



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 236**

51 Int. Cl.:
A61K 39/27 (2006.01)
C07K 14/03 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01921280 .2**
96 Fecha de presentación : **15.02.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1259258**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **Mutantes del EHV gM-negativos.**

30 Prioridad: **17.02.2000 EP 00103241**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2009

73 Titular/es: **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es: **Seyboldt, Christian;**
Osterrieder, Nikolaus y
Elbers, Knut

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 322 236 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

Mutantes del EHV gM-negativos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a virus del herpes equino (EHV) en los que el gen gM está esencialmente ausente y en los que gM está modificado y no es funcional con respecto a su capacidad inmunomoduladora. Otros aspectos de la invención se refieren a los ácidos nucleicos que codifican dichos virus, a composiciones farmacéuticas que comprenden estos virus o estos ácidos nucleicos y a sus usos. La invención se refiere también a métodos para mejorar la respuesta inmune inducida por una vacuna de EHV frente a las infecciones de EHV natural, a métodos para la profilaxis y tratamiento de las infecciones de EHV y a métodos para distinguir a los animales infectados con EHV natural de los animales tratados con los EHV según la invención.

15 **Antecedentes de la invención**

El virus del herpes equino 1 (EHV-1), un miembro de la familia *Alphaherpesvirinae*, es la principal causa del aborto inducido por virus en los équidos y produce enfermedades respiratorias y neurológicas. Ha sido determinada la secuencia completa del DNA del EHV-1 cepa Ab4p (Telford, E. A. R. *et al.*, 1992); sin embargo, sólo algunos genes y productos génicos han sido caracterizados como relacionados con la virulencia del EHV.

Para el control de las infecciones por EHV-1, se siguen dos métodos diferentes. En primer lugar, se han desarrollado vacunas vivas modificadas (las MLV), que incluyen la cepa RacH (Mayr, A. *et al.*, 1968; Hübert, P. H. *et al.*, 1996), que es muy utilizada en Europa y en Estados Unidos. En segundo lugar, se han evaluado en cuanto a su potencial inmunógeno y protector las vacunas inactivadas y las glucoproteínas virales expresadas independientemente. Entre las glucoproteínas que fueron expresadas usando baculovirus recombinantes están las glucoproteínas (g) B, C, D, y H, que indujeron una protección parcial frente a la subsiguiente exposición a la infección por EHV-1 en un modelo murino (Awan, A. R. *et al.*, 1990; Tewari, D. *et al.*, 1994; Osterrieder, N. *et al.*, 1995; Stokes, A. *et al.*, 1996). Sin embargo, el uso de las MLV tiene ventajas sobre las vacunas muertas y las vacunas de subunidades. Las MLV son muy eficaces para inducir respuestas inmunes mediadas por las células, que son, lo más probablemente, las responsables de la protección frente a la enfermedad (Allen, G. P. *et al.*, 1995; Mumford, J. A. *et al.*, 1995).

Las glucoproteínas del virus del herpes están implicadas de forma crucial en las primeras etapas de la infección, en la liberación de los viriones desde las células, y en la dispersión directa célula a célula de los viriones por fusión de las células vecinas. Hasta la fecha, se han identificado 11 glucoproteínas codificadas en el virus *herpes simplex* de tipo 1 (HSV-1) y se las ha denominado gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, y gM. Los mutantes de HSV-1 que carecen de gC, gE, gG, gI, gJ, y gM son viables, lo que indica que estos genes son prescindibles para la replicación en células cultivadas. La comparación de las secuencias de nucleótidos del HSV-1 y del virus del herpes equino 1 reveló que todas las glucoproteínas conocidas del HSV-1 se conservan en el EHV-1. De acuerdo con la nomenclatura actual, estas glucoproteínas se designan por los nombres de sus homólogas del HSV-1. Es sabido que las gC, gE y gI de EHV-1 no son esenciales para el crecimiento en cultivo celular, mientras que las gB y gD son esenciales para el crecimiento del virus en células cultivadas. No se conocen las contribuciones de otras glucoproteínas de EHV-1 a la replicación en células cultivadas (Flowers, C. C. *et al.*, 1992). Se determinaron los mapas de seis glucoproteínas de cubierta del EHV-1 usando una genoteca de expresión con *lgt11* y anticuerpos monoclonales (Mab) producidos frente a EHV-1 purificado (Allen, G. P. *et al.*, 1987). Además, los análisis de transcripción y los análisis de proteínas han demostrado que las glucoproteínas gB, gC, gD, gG, gH, y gK se expresan en las células infectadas con EHV-1. La glucoproteína gM (codificada por el gen UL10 [Baines, J. D. *et al.*, 1991; Baines, J. D. *et al.*, 1993]) es la más reciente glucoproteína de HSV-1 que ha sido analizada en detalle. Es la única glucoproteína descrita como no esencial que se conserva en todas las subfamilias de virus del herpes y ha sido descrita para los citomegalovirus humanos y murinos y para los miembros de la familia *Gammaherpesvirinae*, EHV-2, virus del herpes saimiri, y virus de Epstein-Barr. Como muchas glucoproteínas de los virus del herpes, la gM del HVS-1 (HVS-1 gM) está presente en los viriones y membranas de las células infectadas. Los mutantes de HVS-1 que únicamente carecen de gM crecieron hasta títulos reducidos aproximadamente 10 veces en relación a los del virus natural y demostraron una menor virulencia en un modelo murino (Baines, J. D. *et al.*, 1991; MacLean, C. A. *et al.*, 1993). El homólogo de gM en EHV-1 (gp21/22a; denominada como EHV-1 gM de aquí en adelante) fue descrito en primer lugar por Allen y Yeargan (Allen, G. P. *et al.*, 1987) y se demostró que era un constituyente principal de la cubierta del virus. Otros investigadores revelaron que el gen 52, el gen homólogo del UL10 de HSV-1, codifica los 450 aminoácidos del polipéptido EHV-1 gM (Pilling, A. *et al.*, 1994; Telford, E. A. R. *et al.*, 1992). EHV-1 gM representa una proteína hidrófoba múltiple que contiene ocho dominios transmembranales previstos de la que se ha descrito que está presente en las células infectadas y en los viriones purificados como una proteína de M_r 45.000 (Pilling, A. *et al.*, 1994; Telford, E. A. R. *et al.*, 1992).

65 En 1996 Osterrieder *et al.*, a partir de los experimentos que compararon las características de penetración de un mutante viral (L11ΔgM) portador del gen *lacZ* de *Escherichia coli* insertado en el gen de gM de EHV-1 cepa RacL11 (marco de lectura abierto 52) con las características del parental EHV-1 RacL11, llegaron a la conclusión de que EHV-1 gM desempeña un importante papel en la penetración del virus dentro de la célula diana y en

la dispersión del virus de célula a célula. En 1997, Neubauer *et al.*, demostraron que el mutante de inserción de gM en EHV-1 descrito antes, es atenuado y produce inmunidad protectora como se demuestra por la evaluación de los anticuerpos neutralizantes del virus y de las células T específicas de EHV-1 en los bazos de ratones inmunizados.

El problema técnico subyacente en esta invención fue proporcionar nuevos virus del herpes equino modificados que demuestren una significativa mejora de las propiedades inmunógenas cuando se usan para la profilaxis y tratamiento de las infecciones de EHV.

Descripción de la invención

Se llega a la solución del problema técnico mencionado por la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Se ha encontrado con sorpresa que hay una mejora medible de la inmunidad protectora asociada con el virus del herpes equino si la proteína gM está esencialmente ausente o si se modifica dicha proteína y con ello se la hace no funcional con respecto a su supuesta capacidad inmunomoduladora. Por tanto, se ha demostrado por primera vez, que la proteína gM modula las propiedades inmunógenas del EHV. De forma interesante, el mutante viral previamente discutido L11ΔgM y HΔgM-Ins también provoca las propiedades inmunógenas de las cepas parentales RacL11 y RacH. Aunque los autores de Osterrieder *et al.*, 1996 y Neubauer *et al.*, 1997 no detectaron gM en los virus HΔgM-Ins con el anticuerpo disponible en aquel tiempo, el mutante HΔgM-Ins seguía demostrando un potencial inmunomodulador similar a la cepa parental que produce gM. Esto es debido probablemente a la parte restante de gM que se expresa en HΔgM-Ins a pesar del inserto lacZ, como se demostró por el análisis de transferencia Western en los ejemplos descritos. Esta porción restante de gM debe ser por tanto la responsable de la acción inmunomoduladora de gM. En consecuencia, la presente invención proporciona por primera vez un EHV en el que la proteína gM está esencialmente ausente.

En un aspecto, la presente invención se refiere al virus del herpes equino en el que la proteína gM está esencialmente ausente.

