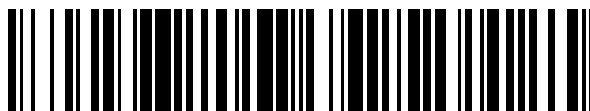


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 704**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010** **E 10840033 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2516629**

54 Título: **Vacunas de virus herpes simple**

30 Prioridad:

21.12.2009 US 288836 P

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

18.07.2016

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

YAO, FENG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 577 704 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 de virus herpes simple

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere principalmente a las vacunas que se pueden utilizar para inmunizar a los pacientes contra las infecciones del virus del herpes simplex de tipo 2 (HSV-2) asociadas con úlceras genitales crónicas. La vacuna utiliza un virus HSV-2 de replicación defectuosa de que ha sido diseñado para expresar niveles altos del antígeno (gD2) de la glicoproteína D de HSV-2. En las realizaciones preferidas, el virus HSV-2 también expresa uno o más genes inmunomoduladores, tales como IL15 y/o los antígenos principales HSV-1 o HSV-2 tales como gB o gC.

10 Antecedentes de la invención

Herpes Simplex Virus (HSV) e infecciones del HSV

15 El virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) es la causa principal de las úlceras genitales. Puede causar tanto una infección aguda, una infección productiva y una infección latente a largo plazo caracterizada por recidivas periódicas impredecibles (66). Además de causar úlceras genitales recurrentes, durante toda la vida, las infecciones por HSV son una preocupación importante en los pacientes con SIDA. Se ha documentado que la infección genital por HSV-2 triplica el riesgo de contraer sexualmente la infección por VIH (20), y en África, este aumento del riesgo puede contribuir al 25-35% de los casos de infecciones por VIH (1).

20 A pesar de que la gravedad y la duración de las infecciones primarias más sintomáticas del HSV se puede reducir mediante tratamiento por vía oral o intravenosa con aciclovir, valaciclovir, o famciclovir, la terapia antiviral no impide el establecimiento de la infección latente de la infección primaria ni reduce las recurrencias posteriores (66). La continua propagación del herpes genital en los Estados Unidos durante las últimas dos décadas (19) y la creciente incidencia de HSV resistentes a los medicamentos antivirales actuales sugieren que existe una necesidad de vacunas seguras y eficaces contra las infecciones por HSV (31, 60). Además, el hallazgo de que la terapia de supresión de HSV conduce a una reducción significativa en los niveles de VIH en la mucosa genital y plasma de las mujeres infectadas con HSV-2 y VIH (52) sugiere que una vacuna eficaz contra el HSV también puede tener importantes implicaciones en el control de la infección por VIH (1, 31).

Glicoproteína D de HSV-2 (gD2)

30 La glicoproteína D de HSV (gD) es uno de los antígenos virales más predominantes expresados en la superficie de las células infectadas (21) y, también en la envoltura viral (24). gD es esencial para la entrada del virus en las células y es una importante diana para los anticuerpos neutralizantes contra la infección por HSV (12, 49, 53). Por otra parte, gD es la diana viral predominante para las células T CD4⁺, incluyendo la citotoxicidad de la célula T CD4⁺ y las células T CD8⁺ en humanos y modelos murinos de infección por HSV (27, 28, 30, 34, 47, 65, 75). Por estas razones, gD ha sido un foco importante para el desarrollo de vacunas de subunidades de HSV (32, 60).

35 En un ensayo clínico en fase 3, Stanberry, *et al.*, mostró que la vacunación con gD recombinante a partir de HSV-2 (gD2), en combinación con el adyuvante AS04, proporcionó una eficacia del 73 -74% en la protección contra el desarrollo enfermedad del herpes genital en las mujeres seronegativas para el HSV (62). No se observó una eficacia significativa, sin embargo, en los hombres y en las personas que eran seropositivas para HSV-1. Aunque se detectaron respuestas humorales específicas de gD2 y de las células T CD4⁺ en los huéspedes inmunizados, no está claro si gD2/AS04 fue eficaz en provocar una respuesta de las células T CD8⁺ (31, 32). Este estudio sugiere que existe la necesidad de una vacuna contra el HSV que provoque una respuesta humoral más amplia, así como de las células T CD4 y CD8, a ambos gD2 y a otros antígenos virales de HSV (29, 31, 32).

Vacunas virales

45 Está bien documentado que las vacunas de virus vivos que son capaces de la síntesis *de novo* de inmunógenos en el huésped inducen una respuesta inmune más amplia y más duradera que las vacunas que consisten en sólo los péptidos o proteínas. Se han desarrollado y probado varias formas de HSV de replicación defectuosa y mutantes neuroatenuados competentes para la replicación, como una posibilidad en las vacunas contra la infección por HSV (US7223411; (18)).

50 Debido a que los virus de replicación defectuosa y mutantes neuroatenuados pueden co-replicar con virus de tipo salvaje o ser competente para la replicación en el contexto de virus de tipo silvestre, su uso como una vacuna en seres humanos plantea un problema de seguridad, en particular en individuos que albergan la infección por HSV latente (33). La observación de que la replicación defectuosa de los mutantes de HSV-1 puede reactivar el promotor temprano inmediato de HSV-1 latente en el cerebro de roedores ha planteado problemas de seguridad adicionales acerca de la posibilidad de que tales recombinantes desencadenan brotes de infecciones virales productivas en los individuos con infección latente (63). Por lo tanto, una vacuna HSV recombinante de replicación defectuosa deseable no sólo debe poseer la capacidad de expresar un amplio espectro de antígenos codificados por el virus, sino

también debe codificar una función única que pueda prevenir la infección lítica del HSV de tipo silvestre cuando se encuentra dentro de las mismas células. Tal mecanismo de seguridad minimizaría el brote potencial del virus de la vacuna causado por la recombinación del vector de la vacuna con el virus de tipo silvestre en el huésped.

5 Lu Zheming *et al.* (Journal of Investigative Dermatology 129 (5): pp1174-84 [2009]) describe un recombinante del virus HSV-1 dominante negativo de replicación defectuosa, que comprende UL9-C535C y gD de HSV-1 bajo el control del promotor tet-O-LCMVIE.

Sumario de la invención

10 En general, la presente invención se basa en el uso de la tecnología de genes inducidos por tetraciclina (T-Rex, Invitrogen) (73) y una forma mutante dominante negativa del polipéptido UL9 de HSV-1, por ejemplo, UL9-C535C, para desarrollar una vacuna viral recombinante segura y eficaz contra la infección por HSV-2.

15 En el primer aspecto, la invención se refiere a un virus recombinante del virus herpes simplex 2 (HSV-2) dominante negativo de replicación defectuosa. El genoma del virus tiene, por lo menos, una primera secuencia que codifica una primera glicoproteína D (gD2) de HSV-2 unida operativamente a un primer promotor y, preferiblemente, una segunda secuencia que codifica una segunda gD2 de HSV-2 que está unida operativamente a un segundo promotor. El promotor o promotores está unido operativamente a una primera secuencia del operador de la tetraciclina (tet-O) y a una segunda secuencia de tet-O respectivamente, cada uno de los cuales permite que se lleve a cabo la transcripción cuando está libre del represor tet, pero que bloquea la transcripción cuando esta unido al represor. El genoma incluye también una tercera secuencia que codifica, por lo menos, una primera forma mutante dominante negativa de la proteína UL9 de HSV-1 o de HSV-2 vinculada a un tercer promotor y, preferiblemente, una cuarta secuencia que codifica una segunda forma dominante negativa de la proteína UL9 de HSV-1 o de HSV-2 ligada a un cuarto promotor. Al igual que el primer y segundo promotor, el tercer y cuarto promotor está cada uno unido operativamente a una secuencia tet-O que, si esta unida al represor tet, bloquea la transcripción. Además, el genoma del virus se caracteriza por la ausencia de una secuencia que codifica una proteína ICP0 funcional.

