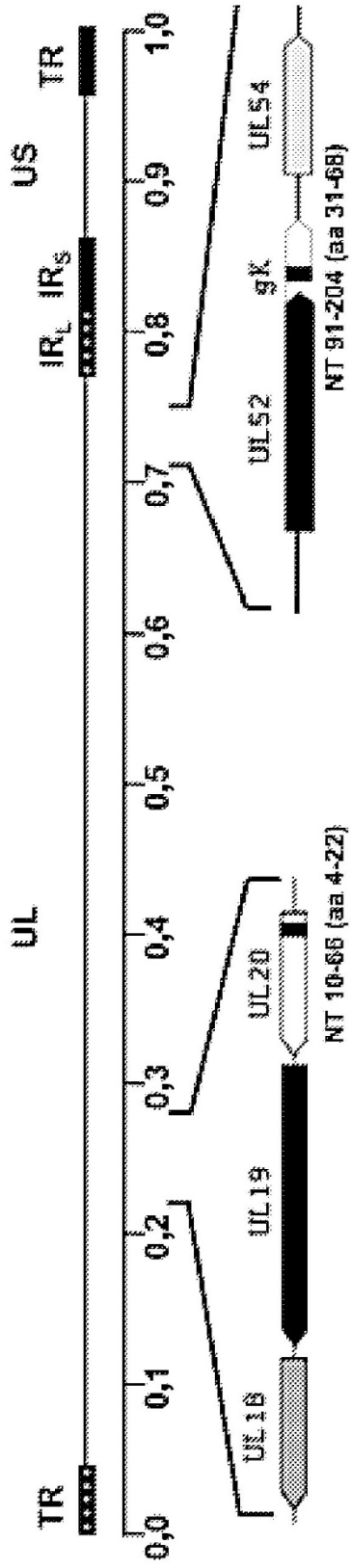


Fig. 1A

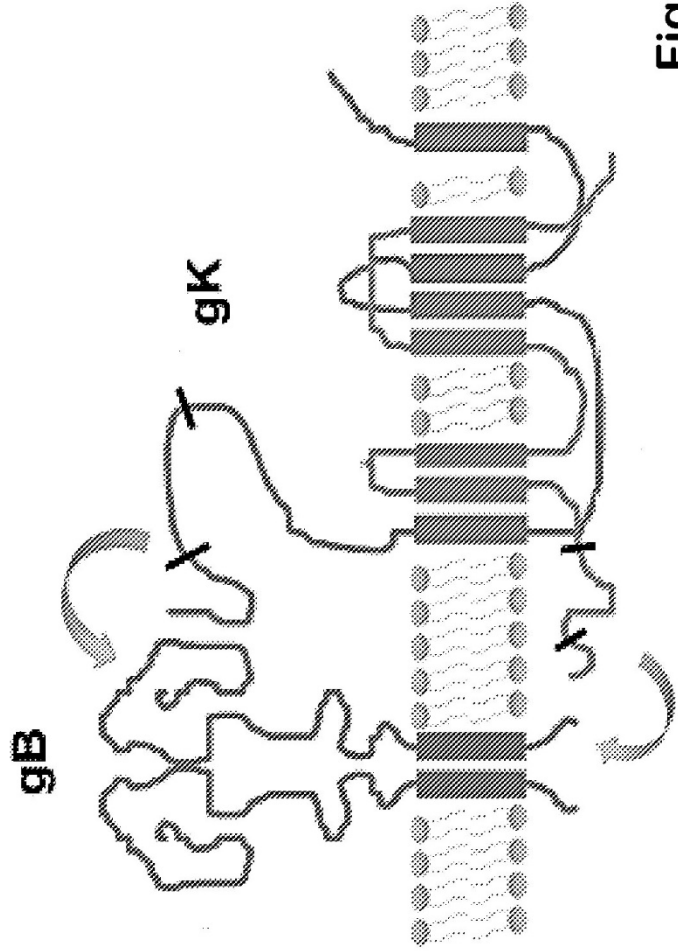


Fig. 1B

Fig. 2B

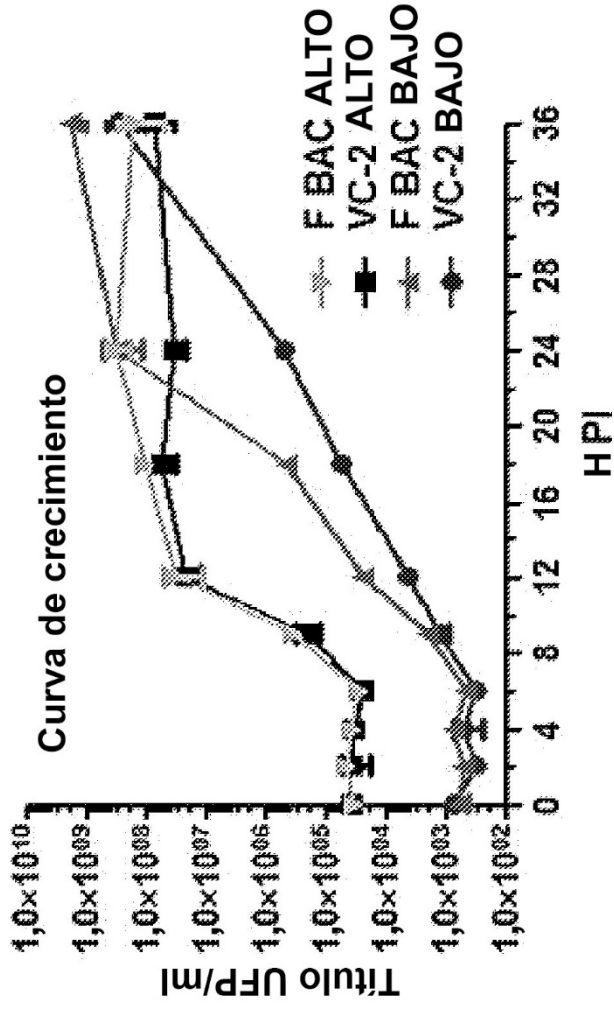


Fig. 2C