El término “esencialmente ausente” se usa aquí a causa de la posición del gen vecino, que codifica la proteína esencial homólogo UL9 (gen 53), a causa de su orientación y solapamiento con el gen que codifica la proteína gM, lo que hace necesario, que permanezca una mínima secuencia nucleotídica del gen de gM para permitir la expresión del gen 53 y con ello mantener la viabilidad del virus. Una realización preferida se refiere al EHV en el que al menos 70% del gen de gM está ausente mientras que en una realización más preferida se reivindica un EHV en el que al menos 80% del gen de gM está ausente y en una realización aún más preferida se reivindica un EHV en el que al menos 90% del gen de gM está ausente.

El término proteína gM “no funcional” debe ser interpretado con respecto al impacto inmunomodulador de la proteína en relación a la interacción virus-hospedante. La diferencia entre el potencial inmunógeno de un EHV según la invención cuando se compara con otras cepas de EHV que expresan gM funcional, se puede determinar por medio de modelos animales estándar disponibles para el experto medio en los últimos adelantos de la técnica de la virología veterinaria. Un posible procedimiento para determinar si un EHV expresa gM funcionalmente o no funcionalmente se da en el ejemplo 1. Dicho procedimiento proporciona una base experimental precisa y recta para determinar la diferencia en la capacidad inmunomoduladora de una cepa modificada de EHV de interés en comparación con las cepas que se diferencian sólo en que expresan una proteína gM completa y funcional sin modificar. El procedimiento descrito en el ejemplo 1 es especialmente adecuado ya que el comportamiento de las cepas de EHV en los ratones BALB/c se corresponde con el de los virus individuales en el hospedante natural (Mayr, A. *et al.*, 1968; vanWoensel, P. A. M. *et al.*, 1995; Colle, C.F. *et al.*, 1996; Hübert, P. H. *et al.*, 1996; Matsumura, T. *et al.*, 1996).

Para suprimir la proteína gM de un EHV o hacerla no funcional, son posibles diferentes métodos (Sambrook, J. *et al.* 1989). Ejemplos no limitantes incluyen la delección, mutación, o inserción en el gen que codifica la proteína gM. La delección de la correspondiente secuencia nucleotídica completa o parcial de dicho virus puede dar como resultado la ausencia completa o la expresión no funcional de la proteína gM. Se puede alcanzar también el mismo resultado mutando la secuencia nucleotídica o insertando nucleótidos adicionales dentro del gen o en su región reguladora. En una realización preferida de ambos aspectos mencionados, la descripción se refiere a los EHV según la invención que se modifican por una delección, mutación, o inserción en el gen que codifica la proteína gM.

El ORF (marco de lectura abierto) de gM se solapa con el ORF de UL9 y las secuencias promotoras (posición 94389 a 97052, proteína de unión a Ori, Telford *et al.*, 1992). La proteína codificada por el ORF de UL9 es esencial para el crecimiento del virus como se muestra a manera de ejemplo para HSV-1. (Carmichael *et al.*, 1988; Malik *et al.*, 1992). Por tanto, en una realización más preferida, la descripción se refiere a los EHV que se caracterizan porque el gen que codifica la proteína gM ha sido suprimido o modificado y la expresión del gen que codifica el homólogo UL9 (gen 53) no ha sido afectada. El término “no afectada” no se refiere a ciertas propiedades cuantitativas

ES 2 322 236 T3

o cualitativas de UL9 sino que significa simplemente que la expresión del gen no ha sido afectada en cuanto que dicha proteína es expresada por el virus y está presente en una cantidad esencialmente suficiente para la viabilidad del virus.

5 La presente invención describe un EHV más preferido para practicar la invención en el que se suprimen los nucleótidos 93254 a 94264 como se numeran para la cepa de virus EHV-1 Ab4p (Telford, E. A. R. *et al.*, 1992) a modo de ejemplo o los correspondientes a los mismos en otras cepas. La delección de estos 1010 nucleótidos del ORF de gM de 1352 nucleótidos todos juntos, da como resultado la ausencia esencial de cualquier péptido gM detectable. Esta delección casi completa de los nucleótidos del gen de gM sigue proporcionando un virus viable que esencialmente no expresa los derivados de la proteína gM, con lo que no se afecta la expresión de todos los otros genes de EHV-1. Esta particular delección no afecta la expresión del ORF de UL9.

15 Las posiciones de nucleótidos mencionadas antes se refieren al EHV-1 cepa Ab4p como han sido numeradas por Telford *et al.*, 1992 (genoteca GenBank/EMBL (número de acceso M86664)). Estas posiciones de nucleótidos no están limitadas de ningún modo a las posiciones exactas como se definen para la cepa Ab4p de EHV-1 sino que se usan simplemente a modo de ejemplo para indicar los nucleótidos que están en estas posiciones o que corresponden a las posiciones del gen de gM en otras cepas de EHV. Para diferentes virus EHV la numeración de las posiciones de los ácidos nucleicos preferidos puede ser diferente pero un experto en el campo de la biología molecular de los virus de la familia *Alphaherpesvirinae* podrá identificar fácilmente estos nucleótidos preferidos por su posición relativa a los otros nucleótidos de dichas secuencias. Es importante para la viabilidad del virus que los genes vecinos al gen de gM sean expresados funcionalmente.

20 La cepa de EHV más preferida según la invención es la cepa HΔgM-3b1 de EHV-1 depositada con el número de acceso 99101536 ante la ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, GB).

25 La invención es particularmente adecuada para el EHV de tipo 1 y 4 ya que ambos tipos están muy estrechamente relacionados (Telford, E. A. R. *et al.*, 1992 y 1998).

30 Los EHV de la presente invención son particularmente útiles para la terapia génica, para transportar material heterólogo en general, y en particular para transportar antígenos extraños para uso en vacunas vivas (sobre EHV como vector heterólogo, véanse los documentos EP 507179, WO 9827216, WO 9400587, WO 9827216). Cuando un EHV de la invención expresa material heterólogo en un animal, no hay ningún efecto sobre las propiedades inmunológicas relacionadas con la gM. El EHV es especialmente adecuado para inmunizar frente a otros patógenos cuando los antígenos con propiedades inmunológicamente relacionadas se expresan después de la inserción de las correspondientes secuencias nucleotídicas en el genoma de EHV de los virus según la invención. Las vacunas con vector de virus del herpes están entre los últimos adelantos de la técnica (véase Schmitt, J. *et al.*, 1999, Peeters, B. *et al.*, 1997, Yokoyama *et al.*, 1998). Por tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere también a los EHV según la invención que portan uno o más genes heterólogos.

40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a los ácidos nucleicos que codifican el EHV según la invención. Los nucleótidos son útiles para modificar adicionalmente el EHV o para la producción recombinante de los EHV según la invención. También son útiles para generar vacunas basadas en ácidos nucleicos.

45 A causa de las mejores propiedades inmunológicas asociadas con los EHV que expresan una gM modificada no funcional o que no expresan gM en absoluto, los EHV de la invención son particularmente adecuados como ingredientes activos en una composición farmacéutica para la profilaxis y tratamiento de las infecciones por EHV. Por tanto, en un aspecto más, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un EHV según la invención.

50 Los nucleótidos de la invención son útiles también para preparar vacunas con vector de DNA. En estas vacunas, los nucleótidos se aplican directamente al animal o indirectamente por medio de vectores distintos del virus original. Las vacunas de nucleótidos y las vacunas de vectores son bien conocidas dentro de los últimos adelantos de la técnica y no se elaborarán adicionalmente.

55 En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según la invención. La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden los EHV según la invención.

60 Un ejemplo no limitante de una composición farmacéutica que comprende un EHV según la invención, dado únicamente para fines de demostración, se podría preparar como sigue: el sobrenadante del cultivo celular de un cultivo celular infectado se mezcla con un estabilizante (por ejemplo, espermidina y/o BSA (seroalbúmina bovina)) y después se liofiliza la mezcla o se deshidrata por otros métodos. Antes de la vacunación, dicha mezcla se rehidrata entonces en soluciones acuosas (por ejemplo solución salina, PBS (solución salina tamponada con fosfato)) o no acuosas (por ejemplo, emulsión oleosa, adyuvante con base de aluminio).