20 Con el fin de mejorar su antigenicidad, el genoma debe expresar preferiblemente también genes inmunomoduladores, como IL12 o IL15 y/o los antígenos principales de HSV-1 o de HSV-2 tales como gB o gC.

25 El término "unido operativamente" se refiere a los elementos genéticos que están unidos entre sí de una manera que les permita llevar a cabo sus funciones normales. Por ejemplo, un gen está unido operativamente a un promotor cuando la transcripción está bajo el control del promotor y esta transcripción da como resultado la producción del producto normalmente codificado por el gen. Una secuencia operadora tet está unida operativamente a un promotor cuando el operador bloquea la transcripción del promotor en presencia del represor tet unido y sin embargo permite la transcripción en ausencia del represor. El término "recombinante" se refiere a un virus que tiene secuencias de ácidos nucleicos que se formaron, en algún momento, por la recombinación de secuencias de ácidos nucleicos y de elementos de la secuencia y a la introducción de estas secuencias recombinadas en el virus o en un ancestro virus.

30 Preferentemente, los promotores utilizados son aquellos que tienen un elemento TATA y las secuencias operadoras tet unidas a los promotores tienen dos sitios de unión al represor op2 unidos entre sí por entre dos y veinte nucleótidos de unión. El posicionamiento de la secuencia del operador es importante para lograr un control efectivo sobre el promotor. En concreto, el primer nucleótido en la secuencia del operador debe estar situado entre seis y veinticuatro nucleótidos en 3' del último nucleótido del elemento TATA. Las secuencias estructurales que codifican, por ejemplo gD o un polipéptido mutante dominante negativo de UL9, se encontrarían en 3' del operador. Entre los promotores específicamente preferidos están los promotores tempranos inmediatos de hCMV y promotores tempranos inmediatos de HSV-1 o de HSV-2. Especialmente preferido es el promotor ICP4 de HSV-1 o de HSV-2.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna que puede usarse profiláctica o terapéuticamente contra la expresión de HSV y que comprende uno o más de los virus recombinantes descritos anteriormente en forma de dosis unitaria. El término "forma de dosis unitaria" se refiere a una entidad de administración única del fármaco tal como una tableta o cápsula. Preferiblemente, la "forma de dosis unitaria" estará en una disolución en la que el fármaco se disuelva a una concentración que proporcione un efecto terapéutico o profiláctico cuando se administre un volumen seleccionado (dosis unitaria) a un paciente por inyección y se encontrará dentro de un vial de inyección. Sobre la base de la dosis eficaz utilizada en ratones (2×10^6 PFU), se cree que la dosis efectiva mínima en humano debe ser de aproximadamente 1×10^7 pfu. Por lo tanto, una dosis unitaria debe tener por lo menos esta cantidad de virus, siendo normal de 1×10^7 - 1×10^9 pfu. Las vacunas se pueden almacenar en una forma liofilizada y reconstituirse en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración. Alternativamente, las preparaciones pueden ser almacenadas en el propio vehículo. El volumen de una dosis única de la vacuna puede variar pero, en general, debe estar entre aproximadamente 0,1 ml y 10 ml y, más normalmente, entre aproximadamente 0,2 ml y 5 ml.

55 La invención también incluye métodos para la inmunización de pacientes contra infecciones de HSV-1 o HSV-2 y las enfermedades resultantes de tales infecciones (por ejemplo, úlceras de herpes genital) mediante la administración a los pacientes las vacunas descritas anteriormente. Las vacunas también se pueden administrar a los pacientes que han sido infectados para prevenir o reducir los brotes de virus. Cualquier método para administrar una vacuna a un

paciente que no como resultado la destrucción de virus es compatible con la presente invención. En general, la administración será por vía parenteral así como por inyección intramuscular o intravenosa. La dosificación y el programa de administración de las vacunas pueden determinarse usando métodos que son rutinarios en la técnica. Las preparaciones se pueden administrar ya sea en inyecciones únicas o múltiples.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1A y 1B: La figura 1A muestra un diagrama esquemático de los plásmidos utilizados para la construcción de N2-C535C y CJ2-GD2 recombinantes dominantes negativos de replicación defectuosa de HSV-2. El plásmido pHSV-2/ICP0 es un plásmido que contiene las secuencias de ICP0 de HSV-2 que cubren 268 pb aguas arriba del marco de lectura abierto de ICP0 de HSV-2 (barra gris) a 40 pb aguas abajo de la señal poli A de las secuencias de codificación de ICP0. Se construyó pHSV2.ICP0-V reemplazando el fragmento de ADN de Xho I-ICP0 que contiene las secuencias con un Xho I- que contiene la secuencia de clonación múltiple (MCS). Se creó pHSV2.ICP0-lacZ mediante la inserción del gen LacZ (barra de rayas) en la región MCS de pHSV2.ICP0-V. Se construyó p02lacZ-TOC535C reemplazando el fragmento indicado que contiene lacZ de pHSV2.ICP0-lacZ con las secuencias de ADN que codifican UL9-C535C (barra negra) bajo el control del promotor temprano inmediato principal de CMVh (barra de líneas, CMVTO) que contiene tetO. Se construyó p02lacZTO-gD2.C535C reemplazando el fragmento indicado SnaB I/Pst I de p02lacZTO-C535C con las secuencias de ADN que codifican el gen gD2 (barra degradada) bajo el control del promotor de ICP4 inmediato temprano de HSV-1 que contiene tetO (barra en blanco, ICP4TO).

La Figura 1B muestra un diagrama esquemático de los genomas de tipo silvestre de HSV-2, de un mutante nulo ICP0 (N2-lacZ) de HSV-2, de N2-C535C y de CJ2-gD2. UL y US representan las regiones largas únicas y cortas únicas del genoma de HSV-2, respectivamente, que están flanqueadas por sus correspondientes regiones de repetición invertidas (barras blancas). La sustitución de las dos copias de las secuencias de codificación de ICP0 con el gen lacZ en N2-lacZ y con secuencias de ADN (1) que codifican UL9-C535C bajo el control del promotor principal inmediato temprano de hCMV que contiene tetO en N2-C535C, y (2) que codifican UL9-C535C y gD2 que llevan tetO con los promotores indicados en una orientación opuesta se muestran debajo de la secuencia expandida que codifica ICP0 del genoma de HSV-2

Figuras 2A y 2B: Estas figuras muestran el alto nivel de expresión de gD2 y UL9-C535C después de la infección de CJ2-gD2 de células Vero. En la figura 2A, las células Vero en duplicado eran bien infectadas de forma simulada o estaban infectadas con HSV-2 de tipo silvestre, N2-lacZ, N2-C535C, o CJ2-gD2 a una MOI de 10 PFU/célula. Se prepararon extractos de células infectadas 9 h después de la infección. En la Figura 2B, se infectaron células Vero con HSV-1 de tipo silvestre cepa KOS, CJ9-gD, HSV-2 de tipo silvestre, o CJ2-gD2 a una MOI de 10 PFU/célula. Se prepararon extractos de células infectadas 9 h después de la infección. Las proteínas en los extractos de células infectadas se resolvieron en SDS-PAGE, seguido de inmunotransferencia con anticuerpos policlonales contra gD de HSV-1 (R45), UL9, o anticuerpos monoclonales específicos para ICP27 y gB (Santa Cruz).