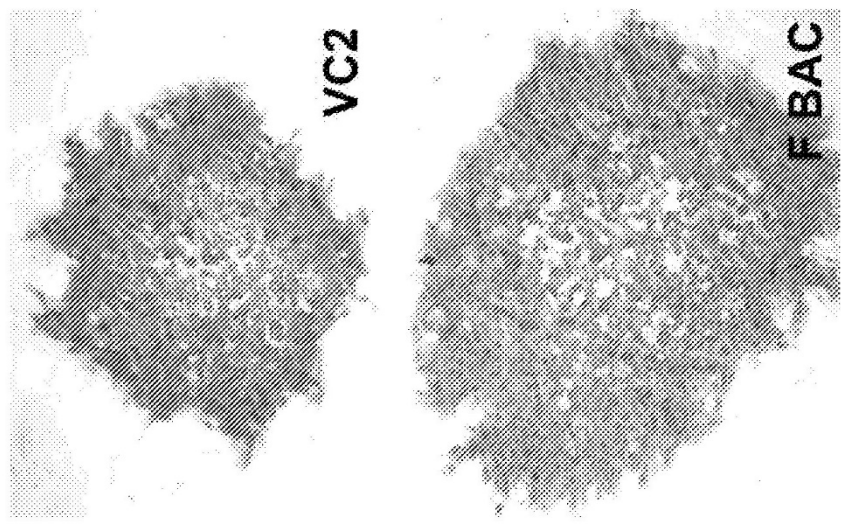
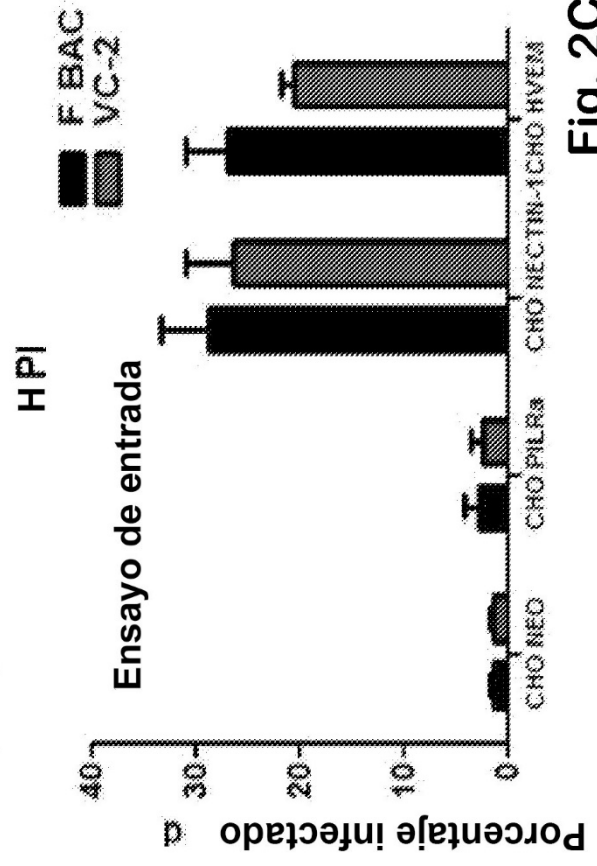
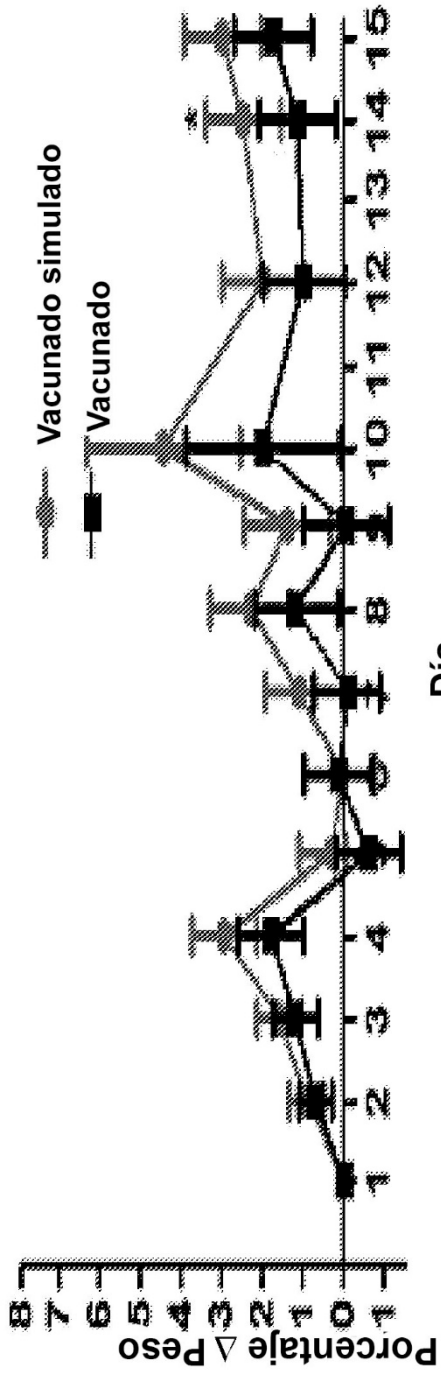
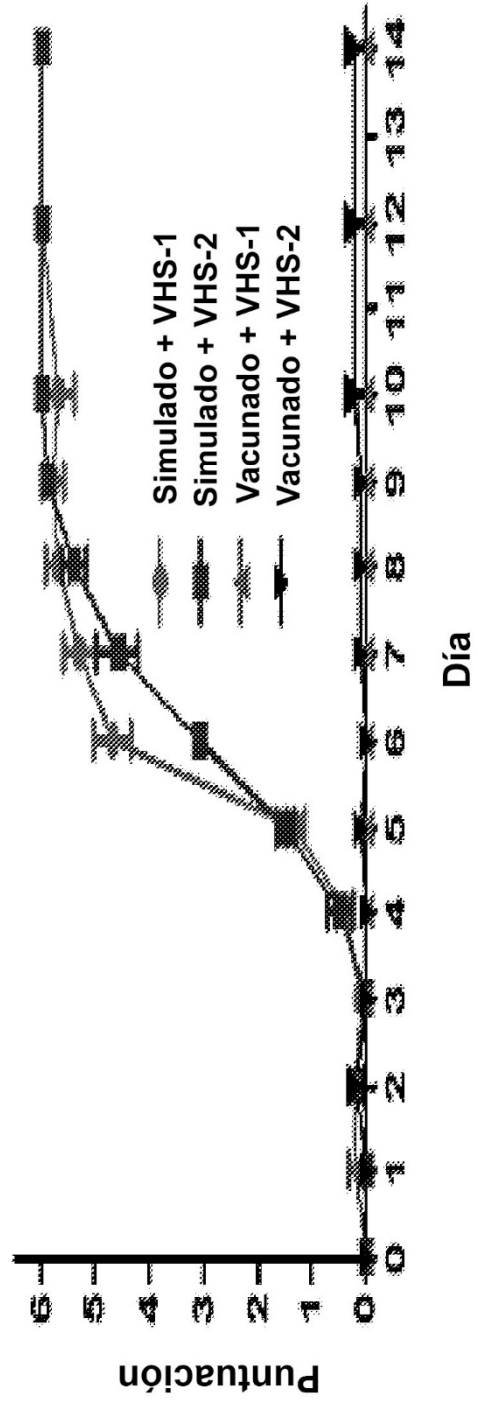