65 El EHV y sus nucleótidos son particularmente adecuados para su uso en la preparación de una composición farmacéutica.

Una "composición farmacéutica" consta esencialmente de uno o más ingredientes capaces de modificar las funciones fisiológicas, por ejemplo las funciones inmunológicas, del organismo, si se administra a un organismo vivo o se aplica en su superficie como los antibióticos o antiparasitarios, pero sin restringirse a ellos, y consta también de otros constituyentes añadidos a ella para alcanzar ciertos objetivos como aspectos del proceso, esterilidad, estabilidad, posibilidad de administrar la composición por las vías enteral o parenteral, tales como la vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica u otra vía adecuada, tolerancia después de la administración, propiedades de liberación controlada, pero sin limitarse a ellos.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para mejorar la respuesta inmune inducida por una vacuna de virus del herpes equino frente a infecciones del virus natural, caracterizado porque la vacuna comprende un virus del herpes equino según la invención.

Un aspecto más se refiere al uso de una composición farmacéutica según la invención para la profilaxis y/o tratamiento de un animal.

Otro aspecto de una moderna vacuna viva de EHV es su capacidad para distinguirse de los virus naturales. Los EHV de la presente invención difieren de los aislados naturales en al menos una propiedad importante. Ellos proporcionan una proteína gM modificada de manera significativa. O bien la gM está esencialmente ausente o bien está modificada hasta un grado en que este objetivo antigénico específico difiere suficientemente de la gM de los virus naturales.

Una realización preferida se refiere a un método para distinguir un animal infectado con un virus natural del herpes equino de un animal tratado con un virus del herpes equino modificado según la invención, caracterizado porque se establece la identidad de una proteína gM en el virus de campo o la identidad de una proteína gM tal como se expresa en el virus modificado o su ausencia esencial en éste.

Una realización más preferida se refiere al método mencionado anteriormente, que se caracteriza porque

a) se añade una muestra de interés a un aislado de gM o a derivados modificados de esta proteína,

b) se añade un anticuerpo específico para el aislado de la proteína gM o para los derivados modificados de la misma,

c) se determina la unión de dicho anticuerpo.

Una realización más preferida se refiere a un método para distinguir un animal infectado con un virus del herpes equino natural de un animal tratado con un virus del herpes equino modificado según la invención, caracterizado porque se establece la diferencia en los ácidos nucleicos que codifican la proteína gM del virus de campo y los ácidos nucleicos que codifican la proteína gM modificada, o la ausencia de los mismos.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a kits para realizar los métodos preferidos para distinguir los animales infectados con EHV natural de los animales tratados con los EHV modificados según la invención. Es preferible que contengan uno o más de los útiles analíticos, tampones, útiles marcadores y lectores, disolventes y dispositivos mecánicos en un kit adecuado. Los útiles analíticos específicos preferidos son, aislado de proteína gM natural, aislado de proteína gM modificada, anticuerpos específicos para la proteína gM natural, anticuerpos específicos para el aislado de la proteína gM modificada, así como sondas específicas de nucleótidos que se unen a los nucleótidos que codifican la proteína gM natural y sondas específicas de nucleótidos que se unen a los nucleótidos que codifican la proteína gM modificada.

Referencias

Allen, G. P., Yeargan, M., Costa, L. R. R. and Cross, R., 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **69**, 608-612.

Allen, G. P. and Yeargan, M. R., 1987. Use of λ gt11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **61**, 2454-2461.

Awan, A. R., Chong, Y.-C. and Field, H. J., 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: A new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* **71**, 1131-1140.

Baines, J. D. and Roizman, B., 1991. The open reading frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* **65**, 938-944.

Baines, J. D. and Roizman, B., 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **67**, 1441-1452.

- Carmichael, E. P., Kosovsky M. J. and Weller, S. K., 1988.** Isolation and characterization of herpes simplex virus type 1 host range mutants defective in viral DNA synthesis. *J. Virol.* **62**(1), 91-99.
- Day, L., 1999.** Characterisation of selected glycoproteins of equine herpesvirus-1: immune responses in the murine model. *PhD thesis, Department of Microbiology, University of Leeds, UK.*
- Flowers, C. C. and O'Callaghan, D. J., 1992.** The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) homolog of herpes simplex virus type 1 US9 and the nature of a major deletion within the unique short segment of the EMV-1 KyA strain genome. *Virology* **190**, 307-315.
- Hübert, P. H., Birkenmaier, S., Rziha, H. J. and Osterrieder, N., 1996.** Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain RacH during attenuation. *J. Vet. Med. B* **43**, 1-14.
- Kyhse-Andersen, J., 1984.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-210.
- Laemmli, U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- MacLean, C. A., Robertson, L. M. and Jamieson, F. E., 1993.** Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **74**, 975-983.
- Malik, A. K., Martinez, R., Muncy, L., Carmichael, E. P. and Weller, S. K., 1992.** Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene: isolation of a LacZ insertion mutant and expression in eukaryotic cells. *Virology* **190**(2), 702-715.
- Mayr, A., Pette, J., Petzoldt, K. and Wagener, K., 1968.** Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med. B* **15**, 406-418.
- Meindl, A. and Osterrieder, N., 1999.** The equine herpesvirus 1 Us2 homolog encodes a nonessential membrane-associated virion component *J. Virol.*, **73**(4):3430-7, 1999.
- Mumford, J. A., Hannant, D. A., Jessett, D. M., O'Neill, T., Smith, K. C. and Ostlund, E. N., 1995.** Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with liquid herpesvirus-1. In "Proceedings 7th International Conference of Equine Infectious Disease" (H. Nakajima and W. Plowright, Eds.) pp. 261-175. *R&W Publ., Newmarket, U. K. United Kingdom.*
- Neubauer, A., Beer, M., Brandmüller, C., Kaaden, O.-R. and Osterrieder, N., 1997.** Equine herpesvirus 1 mutants devoid of glycoprotein B or M are apathogenic for mice but induce protection against challenge infection. *Virology* **239**, 36-45.
- Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Braun, B., Kaaden, O.-R. and Baines, J. D., 1996.** The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of virology*, June 1996, p. 4110-4115.
- Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmüller, C., Schmidt, P., Wolf, H. and Kaaden, O.-R., 1995.** Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology* **208**, 500-510.
- Peeters, B., Biendowska-Szewczyk, K., Hulst, M., Giellens, A. and Kimman, T., 1997.** Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J. Gen. Virol.* **78**, 3311-3315.
- Pilling, A., Davison, A. J., Telford, E. A. R. and Meredith, D. M., 1994.** The equine herpesvirus type 1 glycoprotein homologous to herpes simplex virus type 1 glycoprotein M is a major constituent of the virus particle. *J. Gen. Virol.* **75**, 439-442.
- Sambrook, J., Fritsch, D. F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd. ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Schmitt J. Becher, P., Thiel, H. J. and Keil, G. M., 1999.** Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. *J. Gen. Virol.* **84**, 2839-2848.
- Stokes A., Alber, D. G., Greensill, J., Amellal, B., Carvalho, R., Taylor, L. A., Doel T. R., Killington, R. A., Halliburton, I. W. and Meredith, D. M., 1996.** The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* **40**, 91-107.

Telford E. A. R., Watson, M. S., McBride, K. and Davison, A. J., 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**, 304-316.

5 Telford E. A. R., Watson, M. S., Perry, J., Cullinane, A. A. and Davison, A. J., 1998. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *Journal of Gen. Virol.* **79**, 1197-1203.

Tewari D. Whalley, J. M., Love, D. N. and Field, H. J., 1994. Characterisation of immune responses to baculovirus expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J. Gen. Virol.* **75**, 1735-1741.

10 Yokoyama, N., Fujita, K., Damiani A., Sato, E., Kurosawa, K., Miyazawa, T., Ishiguro, S., Mochizuki, M., Maeda, K. and Mikami, T., 1998. Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 vector expressing feline calicivirus immunogenic antigen. *J. Vet. Med. Sci.* **60**, 717-723.

15 Leyendas de las figuras

Figura 1

Análisis de la media del peso corporal

20

La Figura 1 muestra las medias de los pesos corporales dadas en porcentaje relativo al peso corporal medio de los grupos en el día de la exposición a la infección.

25 Los grupos inmunizados con HΔgM-3b1 (grupos 7 a 9) se compararon con todos los otros grupos inmunizados para analizar un efecto beneficioso potencial de este virus cuando se compara con los otros dos virus, ya que este virus presenta una delección esencialmente completa de la glucoproteína M (los aminoácidos 70-406 están suprimidos), mientras que en el caso de HΔgM-Ins (grupos 4 a 6) el marco de lectura abierto de gM se interrumpe por la inserción de una casete LacZ. Sin embargo, este mutante del virus aún es capaz de expresar la porción del carboxi-terminal (probablemente empezando en el residuo de metionina en la posición 226) del marco de lectura abierto de la gM. El RacH (grupos 1 a 3) es el virus parental tanto de HΔgM-3b1 como de HΔgM-Ins y representa una cepa de vacuna muy utilizada.