Figura 3: La Figura 3 muestra la regulación de la expresión de gD2 y UL9-C535C por tetR en células VCEP4R-28 infectadas con CJ2-gD2. Se sembraron las células VCEP4R-28 a 5×10^5 células por placa de 60 mm. A las 40 h después de la siembra, las células por duplicado eran bien infectadas de forma simulada o infectadas con HSV-2 de tipo silvestre o con CJ2-gD2 a una MOI de 10 PFU/célula, ya sea en la presencia o ausencia de tetraciclina. Se prepararon extractos de células infectadas 9 h después de la infección, seguido de inmunotransferencia con anticuerpos policlonales contra gD de HSV y UL9, y un anticuerpo monoclonal específico para ICP27.

Figuras 4A y 4B: Estas figuras muestran el efecto trans-dominante negativo de CJ2-gD2 en la replicación de HSV-2 de tipo silvestre. En la Figura 4A, las células Vero, por triplicado, se infectaron con ya sea con HSV-2 de tipo silvestre cepa 186 a una MOI de 2 PFU/célula, 186 a una MOI de 2 PFU/célula y CJ2-gD2 a una MOI de 5 PFU/célula, o 186 a una MOI de 2 PFU/célula y N2-lacZ a una MOI de 5 PFU/célula. En la figura 4B, las células Vero fueron bien infectadas solamente con HSV-2 de tipo silvestre a una MOI de 5 PFU/célula, co-infectadas con 186 y CJ2-gD2 a una MOI de 5 PFU/célula de ambos virus, o infectadas por separado con 186 a una MOI de 15 PFU/célula, y co-infectadas con 186 a una MOI de 15 PFU/célula y CJ2-gD2 a una MOI de 5 PFU/célula. Se obtuvieron las células infectadas 18 h post-infección y se determinaron las titulaciones virales en monocapas de células Vero. Las titulaciones virales se expresan como promedio +/- DS. Los números en la parte superior de la gráfica indican la disminución del rendimiento del virus de tipo silvestre entre la infección única y la co-infección.

Las figuras 5A y 5B: Estas figuras muestran la neurovirulencia del HSV-2 de tipo silvestre, de la cepa 186, de N2-lacZ, de N2-C535C, y de CJ2-gD2 en ratones BALB/c después de la inoculación intracerebral. Los ratones hembra BALB/c de 4 a 6 semanas de edad se asignaron al azar a cinco grupos de 8 ratones cada uno. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico y se inocularon con DMEM, 25 PFU/ratón de la cepa 186 de HSV-2 de tipo silvestre, 1×10^6 PFU/ratón de N2-lacZ, $2,5 \times 10^6$ PFU/ratón de CJ2-gD2 o de N2-C535C por medio de inyección intracerebral en el lóbulo frontal izquierdo del cerebro en un volumen de 20 μ l a una profundidad de 4 mm. Los ratones fueron examinados en busca de signos y síntomas de enfermedad durante 35 días después de la inoculación. La Figura 5A muestra puntuación de la enfermedad en distintos días después de la inyección y la Figura 5B muestra la porcentaje de ratones supervivientes.

Figuras 6A y 6B: Las figura 6A y 6B se refieren a la inducción de anticuerpos específicos de gD2 y respuestas neutralizantes de HSV-2. Se simuló la inmunización de ratones hembra BALB/c de 4 a 6 semanas de edad con DMEM (n = 7, 6, 8, 8) o se inmunizaron con CJ2-gD2 (n = 7, 6, 8, 8), N2 -C535C (n = 7, 8, 6), o CJ9-gD (n = 6, 8, 6) a una dosis de 2×10^6 PFU/ratón, y se reforzaron 2 semanas más tarde. Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones 4-5 semanas después de la inmunización primaria. En la Figura 6A, el suero de un grupo individual de los ratones se acumuló y se inactivo por calor. Se determino la titulación de los anticuerpos neutralizantes específicos de HSV-2. Los resultados representan promedio de las concentraciones \pm SEM. En la Figura 6B, los sueros procedentes de la inmunización simulada, deCJ2-gD2-, de N2-C535C-, o de ratones inmunizados con CJ9-gD se incubaron con extracto celular preparado a partir de células U2OS transfectadas con el plásmido que expresa gD2 p02.4TO-gD2. gD/ratón los complejos de IgG específicos se precipitaron con la proteína A, se resolvieron en SDS-PAGE, y se determinaron con un anticuerpo policlonal específico de gD, R45.

Figura 7A-7D: Estas figuras se refieren a la inducción de respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HSV-2 en ratones inmunizados con CJ2-gD2. Se simuló la inmunización de ratones hembra BALB/c o se inmunizaron conCJ2-gD2 a 2×10^6 PFU por ratón dos veces a intervalos de 2 semanas. En las figuras 7A y 7B, los ratones inmunizados de manera simulada y los inmunizados fueron bien infectados de manera simulada o infectados con HSV-2 de tipo silvestre s.c. a una dosis de 1×10^4 PFU/ratón 9-10 semanas después de la inmunización de refuerzo (n = 3). Las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ se analizaron en el día 5 después de la estimulación mediante ensayos de ELISPOT de IFN-gamma con células T CD4⁺ y CD8⁺ purificadas de forma individual aisladas de bazo de ratón usando los kits negativos CD4 CD8 de Dynal. En las figuras 7C y 7D, los ratones inmunizados de manera simulada y los ratones inmunizados con CJ2-gD2 fueron inmunizados de manera simulada o infectadas con HSV-2 de tipo silvestre 5-6 semanas después de la inmunización de refuerzo seguida de ensayos de ELISPOT de IFN-gamma en el día 4 post-infección (n = 3). El número de células formadoras de puntos de IFN- γ (SFC) se expresó como el promedio \pm SEM por millón de células T CD4⁺ o CD8⁺.

Figura 8: La figura 8 muestra la reducción de la replicación vaginal de la exposición a HSV-2 de ratones inmunizados con CJ2-gD2. Ratones hembra BALB/c de 4 a 6 semanas de edad se asignaron aleatoriamente a 4 grupos de 10 ratones cada uno. Los ratones fueron inmunizados de manera simulada con DMEM o inmunizados con CJ2-gD2, N2-C535C, o CJ9-gD a una dosis de 2×10^6 PFU/ratón. Los ratones fueron reforzados después de 2 semanas. A las 5 semanas, los ratones fueron tratados previamente con medroxiprogesterona y expuestos por vía intravaginal a 5×10^5 PFU de HSV-2 cepa G. Se tomaron muestra de frotis vaginales en los días 1, 2, 3, 5 y 7 tras de la exposición. Se evaluaron los virus infecciosos en las muestras de frotis mediante ensayo de placa estándar en monocapas de células Vero. La titulación de los virus se expresa como promedio \pm SEM de las muestras de los frotis vaginales individuales.

Figuras 9A y 9B: Estas figuras muestran la prevención de la enfermedad de HSV-2 en ratones inmunizados con CJ2-gD2. Tras la exposición al HSV-2 de tipo silvestre, los ratones individuales descritos en la leyenda de la figura 8 se observaron durante un período de seguimiento de 21 días para ver la incidencia de la enfermedad por HSV-2 genital y diseminada (Figura 9A) y la supervivencia (Figura 9B) utilizando la siguiente escala: 0 = ninguna señal, 1 = eritema leve genital y edema, 2 = inflamación genital moderada, 3 = lesiones genitales purulentas y/o enfermedad sistémica, 4 = parálisis de las extremidades posteriores, 5 = muerte.