Fig. 2A



Día
Fig. 3A



Día
Fig. 3B

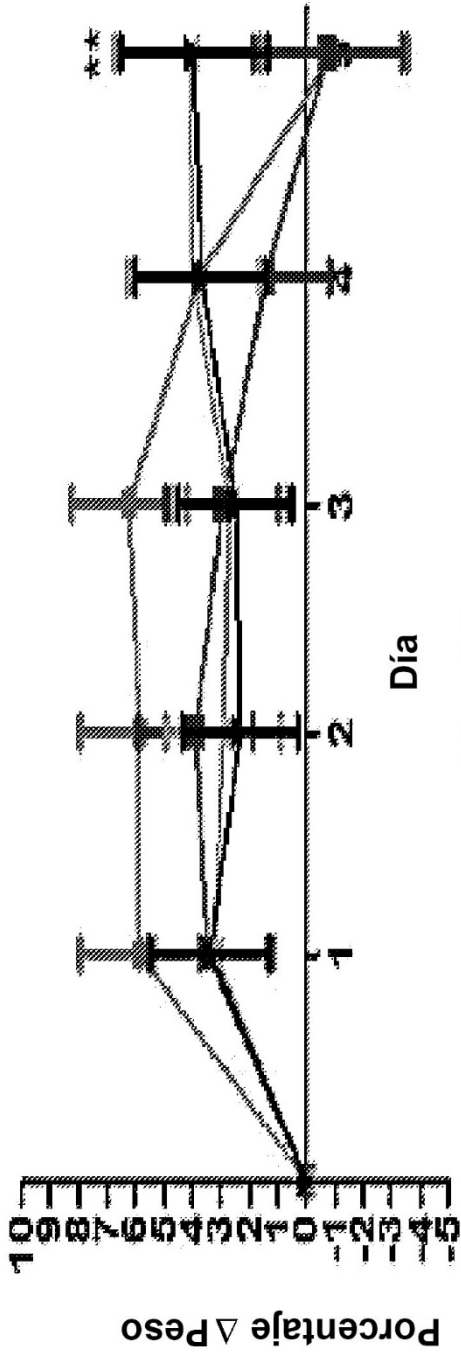


Fig. 3C

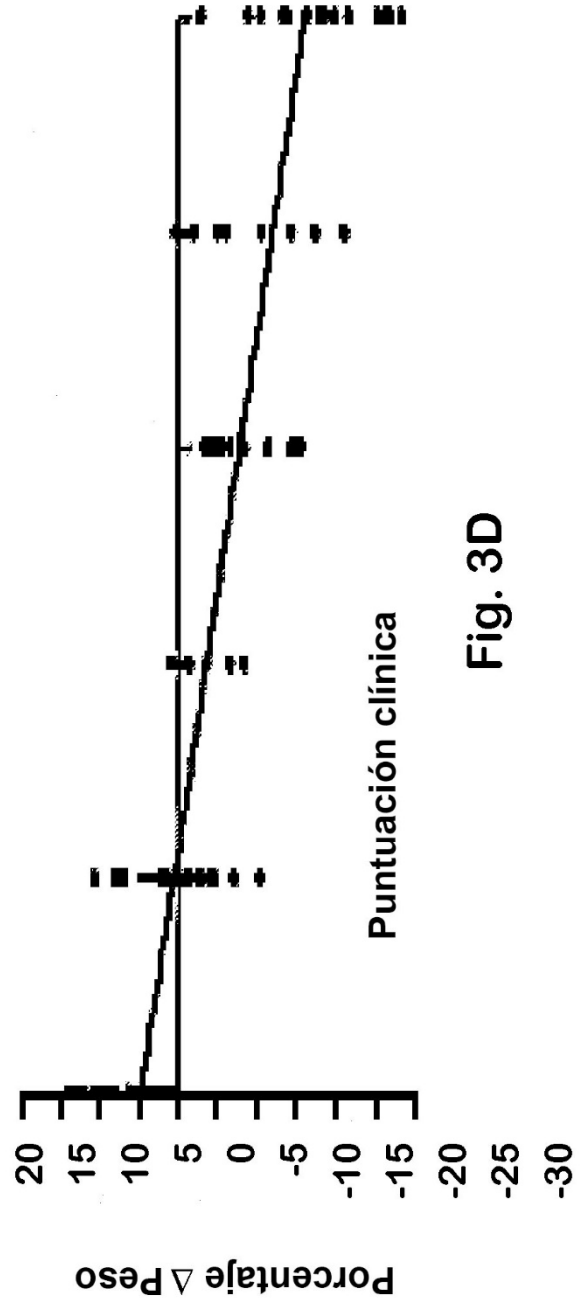


Fig. 3D



Fig. 4B

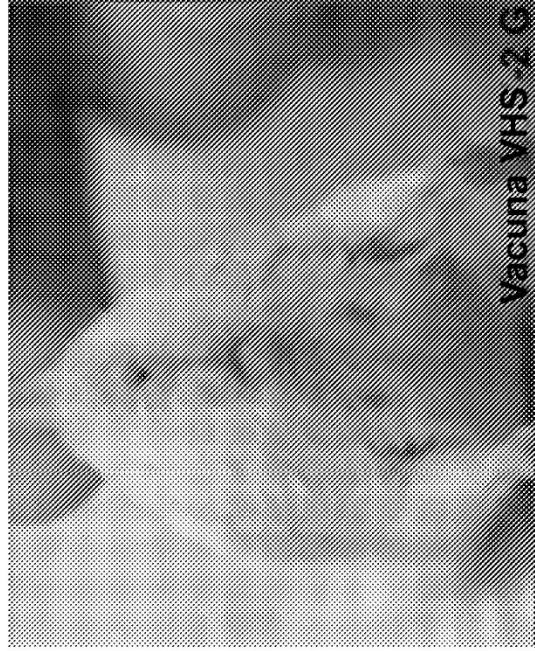