30 Los animales vacunados con HΔgM-3b1 tienen la más baja reducción transitoria del peso corporal en aquellos ratones vacunados con 10^3 PFU (grupo 9) comparados con los grupos vacunados con 10^3 PFU de HΔgM-Ins (grupo 6) o con 10^3 PFU de RacH (grupo 3). La dependencia de la dosis en la prevención de la reducción de peso después de la exposición a la vacuna es más baja en los grupos vacunados con HΔgM-3b1 (grupos 7 a 9) en comparación con los grupos vacunados con HΔgM-Ins (grupos 4 a 6) o con RacH (grupos 1 a 3).

40 Figura 2

Análisis del título de virus

45 El día 1 post infección (p.i.), se realizó la autopsia de 2 animales, el día 3 p.i. de 3 animales, y el día 5 p.i. de 2 animales, por grupo. Se prepararon los pulmones del ratón, se homogenizaron con arena de mar, y se suspendieron en 1 ml de CMEM-FCS al 10%. Se determinó el título del virus en el homogenato de pulmón por un ensayo en placas como ha sido descrito por Neubauer *et al.*, 1997. Los datos indican que después de la inmunización con HΔgM-3b1 (grupos 7 a 9), la cantidad de virus EHV re-aislado del tejido pulmonar (cada pulmón se preparó por separado y en la figura se da la media de los títulos de virus obtenidos de los pulmones individuales) se reduce en comparación con los ratones inmunizados con HΔgM-Ins (grupos 4 a 6) o con RacH (grupos 1 a 3). Este efecto es aún más fuerte con la dosis de vacunación más baja (10^3 PFU) de los respectivos virus, que con las dosis más altas (10^4 o 10^5 PFU). También se acorta la duración de la viremia, ya que la cantidad de virus, que se pueden re-aislar de los animales vacunados con HΔgM-3b1 después de 5 días está marcadamente reducida en comparación con los ratones vacunados con HΔgM-Ins o con RacH, especialmente en los grupos vacunados con la dosis de 10^3 PFU.

Figura 3

60 *Análisis por transferencia Western*

Análisis por transferencia Western de lisados de células infectadas usando el mab 3F6 anti-gB (Allen and Yeargan, 1987; amablemente proporcionado por Dr. G. Allen, Lexington, Ky, EE.UU.) (A) o el mab A8 anti-gM (amablemente proporcionado por Dr. R. A. Killington, Leeds, GB) (B). Los lisados celulares se suspendieron en el tampón de la muestra e inmediatamente se separaron por SDS-10%-PAGE. Se transfirieron las proteínas a láminas de nitrocelulosa, se incubaron con los mab, y se detectaron como se detalla en la sección de Materiales y métodos. Pista 1: células infectadas con RacH; Pista 2: células infectadas con HΔgM-Ins (mutante de inserción); Pista 3: células infectadas con HΔgM-3b1; Pista 4: células infectadas con el segundo pase de HΔgM-3b1 sobre células Rk13. En el panel A,

la identificación específica de gB en las células infectadas con RacH, HΔgM-Ins y HΔgM-3b1 indica claramente la expresión de la proteína viral y la replicación del virus en las células infectadas. Los dímeros y oligómeros de gB son claramente visibles lo que indica un procesamiento apropiado de la glucoproteína. En el panel B, el anticuerpo monoclonal A8 detectó la proteína gM con el peso molecular aparente esperado en las células infectadas con RacH (pista 1). En el HΔgM-Ins, el marco de lectura abierto se interrumpe por el gen lacZ insertado. Por tanto, la proteína gM identificada específicamente tiene un peso molecular aparente más bajo (pista 2). Como la intensidad de la señal de transferencia Western de la proteína gM expresada por HΔgM-Ins es comparable a la señal obtenida en las células infectadas por RacH, esto indica claramente que la truncación no produce la anulación de la expresión de la proteína gM ni la degradación inmediata de la proteína en las células infectadas. Adicionalmente, la porción del carboxi terminal de gM parece que se expresa en el caso de HΔgM-Ins ya que el anticuerpo A8 se dirige frente a la porción hidrófila del extremo carboxi terminal de gM. En las pistas 3 y 4, no se puede detectar ninguna proteína gM como era de esperar después de la delección de las correspondientes secuencias de nucleótidos en HΔgM-3b1 como se ha descrito anteriormente.

15 *Materiales y métodos (análisis de transferencia Western)*

Para el análisis de transferencia Western, los lisados de las células infectadas se ajustaron a concentraciones iguales de proteínas usando el ensayo BCATM (Pierce), se suspendieron en solución tampón de la muestra (concentración final: Tris-Cl 50 mM, pH 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) al 3,2%; 2-mercaptoetanol al 5%; glicerol al 10%). Se mantuvieron las muestras sobre hielo durante todo el procedimiento y no se calentaron. Se separaron las proteínas por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida (PAGE) con SDS al 10% (Laemmli, 1970), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll) por el método semi-seco (Kyhse-Andersen, 1984). Después de la transferencia, se incubaron las membranas en leche descremada al 10% en solución salina tamponada con fosfato que contiene Tween 20 al 0,05% (PBS-T) durante 16 horas a 4°C. Se lavaron las membranas dos veces en PBS-T durante 10 min a temperatura ambiente antes de que se añadieran el anticuerpo monoclonal (mab) 3F6 anti-gB (Allen and Yeargan, 1987) o el mab A8 anti-gM (Day, 1999) en PBS-T a las diluciones indicadas. Las láminas de nitrocelulosa se incubaron con los mab durante 1 hora a temperatura ambiente antes de realizar dos lavados con PBS-T (10 min, temperatura ambiente). Los mab unidos se detectaron con anticuerpos de inmunoglobulina G anti-ratón conjugada con peroxidasa (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente según las instrucciones del proveedor. Después de dos etapas finales de lavado (PBS-T, 10 min), se visualizaron las bandas reactivas por el aumento de la quimioluminiscencia (ECLTM, Amersham-Parmacia) según las instrucciones del proveedor.

35 *Figura 4*

Descripción esquemática del genoma de HΔgM-3b1

40 Mapa de restricción con BamHI y organización genómica de la región gM del virus EHV-1 RacH y estructura del virus RacH con gM negativa, HΔgM-3b1. Se dan los sitios enzimáticos de restricción usados para la clonación, así como las escalas.

45 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Ensayo del impacto de la gM sobre las propiedades inmunógenas del virus

Diseño experimental

Se dividieron aleatoriamente ratones BALB/c (Charles River) de tres a cuatro semanas de edad en 10 grupos constituidos por 14 animales cada uno y se inmunizaron intranasalmente (i.n.) con RacH (grupos 1 a 3), con el mutante de inserción gM-negativo, HΔgM-Ins (Neubauer *et al.*, 1997) (grupos 4 a 6) o con el virus HΔgM-3b1 que carece esencialmente de todo el marco de lectura abierto de gM (grupos 7 a 9). Se inmunizaron los ratones con una única aplicación de 1×10^5 unidades formadoras de placas (PFU) (grupos 1, 4, 7), 1×10^4 PFU (grupos 2, 5, 8), o 1×10^3 PFU (grupos 3, 6, 9) en 20 μ l como se indica. La infección simulada de los ratones (grupo 10) se hizo usando 20 μ l de DMEM-FCS al 10%. 29 días después de la inmunización, se infectaron los ratones i.n. con 1×10^5 PFU de la cepa RacL11 suspendidas en 20 μ l. Los pesos corporales de los ratones individuales se puntuaron diariamente desde el día de la infección (día 0) hasta el día 13. Los pesos corporales relativos (en %) se determinaron los días 0 a 13 de acuerdo con la ecuación: peso del día n/peso del día 0 x 100. El día 1 post infección (p.i.), se realizó la autopsia de 2 animales, el día 3 p.i. de 3 animales, y el día 5 p.i. de 2 animales por grupo. Se prepararon los pulmones del ratón, se homogenizaron con arena de mar, y se suspendieron en 1 ml de CMEM-FCS al 10% (Meindl y Osterrieder, 1999). Se determinaron los títulos del virus en los pulmones murinos sobre células Rk13 (Neubauer *et al.*, 1997). Los análisis estadísticos de los pesos corporales registrados diariamente se realizaron como se describe más adelante.