Figura 10: Figura 10 muestra la secuencia codificante de UL9-C535C HSV-1 (SEQ ID NO: 2). UL9-C535C consiste en los aminoácidos 1-10 de UL9, un tripéptido Thr-Met-Gly, y los aminoácidos 535 a 851 de UL9 (véase Yao, et al. (69)).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el concepto de utilizar la tecnología de genes inducidos por tetraciclina y un polipéptido mutante dominante negativo de HSV-1 UL9 para desarrollar un virus recombinante HSV de replicación defectuosa y capaz de inhibir las infecciones por HSV de tipo silvestre (dominante negativo). CJ9-gD es un prototipo recombinante del virus HSV-1 dominante negativo, de replicación defectuosa y expresa altos niveles del antígeno principal de la glicoproteína D (gD) de HSV-1 independiente del replicación del ADN viral de HSV (7). En su forma más preferida, la presente invención utiliza un recombinante de HSV-2 dominante negativo y de replicación defectuosa (CJ2-gD2) que codifica 2 copias del gen gD de HSV-2 (gD2), conducido por promotor principal inmediato temprano de ICP4 de HSV-1 que contiene tet-O. CJ2-gD2 expresa gD2 la forma tan eficiente como el HSV-2 de tipo silvestre y puede ejercer un efecto transinhibidor potente en la replicación de HSV-2 de tipo silvestre en las células co-infectadas. La inmunización con CJ2-gD2 provoca anticuerpos neutralizantes eficaces específicos de HSV-2, así como respuestas de las células T, y ofrece una protección completa contra la infección intravaginal por HSV-2 de tipo silvestre en ratones.

La CJ2-gD2 es una vacuna más eficaz que CJ9-gD en la protección contra la infección y la enfermedad genital por HSV-2 de tipo silvestre. Además, la inyección intracerebral de una alta dosis de CJ2-gD2 no causa la mortalidad o morbilidad en los ratones. En conjunto, estas observaciones sugieren que CJ2-gD2 tiene ventajas sobre las vacunas de virus de replicación defectuosa tradicionales y las vacunas de subunidades de HSV-2 en la protección contra la infección y la enfermedad genital por HSV-2 en los seres humanos.

El operador Tet/ inducción del represor y el ADN recombinante

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a los virus que tiene genes cuya expresión está regulada por el operador de la tetraciclina y la proteína represora. Los métodos que se pueden emplear para hacer que moléculas de ADN recombinantes que contienen estos elementos y secuencias de ADN se han descrito anteriormente (véase los documentos US 6444871; US 6251640; y US 5972650) y los plásmidos que contienen el interruptor de la transcripción inducible por tetraciclina están disponibles comercialmente (T-REx™, Invitrogen, CA).

Una característica esencial del ADN de la presente invención es la presencia de genes que se unen operativamente a un promotor, preferiblemente que tiene un elemento TATA. Una secuencia operadora tet se localiza entre los nucleótidos 6 y 24 3' respecto del último nucleótido en el elemento TATA del promotor y 5' del gen. El virus puede obtenerse en las células que expresan el represor tet con el fin de bloquear la transcripción del gen y permitir la replicación viral. La fuerza con la que el represor tet se une a la secuencia del operador se mejora mediante el uso de un tipo de operador que contiene dos sitios de unión al represor op2 (cada sitio que tiene la secuencia de nucleótidos: TCCCTATCAGTGATAGAGA (SEQ ID NO: 1)) unidos por una secuencia de 2-20, preferiblemente de 1-3 o de 10-13, nucleótidos. Cuando represor se une a este operador, se producirá muy poca o ninguna transcripción del gen asociado. Si ADN de estas características está presente en una célula que también expresa el represor de tetraciclina, la transcripción del gen que puede prevenir la infección viral se bloquea mediante la unión del represor al operador y se producirá la replicación del virus

La selección de promotores y genes

Durante la infección productiva, la expresión del gen HSV se divide en tres clases principales basándose en el orden temporal de la expresión: inmediatamente temprana (α), temprana (β) y tardía (γ), con genes tardíos que se dividen a su vez en dos grupos, γ_1 y γ_2 . La expresión de genes tempranos inmediatos no requiere la síntesis de novo de proteínas virales y se activa por la proteína asociada del virión VP16 junto con los factores de transcripción celular cuando el ADN viral entra en el núcleo. Los productos proteicos de los genes tempranos inmediatos se denominan polipéptidos de células infectadas ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, y ICP47 y son los promotores de estos genes los que se utilizan preferiblemente para dirigir la expresión de los genes recombinantes descritos en este documento.

La ICP0 juega un papel importante en la mejora de la reactivación del HSV desde la latencia y confiere una ventaja de crecimiento significativo en el virus a bajas multiplicidades de la infección. La ICP4 es la principal proteína reguladora de la transcripción de HSV-1, que activa la expresión de genes virales tempranos y tardíos. La ICP27 es esencial para la infección viral productiva y es necesaria para la replicación eficiente de ADN viral y para la expresión óptima de los genes virales γ y un subconjunto de genes virales β . La función de ICP47 durante la infección HSV parece ser la de regular a la baja la expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I en la superficie de las células infectadas.

La secuencia de longitud completa de la secuencia del genoma de HSV-1 de la región de codificación del HSV-1 UL9-C535C se muestra en la Figura 10 (SEQ ID NO: 2). Las otras secuencias descritas para su uso en los virus recombinantes son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia genómica de longitud completa del HSV-1 se puede obtener como secuencia X14112 de GenBank. La secuencia de ICP4 HSV-1 se puede obtener de GenBank con el número X06461; la glicoproteína D de HSV-1 se puede obtener como secuencia J02217 de GenBank; la glicoproteína D HSV-2 se puede obtener de GenBank con el número K01408; y el gen UL 9 de HSV-1 como secuencia M19120 de GenBank (todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad).

La inclusión del represor Tet y la fabricación de Virus

Las secuencias para los promotores ICP0 y ICP4 de HSV y para los genes cuya regulación se controla de manera endógena son bien conocidos en la técnica (43, 44, 56) y los procedimientos para fabricar los vectores virales que contienen estos elementos han sido descritos anteriormente (véase la solicitud publicada US2005-0266564). Estos promotores no sólo son muy activos al promover de la expresión génica, sino que también son inducidos específicamente por VP16, un transactivador liberado cuando HSV-1 o HSV-2 infecta una célula.

Una vez que se han producido las construcciones de ADN apropiadas, se pueden incorporar en virus HSV-2 usando métodos que son bien conocidos en la técnica (véase, en general Yao et al. (68)).

Los métodos de inmunización

Los virus descritos en este documento se pueden usar para inmunizar a los individuos y/o pacientes, normalmente mediante inyección como una vacuna. La vacuna puede utilizarse tanto profilácticamente para prevenir la infección por HSV-1 o HSV-2 o terapéuticamente para reducir la gravedad de una infección por HSV-1 o HSV-2 que ya ha tenido lugar. Con el fin de hacer una vacuna, los virus se pueden suspender en cualquier solución farmacéuticamente aceptable, incluyendo una disolución salina estéril isotónica, agua, una disolución salina tamponada con fosfato, 1,2-propilenglicol, poliglicoles mezclados con agua, solución de Ringer, etc. El número exacto de virus que se van a administrar no es crucial para la invención, pero debe ser una "cantidad eficaz", es decir, una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunológica lo suficientemente fuerte como para inhibir

la infección por HSV. En general, se espera que el número de virus (PFU) administrado inicialmente este comprendido entre 1×10^7 y 1×10^{10} .