Fig. 4D



Fig. 4A

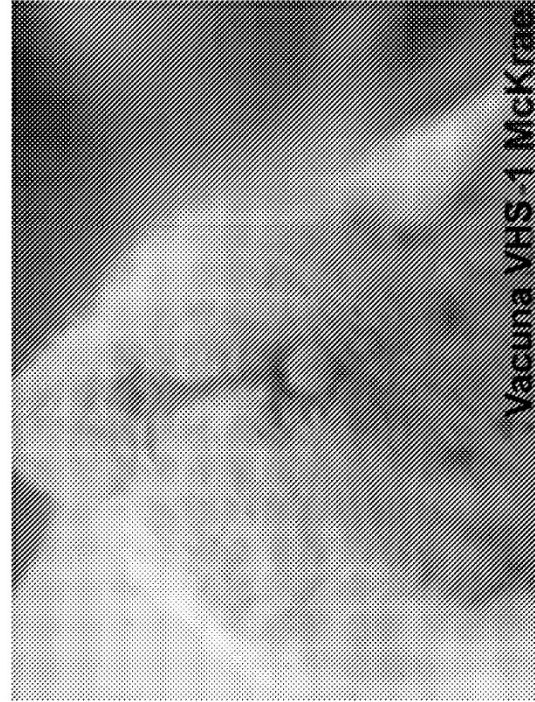


Fig. 4C

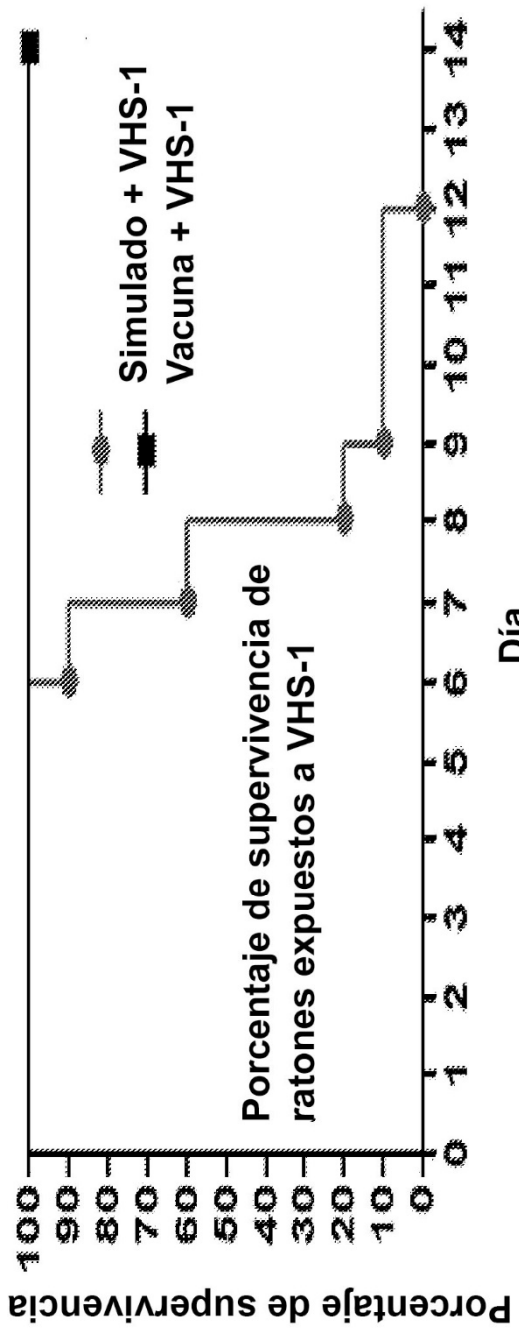


Fig. 5A

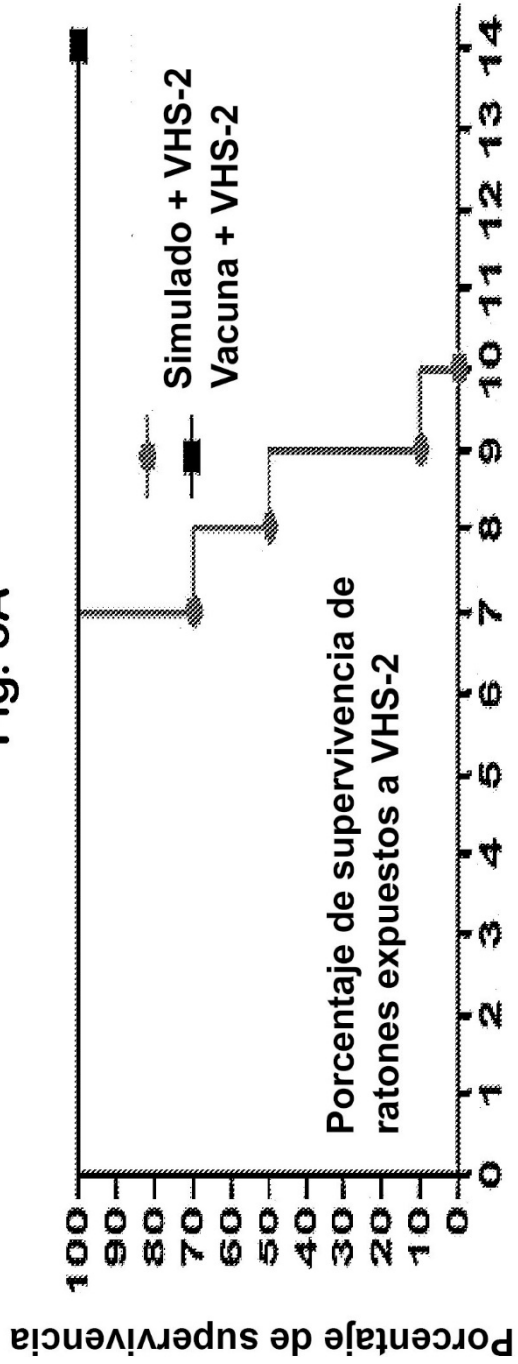