ES 2 322 236 T3

Objetivo del estudio

El objetivo principal de este estudio fue demostrar las diferencias en el potencial protector después de la inmunización con HΔgM-3b1 (grupos 7 a 9) cuando se compara con RacH (grupos 1 a 3) y con HΔgM-Ins (grupos 4 a 6) como se determina por el parámetro del peso corporal después de la exposición a la infección con una cepa virulenta de EHV-1. Los objetivos secundarios fueron comparar los grupos 1 a 9 con el grupo infectado de forma simulada (grupo 10). Los grupos inmunizados con HΔgM-3b1 (grupos 7 a 9) se compararon con todos los otros grupos inmunizados para analizar un efecto beneficioso potencial de este virus cuando se compara con los otros dos virus, ya que este virus presenta una delección esencialmente completa de la glucoproteína M, mientras que en el caso de HΔgM-Ins (grupos 4 a 6) el marco de lectura abierto de gM está únicamente interrumpido por la inserción de una casete LacZ. Sin embargo, este mutante del virus aún es capaz de expresar la porción del carboxi-terminal del marco de lectura abierto de la gM. El RacH (grupos 1 a 3) es el virus parental tanto de HΔgM-3b1 como de HΔgM-Ins y representa una cepa de vacuna muy utilizada.

15

Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó usando el programa SAS (Heidelberg) Win Version 6.12 en un PC.

20 Para evaluar el criterio principal de evaluación, se realizó un análisis de varianza de las medidas repetidas con PROC GLM en SAS, con un informe CONTRAST para realizar comparaciones específicas entre los grupos seleccionados. Se usó PROC GLM (Generalized Linear Model) en lugar de PROC ANOVA para tener en cuenta la situación de desequilibrio (diferente número de animales en diferentes días).

25

Programa:

30

```
proc glm data=maus.obser;
```

```
class group;
```

```
model coll--coll4=group;
```

35

```
14 veces repetido (1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14) /resumen;
```

```
contraste 'grupo 10 frente a otros' grupo -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 9;
```

```
contraste 'grupo 7 frente a grupo 4' grupo 0 0 0 -1 0 0 1 0 0 0;
```

40

```
contraste 'grupo 7 frente a grupo 1' grupo -1 0 0 0 0 0 1 0 0 0;
```

```
contraste 'grupo 8 frente a grupo 2' grupo 0 -1 0 0 0 0 0 1 0 0;
```

45

```
contraste 'grupo 8 frente a grupo 5' grupo 0 0 0 0 -1 0 0 1 0 0;
```

```
contraste 'grupo 9 frente a grupo 3' grupo 0 0 -1 0 0 0 0 0 1 0;
```

```
contraste 'grupo 9 frente a grupo 6' grupo 0 0 0 0 0 -1 0 0 1 0;
```

50

```
means group / waller;
```

```
run; quit;
```

55

60

65

ES 2 322 236 T3

Resultados de las evaluaciones del peso corporal

Peso medio de los ratones por grupo, en gramos										
<i>Las desviaciones estándar de los grupos se dan en letra cursiva</i>										
DPI*	Grupo No.									
	1		2		3		4		5	
0	16,58	<i>0,8469</i>	17,67	<i>1,1585</i>	17,12	<i>1,0871</i>	16,94	<i>1,0603</i>	16,80	<i>1,1350</i>
1	16,68	<i>0,8432</i>	17,69	<i>0,9844</i>	17,04	<i>1,0058</i>	17,00	<i>1,1754</i>	16,94	<i>1,0867</i>
2	16,64	<i>0,8437</i>	17,36	<i>0,9459</i>	16,44	<i>1,0390</i>	18,91	<i>1,2538</i>	16,74	<i>0,9904</i>
3	15,02	<i>0,8451</i>	15,41	<i>1,0361</i>	14,71	<i>0,9307</i>	15,92	<i>1,5361</i>	15,76	<i>1,2168</i>
4	14,66	<i>1,2315</i>	14,57	<i>1,1995</i>	13,73	<i>0,9326</i>	15,52	<i>1,8727</i>	15,58	<i>1,2695</i>
5	15,51	<i>1,7635</i>	15,42	<i>1,3433</i>	13,92	<i>1,2286</i>	16,31	<i>1,6221</i>	16,81	<i>1,1692</i>
6	16,19	<i>1,4357</i>	16,02	<i>1,2215</i>	14,54	<i>1,5804</i>	16,68	<i>1,1977</i>	16,69	<i>1,1357</i>
7	16,52	<i>1,2090</i>	16,66	<i>1,2205</i>	15,26	<i>1,5153</i>	16,91	<i>1,3459</i>	16,70	<i>0,9209</i>
8	16,70	<i>1,0296</i>	17,26	<i>0,9693</i>	15,84	<i>1,2634</i>	17,14	<i>1,4034</i>	16,68	<i>0,8931</i>
9	16,60	<i>1,2506</i>	17,33	<i>1,0436</i>	16,31	<i>1,2655</i>	17,04	<i>1,0628</i>	16,75	<i>0,7635</i>
10	16,88	<i>1,0685</i>	17,54	<i>1,0293</i>	16,44	<i>1,0114</i>	17,39	<i>1,1305</i>	16,82	<i>0,8035</i>
11	16,55	<i>1,0747</i>	17,50	<i>0,9092</i>	16,81	<i>0,9634</i>	17,40	<i>1,2689</i>	16,78	<i>0,6706</i>
12	16,67	<i>0,9004</i>	17,63	<i>0,9517</i>	16,87	<i>0,8118</i>	17,31	<i>0,8494</i>	16,92	<i>0,7808</i>
13	16,73	<i>0,8066</i>	17,86	<i>1,0130</i>	16,93	<i>1,1191</i>	17,31	<i>0,9100</i>	16,92	<i>0,5811</i>
14	17,13	<i>0,9873</i>	17,99	<i>1,3184</i>	17,06	<i>1,0518</i>	17,56	<i>0,8080</i>	17,10	<i>0,7099</i>

*DPI = Días post infección

Peso medio de los ratones por grupo, en gramos										
<i>Las desviaciones estándar de los grupos se dan en letra cursiva</i>										
DPI*	Grupo No.									
	6		7		8		9		10	
0	17,27	<i>1,1339</i>	17,36	<i>0,9500</i>	17,14	<i>2,3207</i>	16,72	<i>0,9839</i>	16,71	<i>1,0418</i>
1	17,67	<i>0,7016</i>	17,53	<i>1,0266</i>	17,21	<i>2,2860</i>	16,81	<i>0,9841</i>	16,96	<i>0,8949</i>
2	17,73	<i>0,8097</i>	17,35	<i>1,0713</i>	17,27	<i>2,2001</i>	16,83	<i>1,0572</i>	16,46	<i>0,8653</i>
3	16,76	<i>1,0424</i>	16,33	<i>1,7499</i>	16,29	<i>2,5749</i>	16,08	<i>1,6208</i>	15,04	<i>0,8039</i>
4	16,22	<i>1,2952</i>	16,52	<i>2,2320</i>	16,05	<i>2,7071</i>	15,78	<i>2,1063</i>	13,97	<i>0,4880</i>
5	14,88	<i>1,6816</i>	17,56	<i>1,6396</i>	16,81	<i>2,8616</i>	16,64	<i>2,1378</i>	13,39	<i>0,4947</i>
6	15,31	<i>1,8380</i>	17,83	<i>1,1386</i>	16,92	<i>2,8217</i>	16,87	<i>1,4950</i>	12,85	<i>0,6285</i>
7	16,77	<i>2,0265</i>	18,20	<i>1,1437</i>	16,69	<i>2,8737</i>	17,10	<i>1,4787</i>	12,70	<i>1,2629</i>
8	17,00	<i>1,6817</i>	18,10	<i>1,1331</i>	16,93	<i>2,8099</i>	17,19	<i>1,1922</i>	12,66	<i>1,9100</i>
9	17,38	<i>1,4892</i>	18,18	<i>1,0759</i>	17,01	<i>2,5142</i>	17,31	<i>1,0699</i>	13,80	<i>2,0347</i>
10	17,52	<i>1,6130</i>	18,27	<i>1,0893</i>	17,07	<i>2,4635</i>	17,51	<i>1,0885</i>	14,15	<i>2,1142</i>
11	17,55	<i>1,5333</i>	18,32	<i>1,1179</i>	17,11	<i>2,1721</i>	17,44	<i>1,0706</i>	14,40	<i>1,9849</i>
12	17,77	<i>1,5410</i>	18,28	<i>1,0962</i>	17,24	<i>2,2693</i>	17,49	<i>1,0007</i>	14,78	<i>1,8945</i>
13	17,72	<i>1,5211</i>	18,55	<i>1,0095</i>	17,37	<i>2,4432</i>	17,47	<i>1,0128</i>	15,40	<i>1,5033</i>
14	17,68	<i>1,4959</i>	18,53	<i>1,0093</i>	17,43	<i>2,3915</i>	17,43	<i>1,1086</i>	15,83	<i>1,1615</i>

*DPI = Días post infección

ES 2 322 236 T3

1. Comparación de los animales infectados de forma simulada (grupo 10) con los animales inmunizados

La siguiente tabla demuestra que los pesos corporales medios de los animales inmunizados de forma simulada se redujeron de forma estadísticamente significativa (día 3) o muy estadísticamente significativa (días 4 a 13) después de la exposición a la infección cuando se comparan con todos los otros grupos.