La eficacia de una dosis, así como la eficacia del tratamiento global puede evaluarse usando métodos inmunológicos estándar para valorar la presencia de anticuerpos eficaces para atacar a HSV. Las inyecciones inmunológicas se pueden repetir tantas veces como se desee.

Ejemplos

El ejemplo actual describe la creación de un recombinante del virus HSV-2 y las pruebas para determinar sus efectos inmunológicos.

I. Materiales y Métodos

10 Células

Se cultivaron células (Vero) de riñón de mono verde africano y células de la línea de osteosarcoma U2OS y se mantuvieron en Medio de Dulbecco de Eagle Modificado (DMEM; Sigma Aldrich), complementado con de suero bovino fetal (FBS) al 10% en presencia de 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina (GIBCO, Carlsbad, CA) (71). Las células U2OS son capaces de complementar funcionalmente para la delección de la ICP0 de HSV-1 (71). Las células U2CEP4R11 son células U2OS que expresan tetR que se mantuvieron en DMEM más FBS al 10% e higromicina B a 50 µg/ml (73). Las células VCEP4R-28 son células Vero que expresan tetR que se mantuvieron en DMEM más FBS al 10% e higromicina B a 50 µg/ml (73).

Los plásmidos

20 El plásmido pHSV2/ICP0 es un plásmido derivado de pUC19 que codifica las secuencias amplificadas por PCR de ICP0 de HSV-2 que cubre 268 pb aguas arriba del marco de lectura abierto (ORF) de ICP0 de HSV-2 hasta 40 pb aguas abajo de la señal poli A de las secuencias codificantes de ICP0. pHSV2.ICP0-V es un plásmido de clonación de ICP0 de HSV-2, derivado del plásmido pHSV-2/ICP0, mediante la sustitución del fragmento de ADN Xho I-ICP0 que contiene secuencias 25 pb aguas arriba del codón de iniciación de ICP0 hasta 397 pb aguas arriba del codón de terminación de ORF de ICP0 con una secuencia de clonación múltiple (MCS) que contiene Xho I. El plásmido pHSV2.ICP0-lacZ fue creado mediante la inserción del fragmento que contiene el gen HindIII-I- NotI- lacZ de pcADN3-lacZ en pHSV2.ICP0-V en los sitios Hind III-Not I. pcmvtetO-UL9C535C es un plásmido que codifica UL9-C535C bajo el control del promotor temprano inmediato de hCMV que contiene tetO (68). p02lacZ-TOC535C, que expresa UL9-C535C conducido por el promotor principal temprano de hCMV que contiene tetO (Fig. 1A), se construyó reemplazando el EcoR I/Age I-lacZ que contiene el fragmento de pHSV2.ICP0-lacZ por el EcoR I/Hind III - hcmvtetO-UL9C535C que contiene el fragmento de pcmvtetOUL9-C535C (69).

35 El pAzcD-HSV-2 es un plásmido que codifica gD2 del HSV-2 amablemente proporcionados por la Dra. Patricia Lanza (Northwestern University). pICP4TO-hEGF expresa el factor de crecimiento epidérmico humano bajo el control del promotor temprano inmediato ICP4 de HSV 1 que contiene tetO, que consiste en la secuencia de promotor de ICP4 de HSV-1 desde -377 pb hasta -19 pb en relación al sitio de inicio de la transcripción del gen ICP4. De manera similar al promotor temprano inmediato de hCMV que contiene tetO en el plásmido pcmvtetO-hEGF (73), el promotor de ICP4 que contienen tetO contiene dos copias en tándem de los operadores tet 10 pb aguas abajo del elemento TATA de ICP4, TATATGA. Por lo tanto, como con pcmvtetO-hEGF, la expresión de hEGF de pICP4TO-hEGF se puede regular bien por la tetraciclina en presencia de tetR, y la inserción del tetO no tiene efecto sobre la actividad del promotor de ICP4 en ausencia de tetR. Una característica única adicional asociada con el promotor de ICP4 que contiene tetO en pICP4TO-hEGF es la ausencia de la secuencia de unión de ADN de ICP4 ATCGTCCACACGGAG (SEQ ID NO: 3), que se extiende por el sitio de iniciación de la transcripción del gen ICP4 (51) en el promotor de ICP4 de tipo silvestre. Por lo tanto, a diferencia del promotor ICP4 de tipo silvestre que está sujeto a auto-regulación por ICP4 (16, 57), el promotor de ICP4 que contiene tetO en pICP4TO-EGF-h no será suprimido por la proteína regulatoria principal ICP4 de HSV-1.

45 Para clonar gD2 bajo el control el promotor ICP4 que contiene tetO, primero construimos el plásmido p02ICP4-A por clonación del promotor de ICP4 que contiene tetO por clonación del promotor ICP4 que contiene tetO Sma I-Bam HI en pICP4TO hEGF dentro de pHSV2.ICP0-V en el MCS del vector. El p02.4TO-gD2 es un plásmido derivado de p02ICP4-A que codifica el gen gD2 de pAzcD-HSV-2 bajo el control del promotor de ICP4 que contiene tetO.

50 El p02lacZTO-gD2.C535C, un plásmido que codifica UL9-C535C bajo el control del promotor temprano de hCMV que contiene tetO con un truncamiento 5'en -236 pb del promotor de hCMV y el gen gD2 bajo el control del promotor de ICP4- tetO (Fig. 1A), se ha creado mediante la sustitución del fragmento SnaB I/Pst I de p02lacZTO-C535C con Hind III/Pst I-gD2 que contiene el fragmento de p02.4TO-gD2. En p02lacZTO-gD2.C535C, la transcripción del gen UL9-C535C y del gen gD2 se encuentran en una orientación opuesta.

Los virus

Las cepas 186 y G de HSV-2 de tipo silvestre, se propagaron y se analizaron en una placa en células Vero. N2-lacZ es un mutante nulo de ICP0 de HSV-2 que codifica el gen Lac Z bajo el control del promotor de ICP0 de HSV 2, en donde ambas copias del gen ICP0 se sustituyen por el gen Lac Z en pHSV2.ICP0-lacZ por medio de recombinación homóloga mediante la transfección de células U2OS con Nhe I pHSV2.ICP0-lacZ linealizado seguido de superinfección con HSV-2 como se describió previamente (74). La sustitución del gen ICP0 con el gen Lac Z en el locus de ICP0 se confirmó por análisis por PCR de ADN viral de N2-lacZ con los cebadores que flanquean el gen ICP0 y los cebadores específicos para el gen lac Z (41, 74).

N2-C535C es un derivado de N2-lacZ, en donde ambas copias del gen Lac Z se sustituyen por secuencias de ADN que codifican UL9-C535C bajo el control del promotor de hCMV que contiene tetO en el plásmido p02lacZ-TOC535C (Fig. 1B). En resumen, las células U2CEP4R11 fueron co-transfectadas con el p02lacZ-TOC535C linealizado y el ADN viral infeccioso de N2-lacZ con Lipofectamina 2000. La progenie de la transfección se seleccionó para la sustitución por recombinación de los genes lacZ de N2-lacZ con la secuencia de ADN que contiene cmvtetOUL9-C535C mediante ensayos de placa estándar. Las placas se tiñeron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil -b-D-galactopiranosido (X-Gal) 96 horas después de la infección. Se aislaron las placas blancas, que reflejan la sustitución de las dos copias del gen lacZ por la secuencia de ADN que codifica UL 9-C535C. Uno de los aislados, designado N2-C535C, produjo placas uniformemente blancas después de cuatro rondas de purificación de las placas.