Fig. 5B

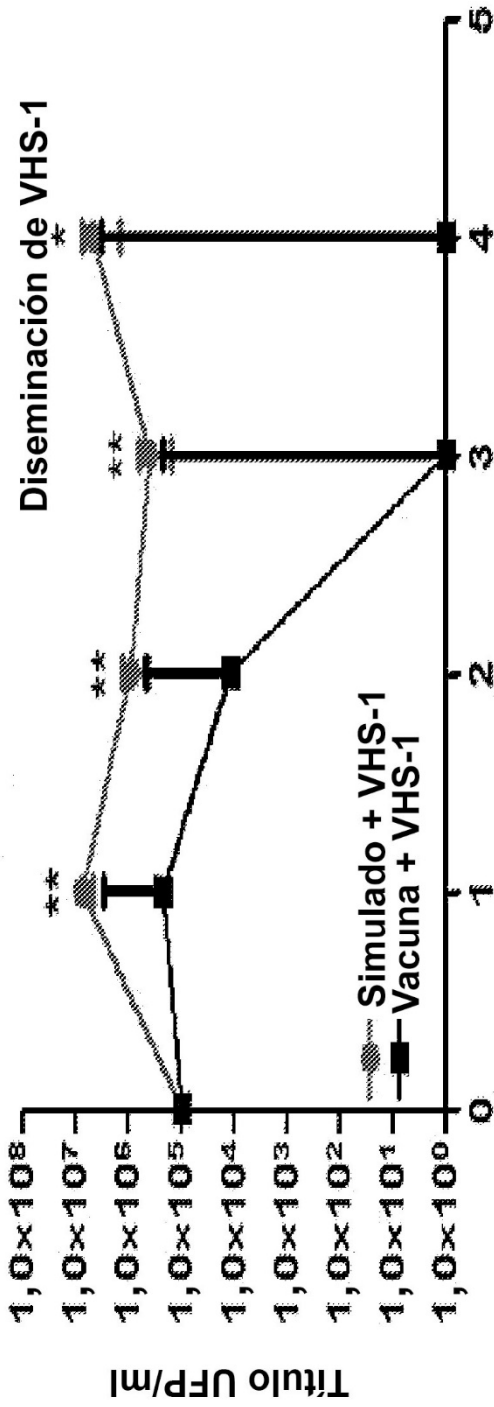


Fig. 6A

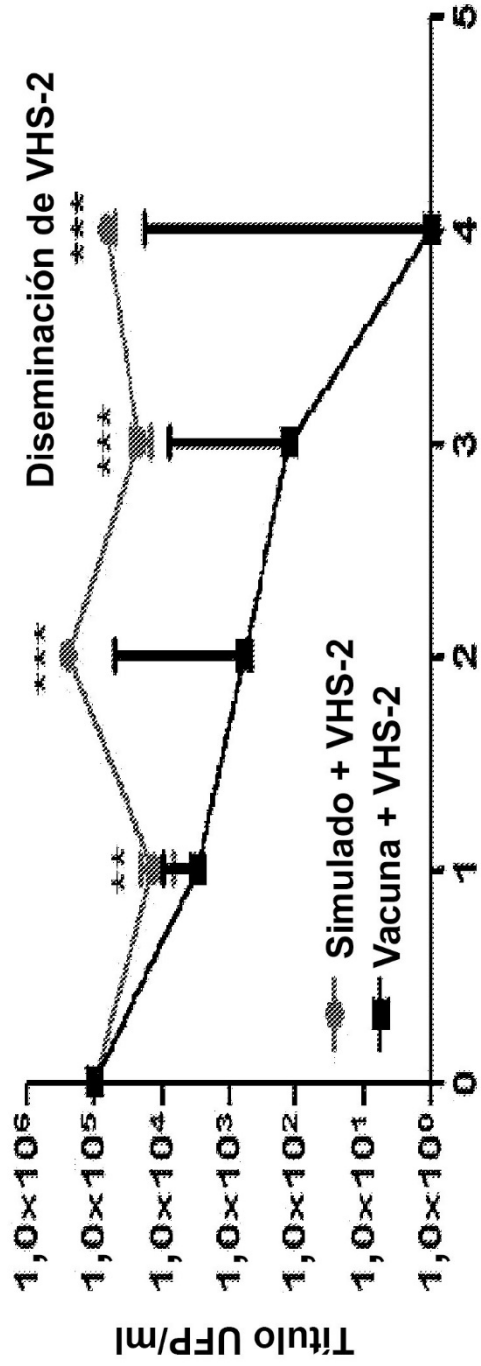


Fig. 6B

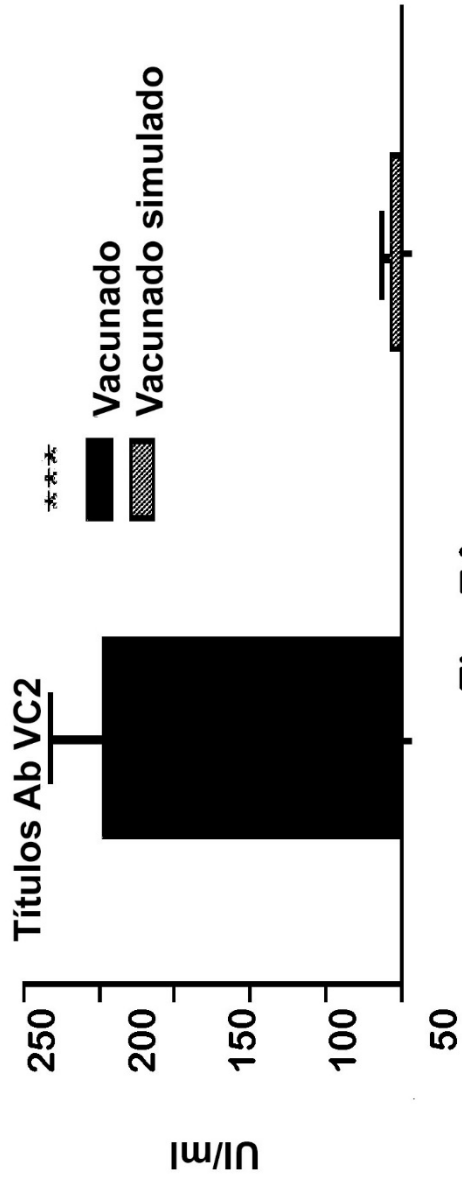


Fig. 7A