TABLA 1

	Valor-F ¹	Valor-p
Grupo 10 frente a otros		
Día 1 ²	2,56	0,1156
Día 2	1,33	0,2541
Día 3	9,03	0,0040*
Día 4	20,46	0,0001**
Día 5	54,83	0,0001**
Día 6	72,31	0,0001**
Día 7	84,82	0,0001**
Día 8	61,62	0,0001**
Día 9	52,91	0,0001**
Día 10	40,47	0,0001**
Día 11	35,21	0,0001**
Día 12	24,18	0,0001**
Día 13	18,52	0,0001**

1 = estadístico de la prueba

2 = la estadística se da desde el día 1 al 13; en el día 0, todos los cálculos son idénticos (los pesos se ajustan al 100 %)

* = estadísticamente significativo (< 0,05)

** = muy estadísticamente significativo (< 0,0001)

2. Comparación de los animales inmunizados con HΔgM-3b1 (grupo 7, 10⁵ PFU/animal), con los animales inmunizados con RacH (grupo 1, 10⁵ PFU) y con los animales inmunizados con HΔgM-Ins (grupo 4, 10⁵ PFU) con respecto al parámetro de eficacia, prevención de la reducción del peso corporal después de la exposición a la infección

Los resultados dados en la siguiente tabla demuestran que no se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas en la media de los pesos corporales en los grupos inmunizados con la dosis de virus más alta, sin importar el agente usado para la inmunización.

ES 2 322 236 T3

TABLA 2

		Valor-F ¹	Valor-p
5	Grupo 7 frente a grupo 4		
	Día 1 ²	0,00	0,9452
10	Día 2	0,27	0,6047
	Día 3	1,50	0,2257
	Día 4	1,85	0,1800
15	Día 5	0,82	0,3693
	Día 6	0,82	0,3683
20	Día 7	0,06	0,8112
	Día 8	0,38	0,5396
	Día 9	0,00	0,9765
25	Día 10	0,01	0,9246
	Día 11	0,03	0,8552
	Día 12	0,65	0,4228
30	Día 13	0,03	0,8535
	Grupo 7 frente a grupo 1		
35	Día 1	0,50	0,4831
	Día 2	2,54	0,1167
	Día 3	3,22	0,0782
40	Día 4	1,23	0,2719
	Día 5	0,40	0,5281
	Día 6	0,27	0,6030
45	Día 7	0,01	0,9287
	Día 8	0,12	0,7288
50	Día 9	0,03	0,8720
	Día 10	0,45	0,5048
	Día 11	0,13	0,7213
55	Día 12	0,64	0,4266
	Día 13	0,03	0,8588

60 1 = estadístico de la prueba

2 = la estadística se da desde el día 1 al 13; en el día 0, todos los cálculos son idénticos (los pesos se ajustan al 100 %)

65 * = estadísticamente significativo (< 0,05)

** = muy estadísticamente significativo (< 0,0001)

ES 2 322 236 T3

3. Comparación de los animales inmunizados con HΔgM-3b1 (grupo 8, 10⁴ PFU/animal) con los animales inmunizados con RacH (grupo 2, 10⁵ PFU) y con los animales inmunizados con HΔgM-Ins (grupo 5, 10⁴ PFU) con respecto al parámetro de eficacia, prevención de la reducción del peso corporal después de la exposición a la infección

5 La tabla que sigue presenta el análisis estadístico para los grupos de ratones que habían recibido 10⁴ PFU por animal y revela lo siguiente: las diferencias en la media de los pesos corporales fueron distintas de forma estadísticamente significativa entre los animales del grupo 8 (10⁴ PFU de HΔgM-3b1) y los del grupo 5 (HΔgM-Ins) en los días 1 y 11 a 13. Sin embargo, en los animales inmunizados con RacH (grupo 2), las diferencias en la media de los pesos corporales disminuyeron de forma significativa o muy significativa todos los días después de la infección cuando se comparan con los ratones inmunizados con HΔgM-3b1 (grupo 8).

TABLA 3

	Valor-F ¹	Valor-p
Grupo 8 frente a grupo 5		
Día 1 ²	6,91	0,0112*
Día 2	3,23	0,0782
Día 3	3,08	0,0849
Día 4	0,85	0,3614
Día 5	1,67	0,2014
Día 6	0,75	0,3911
Día 7	2,62	0,1113
Día 8	3,23	0,0779
Día 9	3,19	0,0800
Día 10	4,00	0,0506
Día 11	4,20	0,0453*
Día 12	5,75	0,0200*
Día 13	4,98	0,0299*
Grupo 8 frente a grupo 2		
Día 1	11,06	0,0016*
Día 2	10,75	0,0018*
Día 3	18,26	0,0001**
Día 4	14,56	0,0004*
Día 5	13,66	0,0005*

ES 2 322 236 T3

Día 6	12,44	0,0009*
Día 7	9,87	0,0028*
Día 8	11,07	0,0016*
Día 9	8,75	0,0046*
Día 10	10,08	0,0025*
Día 11	10,83	0,0018*
Día 12	10,36	0,0022*
Día 13	10,50	0,0021*

1 = estadístico de la prueba

2 = la estadística se da desde el día 1 al 13; en el día 0, todos los cálculos son idénticos (los pesos se ajustan al 100 %)

* = estadísticamente significativo (< 0,05)

** = muy estadísticamente significativo (< 0,0001)

4. Comparación de los animales inmunizados con HΔgM-3b1 (grupo 9, 10³ PFU/animal) con los animales inmunizados con RacH (grupo 3, 10³ PFU) y con los animales inmunizados con HΔgM-Ins (grupo 6, 10³ PFU) con respecto al parámetro de eficacia, prevención de la reducción del peso corporal después de la exposición a la infección

La tabla que sigue presenta los resultados para la dosis de inmunización más baja. Se puede resumir que los animales que recibieron HΔgM-3b1 en la dosis más baja presentaron una media de peso corporal significativamente (o muy significativamente) más alta, los días 4 a 9 cuando se comparan con los animales que recibieron idéntica dosis o de HΔgM-Ins o de RacH. Además, los animales inmunizados con RacH presentaron pesos corporales significativamente reducidos cuando se comparan con los ratones inmunizados con HΔgM-3b1 los días 1 a 3 después de la exposición a la infección.

TABLA 4

	Valor-F ¹	Valor-p
Grupo 9 frente a grupo 6		
Día 1 ²	0,00	0,9505
Día 2	1,55	0,2193
Día 3	2,51	0,1190
Día 4	22,95	0,0001**
Día 5	24,34	0,0001**

ES 2 322 236 T3

5	Día 6	8,23	0,0059*
	Día 7	6,81	0,0118*
	Día 8	4,22	0,0449*
	Día 9	4,87	0,0316*
10	Día 10	3,60	0,0631
	Día 11	2,64	0,1103
	Día 12	3,33	0,0735
15	Día 13	3,45	0,0687
Grupo 9 frente a grupo 3			
20	Día 1	16,62	0,0002*
	Día 2	15,11	0,0003*
	Día 3	32,13	0,0001**
25	Día 4	35,92	0,0001**
	Día 5	36,46	0,0001**
	Día 6	23,68	0,0001**
30	Día 7	14,81	0,0003*
	Día 8	9,03	0,0041*
	Día 9	9,45	0,0033*
35	Día 10	3,77	0,0574
	Día 11	3,88	0,0542
40	Día 12	3,87	0,0543
	Día 13	2,55	0,1161

45 1 = estadístico de la prueba

2 = la estadística se da desde el día 1 al 13; en el día 0, todos los cálculos son idénticos (los pesos se ajustan al 100 %)

50 * = estadísticamente significativo (< 0,05)