CJ2-gD2 se construye mediante la sustitución de las dos copias del gen Lac Z en el locus de ICP0 en N2-lacZ con secuencias de ADN que codifican UL9-C535C bajo el tetO-cojinete de hCMV promotor principal inmediato temprano y gD2 bajo el control de promotor de ICP4 de HSV-1 que contiene tetO (Fig. 1B), que consiste en la secuencia promotora de ICP4 de HSV-1 desde -377 pb hasta -19 pb en relación al sitio de inicio de la transcripción del gen ICP4 (71).

Análisis SDS-PAGE y Western Blot

Las células Vero sembradas en placas de 60 mm a $7,5 \times 10^5$ células/placa fueron infectadas de manera simulada o infectadas con los virus indicados a una MOI de 10 PFU/célula. Los extractos celulares se prepararon 9 h o 16 h después de la infección (72). Las proteínas en el extracto celular se resolvieron por electroforesis en dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (9% de acrilamida), se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), y se sondaron con anticuerpos policlonales contra gD de HSV-1 (R45, un regalo de los Drs. Gary H. Cohen y Roselyn J Eisenberg), UL9 (un regalo de Marcos Challberg), o anticuerpos monoclonales específicos para ICP27 y gB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Ratones

Los ratones hembras BALB/c de 4-6 semanas de edad fueron adquiridos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los animales fueron alojados en jaulas de metal a cuatro ratones por jaula y se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Se permitió que los ratones se aclimataran a las condiciones de alojamiento durante 1 semana antes de la experimentación. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el "Harvard Medical Area Standing Committee on Animals" y "The American Veterinary Medical Association".

Inmunización y Exposiciones

Los ratones BALB/c se dividieron aleatoriamente en varios grupos y se les recortó el pelo en su flanco trasero izquierdo. Los ratones fueron ya sea vacunados con 2×10^6 PFU/ratón de CJ2-gD2, N2-C535C, CJ9-gD, o se simuló la vacunación con DMEM en un volumen de 30 μ l s.c. en el flanco trasero izquierdo usando una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 27. Los ratones se reforzaron después de 2 semanas y se expusieron la cepa G del HSV-2 de tipo silvestre 3 semanas después de la inmunización secundaria. Cinco días antes de la exposición, se inyectó a los ratones por vía subcutánea en el collarín del cuello con medroxiprogesterona (SICOR Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA) a 3 mg por ratón en un volumen de 20 μ l (7, 50). Para la exposición intravaginal, los ratones de todos los grupos fueron anestesiados, se tomaron muestra previas con una torunda de alginato de calcio (aplicador uretro-genital estéril con punta de alginato de calcio, Puritan Medical Products Company LLC, Guilford, Maine EE.UU.) y se inoculó por vía intravaginal con 20 μ l del medio de cultivo que contiene 5×10^5 PFU (50 LD₅₀) de la cepa G de HSV-2 (50). Los animales se mantuvieron sobre sus espaldas con su parte trasera elevada, bajo la influencia de la anestesia durante 30-45 min después de la infección.

Ensayos de infección aguda y observaciones clínicas

En los días 1, 2, 3, 5 y 7 después de la exposición, las mucosas vaginales se limpiaron con alginato de calcio (7). Se evaluaron los virus infecciosos en los materiales del frotis mediante ensayo de placa estándar sobre monocapas de células Vero. Después de la exposición al HSV-2 de tipo silvestre, los ratones fueron evaluados diariamente durante un periodo de seguimiento de 21 días para detectar signos de lesiones genitales y enfermedad sistémica. La gravedad de la enfermedad se puntuó de la siguiente forma: 0 = sin signos de infección herpética, 1 = eritema leve

genital y edema, 2 = inflamación genital moderada, 3 = lesiones genitales purulentas y/o enfermedad sistémica, 4 = parálisis de la extremidad posterior, y 5 = muerte (8, 50).

La detección de anticuerpos neutralizantes específicos de HSV-2

5 Se recogió sangre de venas de la cola de los ratones inmunizados y no inmunizados de manera simulada 4 semanas después de la inmunización primaria. Se determinó la titulación de los anticuerpos neutralizantes del suero como se describe anteriormente en presencia de complemento (5-7) con 250 PFU de la cepa 186 de HSV-2 de tipo silvestre. La titulación de los anticuerpos neutralizantes se expresó como la dilución final del suero necesaria para lograr una reducción del 50% de PFU de HSV en relación con el PFU de HSV obtenido en el medio más complemento solamente.

10 La inmunoprecipitación

15 Las células U2OS sembradas a $7,5 \times 10^6$ células por 100 mm de placa fueron transfectadas de manera simulada o transfectadas con 10 g de p02.4TO-gD con lipofectamina 2000 las 24 h después de la siembra. Se prepararon extractos celulares 48 horas después de la transfección (72). Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo mediante la mezcla de 10 μ l de suero agrupado recogido de los ratones inmunizados de manera simulada y de no inmunizados con 70 μ l de extractos de las células preparadas anteriormente. Los complejos específicos de IgG de gD/ratón se precipitaron con proteína A (kit IP Classic Pierce, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), se resolvieron en SDS-PAGE y se sondaron con el anticuerpo policlonal de conejo específico anti-gD, R45, seguido de la reacción de con IgG de conejo anti cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Ensayos ELISPOT de IFN-gamma

20 Los ratones hembra BALB/c fueron inmunizados de manera simulada con DMEM o no inmunizados con CJ2-gD2 a una dosis de 2×10^6 PFU/ratón dos veces con 2 semanas de diferencia. A las 5 y 10 semanas después de la segunda inmunización, los ratones inmunizados de manera simulada y los ratones no inmunizados con CJ2-gD2 fueron expuestos de forma simulada o no expuestos a la cepa 186 s.c de HSV-2 de tipo silvestre a una dosis de 1×10^4 PFU/ratón. Se aislaron esplenocitos de los grupos individuales de ratones ($n = 3$) en los días 4 o 5 después de la estimulación. Se realizó el ensayo ELISPOT de células T CD4⁺ y CD8⁺ como se ha descrito previamente (42). En resumen, se aislaron células T CD4⁺ y CD8⁺ de esplenocitos de ratón utilizando kits de aislamiento Dynal de ratón CD4 o CD8 negativos y se sembraron por cuadruplicado en una placa de filtración de 96 pocillos pre-recubiertas de un anticuerpo monoclonal específico de IFN- γ anti-ratón de (AN18) a $7,5 \times 10^4$ o $1,5 \times 10^5$ células/pocillo. Después de incubación a 37°C durante 20 h, los pocillos se lavan, se hacen reaccionar con anticuerpo monoclonal específico de IFN- γ biotinilado (R4-6A2, Mabtech) a temperatura ambiente, y se incubaron con fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech). Las células formadoras de puntos de IFN- γ se detectaron mediante la adición de sustrato BCIP/NBT. Los puntos se contaron en un microscopio de disección y se expresó el número de células formadoras de puntos de IFN- γ (SFC) como promedio \pm SEM por millón de células T CD4⁺ o CD8⁺.