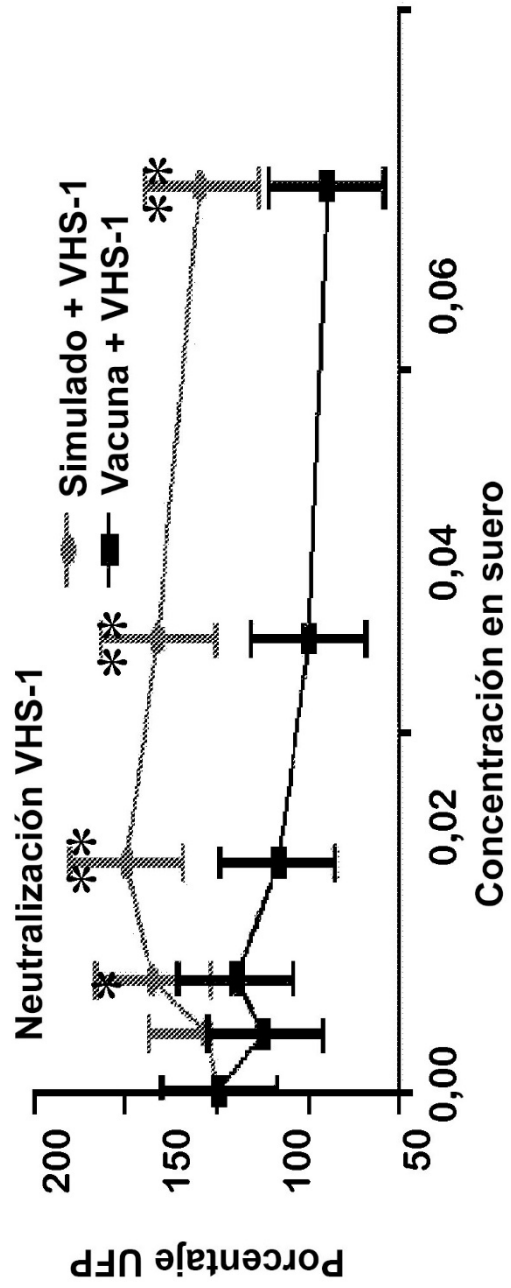


Fig. 7B

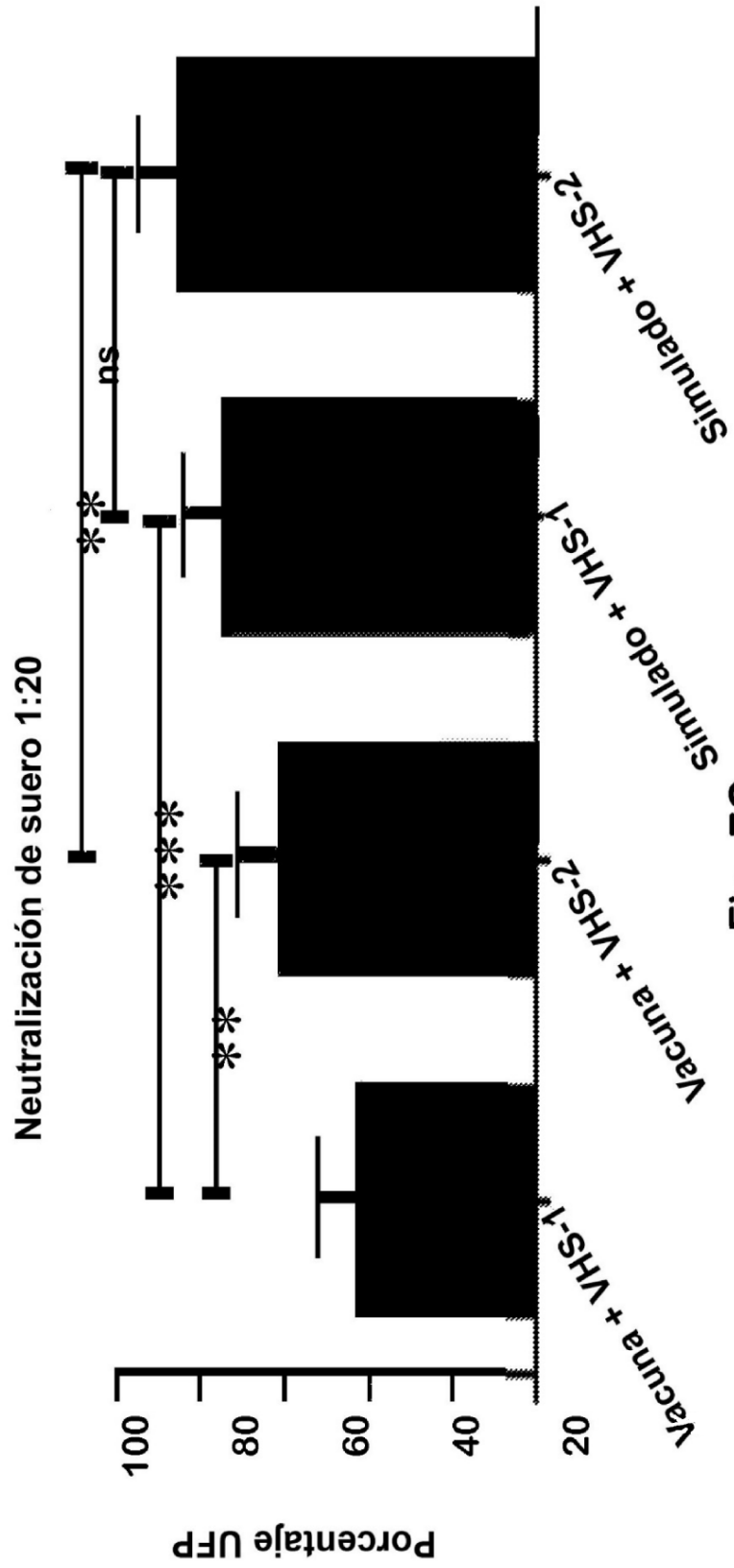


Fig. 7C

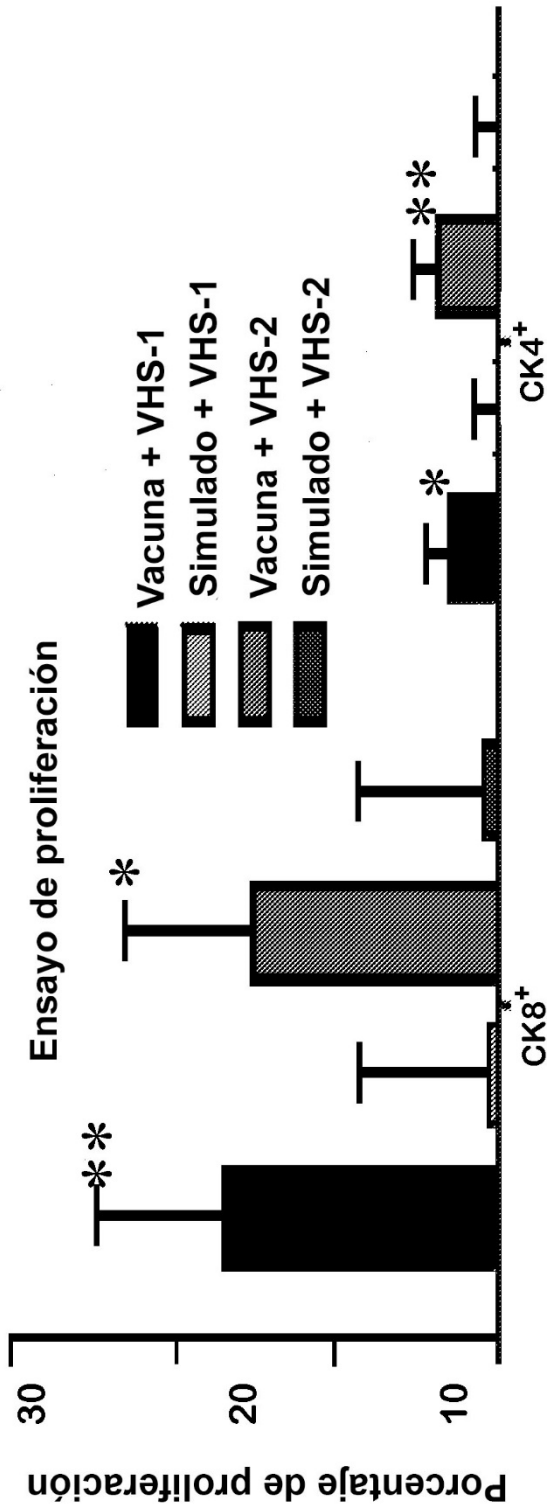


Fig. 8A

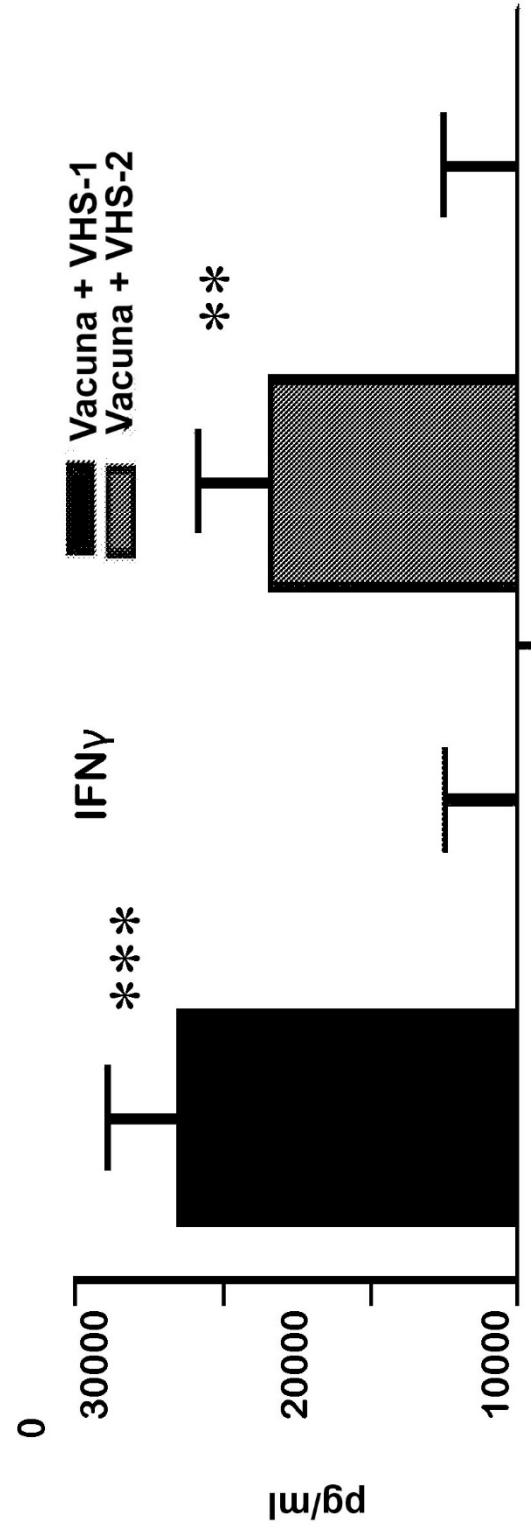