** = muy estadísticamente significativo (< 0,0001)

55

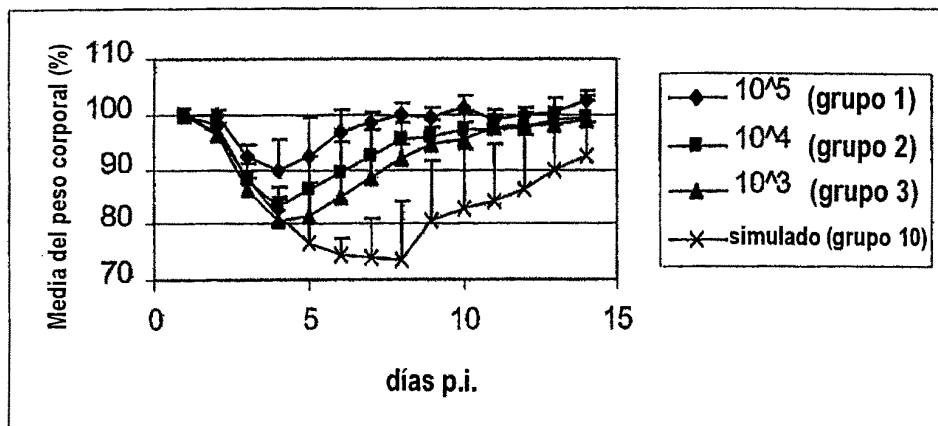
60

65

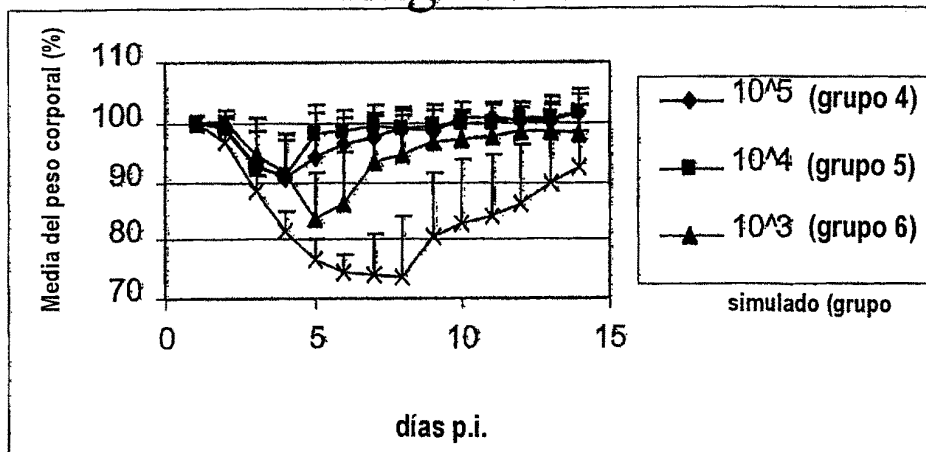
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus del herpes equino en el que la proteína gM está modificada en la medida en que dicha proteína gM modificada es no funcional con respecto al impacto inmunomodulador de la proteína con relación a la interacción virus-hospedante, **caracterizado** porque está ausente al menos el 70% del gen gM.
2. El virus del herpes equino según la reivindicación 1, en el que está ausente al menos el 80% del gen gM.
- 10 3. El virus del herpes equino según la reivindicación 1, en el que está ausente al menos el 90% del gen gM.
4. El virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el gen que codifica la proteína gM ha sido suprimido y la expresión del gen que codifica el homólogo UL9 (gen 53) no ha sido afectada.
- 15 5. El virus del herpes equino según la reivindicación 1, en el que dicho virus es la cepa HΔgM-3b1 del virus del herpes equino depositada con el número de acceso 99101536 ante la EACC.
- 20 6. El virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho virus es un virus del herpes equino de tipo 1 o tipo 4.
7. El virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho virus porta uno o más genes heterólogos.
- 25 8. Un ácido nucleico que codifica el virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende el virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8.
11. Virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el ácido nucleico que codifica el virus del herpes equino según la reivindicación 8, para uso como una medicina veterinaria.
- 35 12. Uso de los virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por virus del herpes equino.
13. Uso de los ácidos nucleicos según la reivindicación 8, para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por virus del herpes equino.
- 40 14. Uso de los virus del herpes equino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento para mejorar la respuesta inmune inducida por una vacuna del virus del herpes equino contra infecciones de tipo salvaje.
- 45 15. Un método para distinguir un animal infectado con un virus de tipo salvaje del herpes equino de un animal tratado con un virus del herpes equino modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque se establece la identidad de una proteína gM del virus de tipo salvaje o la identidad de una proteína gM tal como se expresa en el virus modificado o su ausencia esencial en éste.
- 50 16. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque se establece la diferencia en los ácidos nucleicos que codifican la proteína gM del virus de tipo salvaje y de los ácidos nucleicos que codifican la proteína gM modificada o su ausencia esencial.
- 55 17. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque
- a) se añade una muestra de interés a un gM aislado o a derivados modificados del mismo,
- b) se añade un anticuerpo específico para la proteína gM aislada o para los derivados modificados de la misma,
- 60 c) se determina la unión de dicho anticuerpo.

RacH



HΔgM-Ins



HΔgM3b1

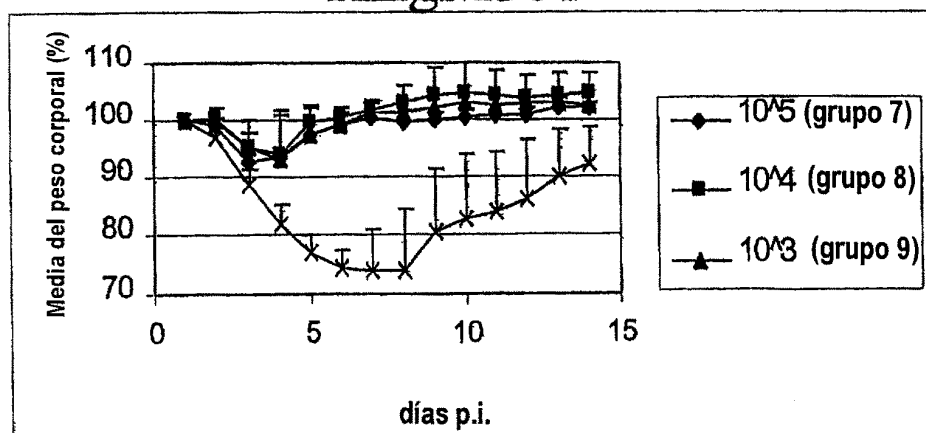
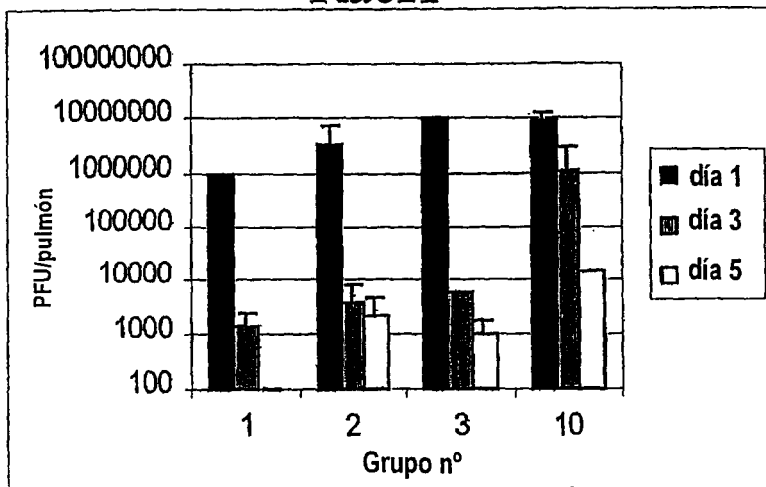
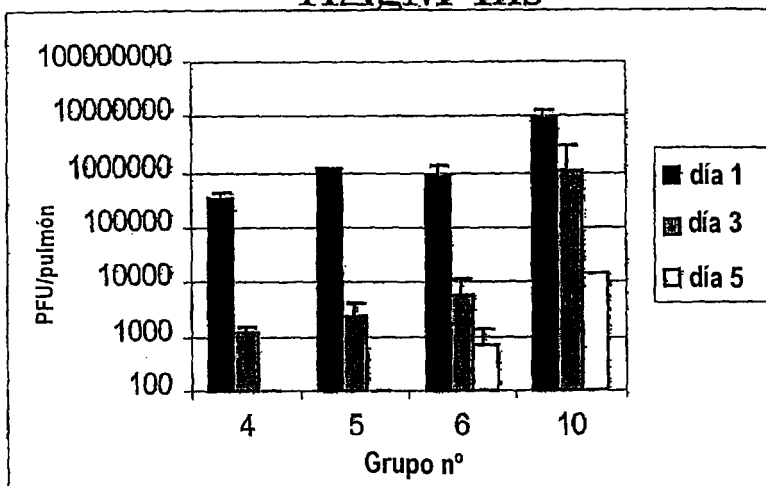