PCR cuantitativa en tiempo real

35 La parte lumbar inferior y sacra de la columna vertebral incluyendo la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal se recogieron 16 días después del refuerzo de inmunización o 21 días después de la exposición intravaginal con 5×10^5 PFU de la cepa G de HSV-2 de 9 o 10 ratones que habían sido inmunizados con bien con CJ2-gD2 o con CJ9-gD. La columna vertebral se cortó en 4 partes y cada parte se mantuvo por separado en 0,5 ml de medio de crecimiento normal y se almacenó a -80°C para su posterior procesamiento. Se aisló el ADN total de cada ganglio de la raíz dorsal usando el kit de tejidos DNeasy (Qiagen, Santa Clarita, CA), y se suspendió en 400 μ l de tampón AE. La presencia de ADN de HSV-2 se cuantificó por PCR en tiempo real (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System) con 100 ng de ADN de los ganglios y cebadores específicos de la polimerasa de ADN del HSV (sentido: 5'GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C (SEQ ID NO: 4), antisentido: 5'CGG GGC GCT CGG CTA AC (SEQ ID NO: 5)) como se describe previamente (8). Las copias mínimas de ADN viral de HSV-2 que se pueden detectar de forma fiable eran 1 copia por reacción.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de t de Student pareadas. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando el valor P es menor que 0,05.

II. resultados

50 Construcción de CJ2-gD2

Como primer paso en la generación del virus recombinante de HSV-2 dominante negativo y defectuoso en la replicación que expresa gD2- y UL9-C535C, se construyó un mutante de delección de ICP0 de HSV-2, N2-lacZ, en donde ambas copias del gen ICP0 en la cepa 186 de HSV-2 se sustituyen por el gen LacZ bajo el control del promotor ICP0 de HSV-2 (Fig. 1B). Se demuestra que, de manera similar al mutante nulo 7314 de ICP0 de HSV-1 (11), la eficacia de formación de placas de N2-lacZ en la línea celular U2OS de osteosarcoma humano es 425

veces mayor que en las células Vero, lo que indica que la actividad celular en las células U2OS también puede sustituir funcionalmente a ICP0 de HSV-2. En comparación con los HSV-2 de tipo silvestre, la eficiencia de replicación de N2-lacZ en células Vero se reduce más de 600 veces a una MOI de 0,1 PFU/célula. Según este hallazgo, la inoculación intravaginal de N2-lacZ a 1×10^5 y 5×10^5 PFU/ratón no condujo a ninguna enfermedad local o sistémica, mientras que los ratones infectados con 1×10^4 PFU/ratón de HSV-2 de tipo silvestre desarrollaron herpes genital severo, y todos murieron 11 días después de la infección. Por otra parte, N2-lacZ no puede establecer una infección latente reactivable tras la infección intravaginal a una dosis de 5×10^5 PFU/ratón. Estos resultados indican que, de manera similar a ICP0 de HSV1 (10, 11, 37, 64), la delección de ICP0 de HSV-2 dificulta seriamente la capacidad del virus para iniciar la infección latente aguda y reactivable in vivo.

Con el objetivo de maximizar los niveles de expresión de gD2 por un virus recombinante de HSV-2 dominante negativo de replicación defectuosa, se construyó un recombinante del virus HSV-2 dominante negativo y de replicación defectuosa (CJ2-gD2) mediante la sustitución de las dos copias del gen Lac Z en N2-lacZ con secuencias de ADN que codifican el gen gD2 dirigido por el promotor temprano inmediato de ICP4 de HSV-1 que contiene tetO y UL9-C535C bajo el control promotor temprano inmediato de hCMV que contiene tetO con un truncamiento en -236 pb de la longitud completa del promotor temprano inmediato CMVh (fig. 1B). Así, a diferencia de CJ9-gD, que codifica una sola copia del gen gD de HSV-1 insertado dirigido por el promotor de hCMV que contiene tetO en el locus (41) de UL9 de HSV-1, CJ2-gD2 contiene 2 copias de gen gD2 controlados por el promotor temprano inmediato de ICP4 de HSV-1 que contiene tetO, que consiste en la secuencia del promotor de ICP4 de HSV-1 desde -377 pb hasta -19 pb en relación al sitio de inicio de la transcripción del gen ICP4. N2-C535C es un recombinante de HSV-2 en donde ambas copias del gen Lac Z en N2-lacZ se sustituyen por UL9-C535C bajo el control de promotor temprano inmediato de nCMV de HSV-1 que contiene tetO.

CJ2-gD2 expresa altos niveles de gD2 y UL9-C535C en las células Vero infectadas

Para examinar la expresión de gD2 y UL9-C535C del promotor temprano inmediato de ICP4 de HSV-1 y del promotor temprano inmediato de hCMV que contienen tetO, respectivamente, las células Vero se infectaron con el HSV-2 de tipo silvestre, N2-lacZ, N2-C535C, y CJ2-gD2 a una MOI de 10 PFU/célula y se recogieron 9 h después de la infección. Se analizaron las proteínas de las células infectadas por ensayos de transferencia Western con un anticuerpo monoclonal de ICP27 de HSV-1/2, un anticuerpo policlonal de UL9, y un anticuerpo policlonal de gD1 (R45). Dado que, como gD2, gB2 es el objetivo principal de anticuerpos neutralizantes, así como las respuestas de células T y es un producto γ l, las proteínas de las células infectadas también se sondearon con un anticuerpo monoclonal gB-específico. La Fig. 2A muestra que CJ2-gD2 y N2-C535C expresan niveles similares de ICP27 proteína inmediata temprana de HSV-2 a los expresados por HSV-2 de tipo silvestre y N2-lacZ. Si bien se han detectado cantidades significativas de UL9-C535C en células CJ2-gD2 y N2-C535C infectadas, se detectó poco gD2 o gB2 en las células infectadas con N2-C535C. En contraste con la infección de N2-C535C, sin embargo, la infección de células Vero con CJ2-gD2 conduce a la expresión de un alto nivel de gD2 a niveles similares a los de las células infectadas por el tipo silvestre de HSV-2, y la expresión de gD2 no tiene efecto en la expresión de gB2. Los resultados también indican que, como el mutante nulo 7134 de ICP0 de HSV-1 (71), la delección de ICP0 de HSV-2 en N2-lacZ reduce en gran medida la expresión de gD2. Debido al nivel muy bajo de expresión de UL9 a partir del auténtico promotor temprano de HSV (68), no se detectó UL9 de tipo silvestre entre las células infectadas por estos cuatro virus diferentes. Además, se observa que los niveles de UL9-C535C expresados en las células infectadas por CJ2-gD2 son consistentemente más altos que los de las células infectadas por N2-C535C, lo que sugiere que los elementos de respuesta VP16 de HSV, TAATGARAT, presentes en el promotor de ICP4 de HSV-1 (71) pueden conducir a una mayor expresión de UL9-C535C a partir del promotor temprano inmediato de CMVh del sistema promotor híbrido ICP4/CMVh descrito.

El análisis de transferencia Western con el anticuerpo policlonal gD1 (R45) que se presenta en la Fig. 2B muestra que, si bien se detectaron niveles mucho más altos de gD en células infectadas con HSV-1 de tipo silvestre, que en las células infectadas con células de HSV-2 de tipo silvestre, los niveles de gD detectados en las células infectadas con CJ9-gD I eran marcadamente más bajos que en las células infectadas por CJ2-gD2. Este hallazgo demuestra que CJ2-gD2 expresa gD2 más eficientemente que el gD1 expresado por CJ9-gD.

Para demostrar que UL9-C535C y gD2 expresados en células Vero infectadas con gD2 de CJ2 están, de hecho, bajo el control de los promotores que llevan tetO, se infecta a continuación una línea estable de células Vero que expresan tetR, células VCEP4R-28, con HSV-2 de tipo silvestre y CJ2-gD2 a una MOI de 10 PFU/célula en ausencia o en presencia de tetraciclina. Las proteínas de las células infectadas se recogieron 9 h después de la infección y se analizaron por Western blot. Como puede verse (Fig. 3), aunque se detectaron niveles similares de ICP27 en las células VCEP4R-28 infectadas con HSV-2 de tipo silvestre y con CJ2-gD2, tanto en la ausencia como en presencia de tetraciclina, se detectó UL9-C535C en células VCEP4R-28 infectadas con CJ2-gD2 sólo cuando la tetraciclina estaba presente y se detectaron niveles significativamente más altos de gD2 en presencia de tetraciclina que en su ausencia.