Fig. 8B

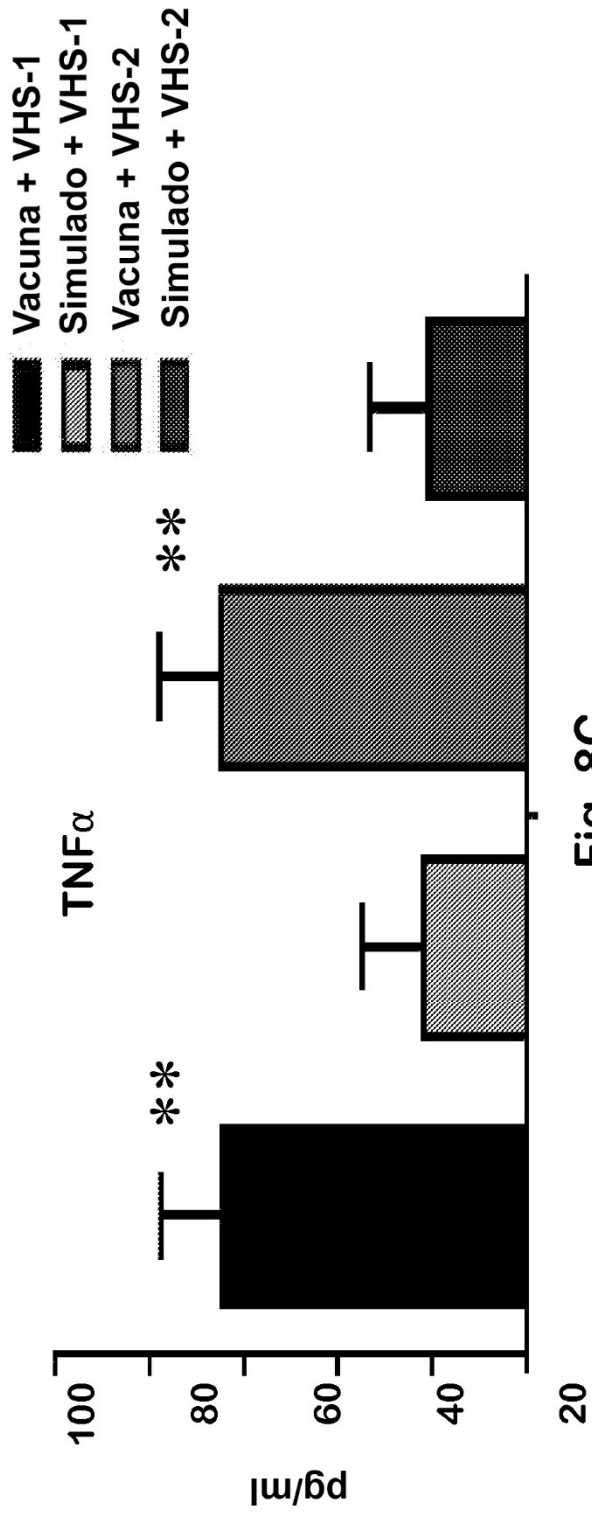


Fig. 8C

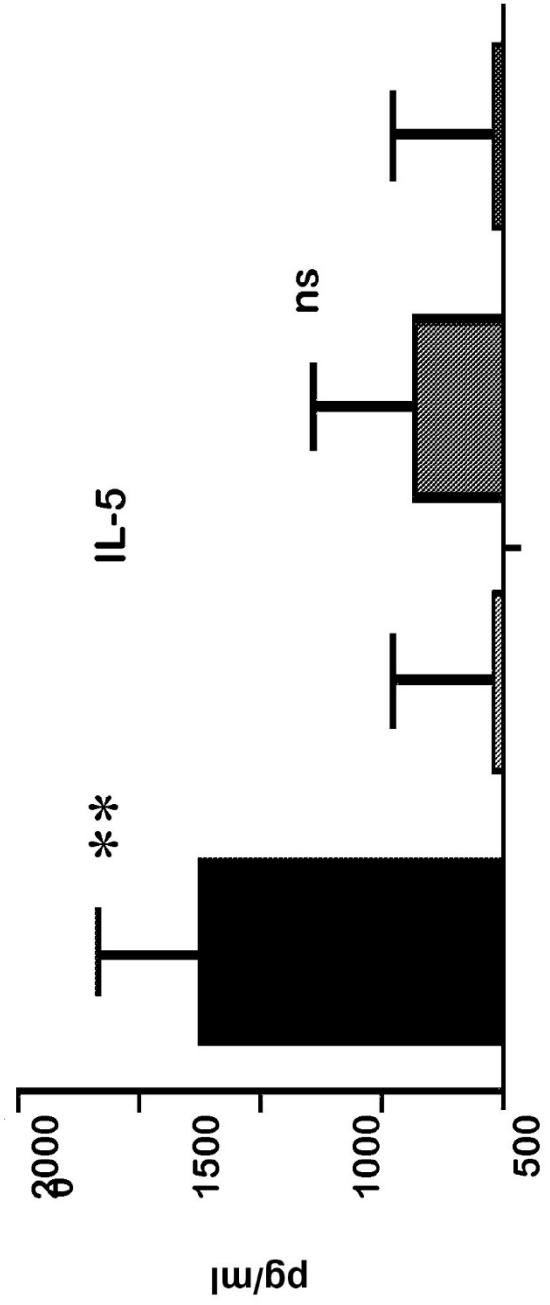
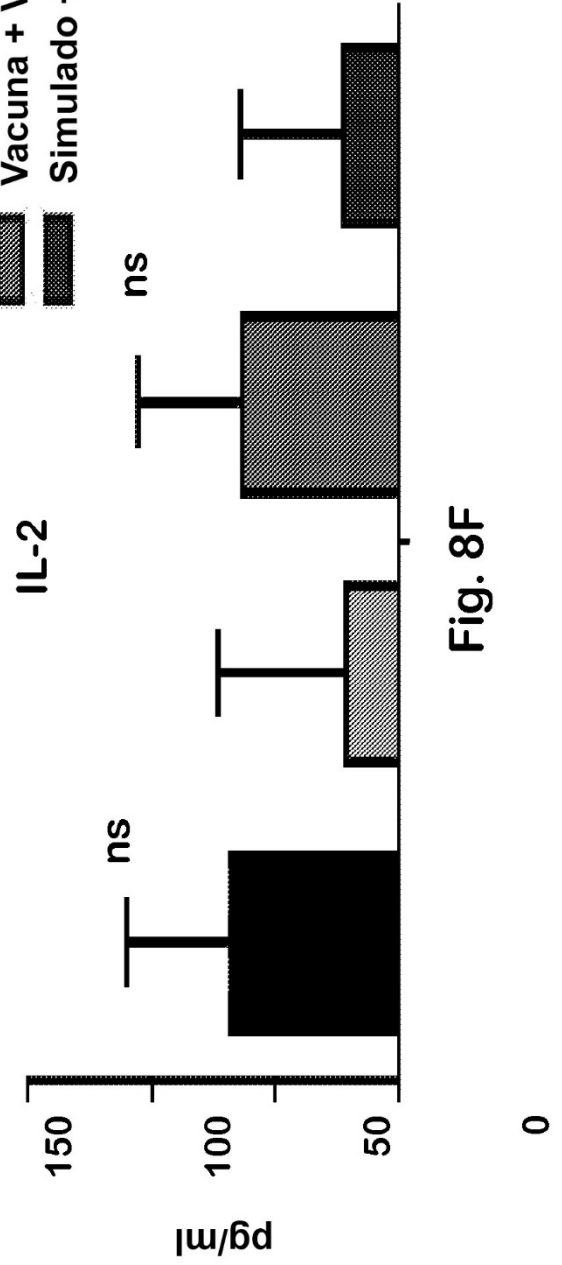
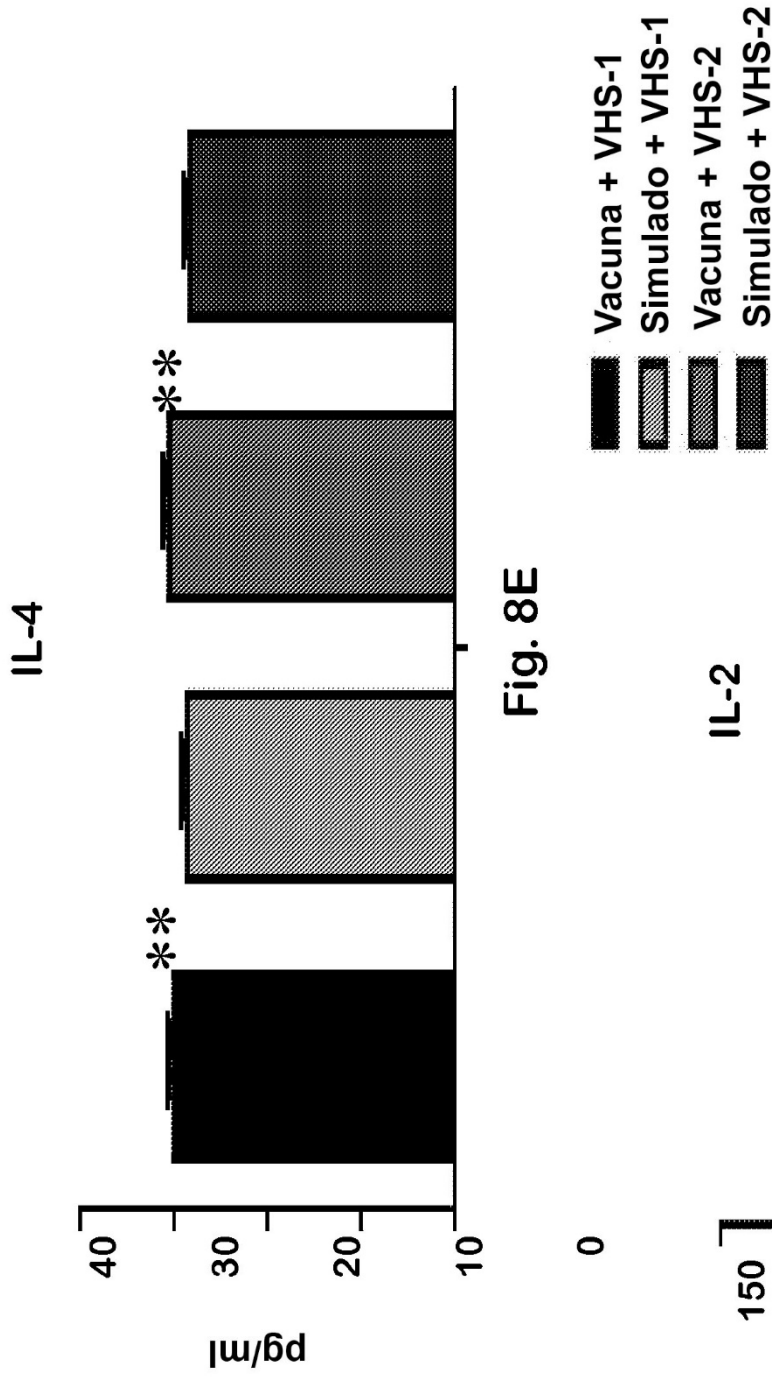