Fig. 1

RacH



HΔgM-Ins



HΔgM3b1

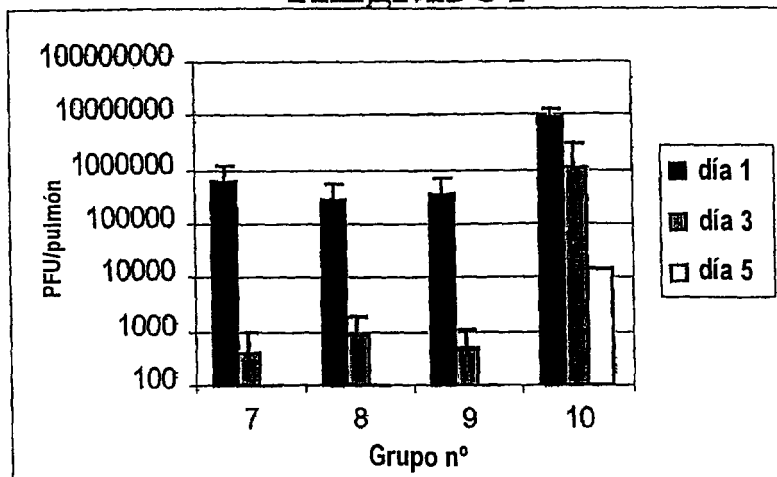


Fig. 2

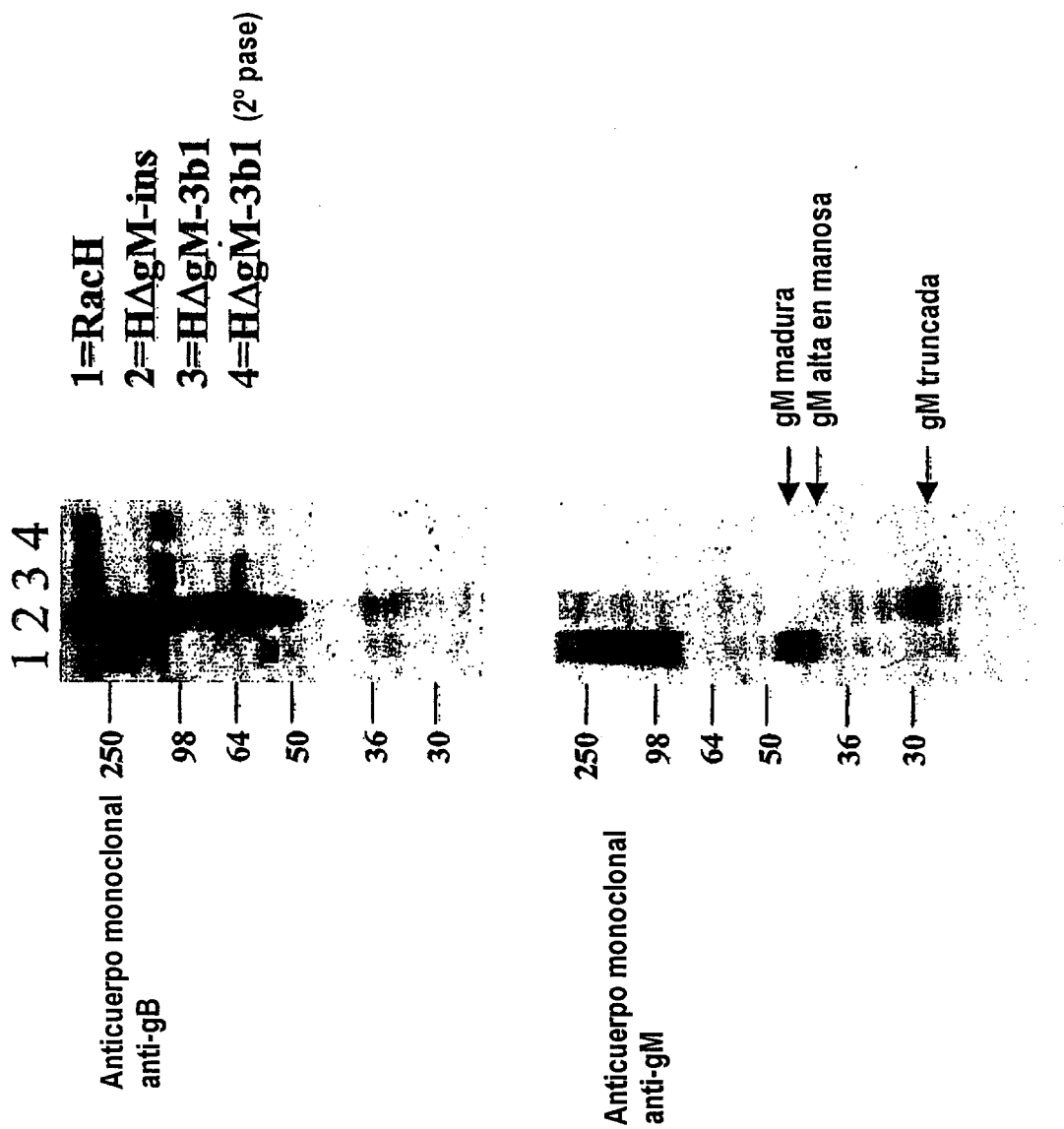


Fig. 3

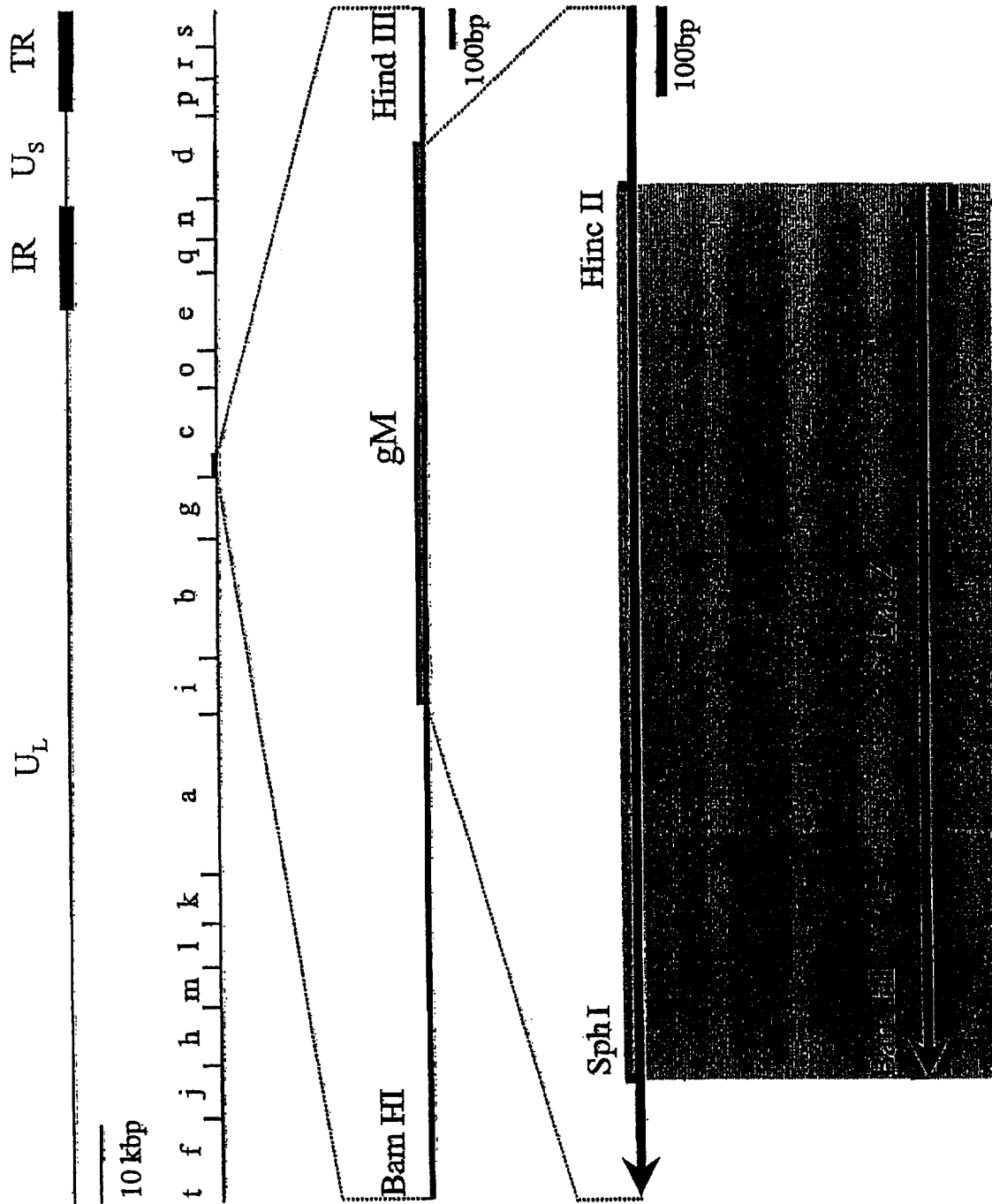


Fig. 4