Fig. 8D



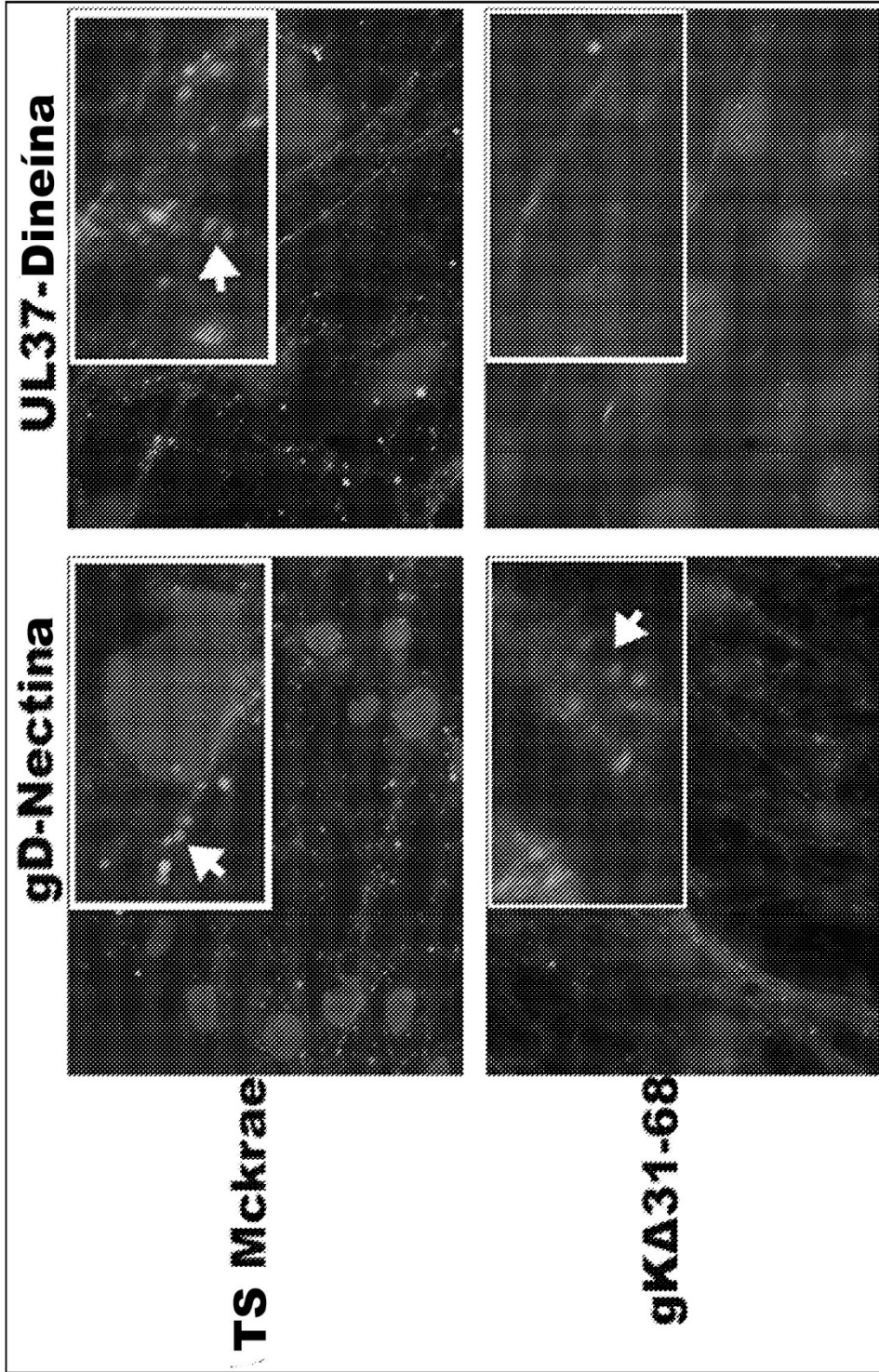


Fig. 9