CJ2-gD2 no se puede replicar en células Vero

Debido a la falta de ICP0 y al alto nivel de expresión de UL9-C535C a partir del promotor principal inmediato temprano de hCMV que contienen tetO, CJ2-gD2 tuvo que ser construido y propagado en ICP0 que expresa tetR complementando con la línea celular de U2OS U2CEP4R11 (68). Se realizó un ensayo en una placa $6,65 \times 10^7$ PFU de CJ2-gD2 sobre monocapas de células Vero y no se detectó ningún virus infeccioso, lo que demuestra que la eficacia de la formación de placas de CJ2-gD2 en células Vero se reduce al menos $6,65 \times 10^7$ veces en comparación con las células U2CEP4R11 complementarias.

Inhibición de la replicación del HSV-2 de tipo silvestre por CJ2-gD2

A continuación se estudió el efecto dominante negativo de los altos niveles de expresión de UL9-C535C por CJ2-gD2 en la replicación viral de HSV-2 de tipo silvestre mediante el ensayo de co-infección (Fig. 4). La Fig. 4A muestra que la co-infección de células Vero con CJ2-gD2 a una MOI de 5 PFU/célula y con HSV-2 de tipo silvestre a una MOI de 2 PFU/células dio lugar a una disminución de casi 500 veces en la producción de HSV-2 de tipo silvestre en comparación con las células infectadas por separado con HSV-2 de tipo silvestre a la misma MOI, independientemente de si la titulación de los virus se determinaba en células Vero o en células U2CEP4R11. Se detectó poca reducción en el rendimiento de virus de tipo silvestre cuando se realizaba un experimento de co-infección similar con N2-lacZ.

Para examinar aún más la potencia de CJ2-gD2 en la inhibición de la replicación del HSV-2 de tipo silvestre, se llevaron a cabo experimentos de co-infección con el HSV-2 de tipo silvestre y con CJ2-gD2 en proporciones de MOI de 1: 1 y 3: 1, respectivamente. Los resultados en la Fig. 4B muestran que CJ2-gD2 es eficaz en la prevención de la infección de HSV-2 de tipo silvestre en ambas condiciones, lo que lleva a una reducción de 151- y 94 veces aproximadamente en la síntesis del virus de tipo silvestre en las proporciones de co-infección indicadas en comparación con las células infectadas con HSV-2 de tipo silvestre por separado a MOI de 5 PFU/célula y 15 PFU/célula, respectivamente.

El CJ2-gD2 es avirulento tras la inyección intracerebral en ratones

La neurovirulencia es una de las características de la infección por HSV. Para determinar la capacidad de CJ2-gD2 y N2-C535C de replicarse en el SNC, ratones hembra BALB/c de 5 a 6 semanas de edad fueron asignados al azar a cinco grupos de 8 ratones cada uno. Se inocularon CJ2-gD2 y N2-C535C directamente en el cerebro de cada ratón en el lóbulo frontal izquierdo a $2,5 \times 10^6$ PFU por ratón en un volumen de 20 μ l con una aguja de insulina de calibre 28 a una profundidad de 4 mm (74). La morbilidad y mortalidad fueron controladas durante 35 días. Dado que la LD₅₀ de la cepa 186 de HSV-2 de tipo silvestre es de alrededor de 10 PFU en ratones BALB/c hembra después de la inyección intravítrea (38), un grupo de ratones también se inocularon con el HSV-2 de tipo silvestre a 25 PFU/ratón. Como control adicional, los ratones del quinto grupo se inocularon con N2-lacZ a 1×10^6 PFU/ratón. La Fig.5 muestra que, al igual que los ratones inoculados con DMEM, los ratones inoculados por vía intracerebral con CJ2-gD2 y N2-C535C a una dosis de $2,5 \times 10^6$ PFU no mostraron signos de neurovirulencia durante un seguimiento de 35 días, mientras que todos los ratones inoculados con el HSV-2 de tipo silvestre a una dosis de 25 PFU/ratón (una dosis 100 000 veces menor que la dada a los ratones inoculados con CJ2-gD2) murieron 10 después de la inoculación, y todos los ratones inoculados exhibieron signos de la enfermedad del SNC comúnmente asociada con la infección por HSV-2, incluyendo piel rugosa, postura encorvada, ataxia, y anorexia. Aunque el 100% de los ratones inoculados con N2-lacZ sobrevivió, todos los ratones mostraron signos de encefalitis.

Inducción de los anticuerpos neutralizantes específicos de HSV-2 y respuesta a los anticuerpos específicos de gD2 en los ratones inmunizados con CJ2-gD2

Se determinó la capacidad de CJ2-gD2 para provocar anticuerpos neutralizantes específicos anti-HSV-2 en ratones inmunizados con CJ2-gD2 a una dosis de 2×10^6 PFU. Como controles, también fueron inmunizados grupos de ratones con N2-C535C o CJ9-gD a la misma dosis. Como se muestra (Fig. 6A), la titulación promedio de los anticuerpos de neutralización específicos de HSV-2 en ratones inmunizados con CJ2-gD2 era de un promedio de 500, que es 3 veces mayor que la de los ratones inmunizados con N2-C535C ($p = 0,015$), y es comparable a la titulación de los anticuerpos de neutralización inducida en los ratones inmunizados con CJ9-gD ($p = 0,28$). No se detectó titulación de los anticuerpos específicos contra el HSV-2 en ratones vacunados de forma simulada a una dilución 1:10.

La Fig. 6B muestra que mientras que se detectaron niveles similares de respuesta de anticuerpos específica de gD entre los ratones inmunizados con CJ2-gD2 y con CJ9-gD cuando se probaron los respectivos complejos de gD2 inmunoprecipitados con anticuerpos anti-gD1, R45, los niveles de anticuerpos específicos anti-gD en los ratones inmunizados con CJ2-gD2 fueron significativamente mayores que en los ratones inmunizados con N2-C535C y en los controles con inmunización simulada. Tomados en conjunto, los resultados presentados en la Fig. 6 indican que el alto nivel de expresión de gD2 por CJ2-gD2 conduce a una mayor eficacia en la obtención de anticuerpos anti-gD2, así como respuestas de anticuerpos neutralizantes específicos anti-HSV-2 en comparación con N2-C535C.

La inducción de la respuesta de células T específica de HSV-2 en ratones inmunizados con CJ2-gD2

Para evaluar la eficacia de la inmunización con CJ2-gD2 en el desencadenamiento de la respuesta de las células T específica de HSV-2, se llevó a cabo el experimento de recuerdo para examinar las respuestas de memoria de las células T en los ratones inmunizados tras estimulación con HSV-2 de tipo silvestre. En primer lugar, los ratones vacunados de forma simulada y los ratones vacunados con CJ2-gD2 fueron bien expuestos a una exposición simulada o expuestos a HSV-2 de tipo silvestre 9-10 semanas después de la estimulación de la inmunización seguida de ensayos ELISPOT de IFN γ -gamma con células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas de bazo de los distintos grupos de ratones (n = 3) el día 5 después de la estimulación (Fig. 7A). Los ratones vacunados con CJ2-gD2 expuestos a HSV-2 de tipo silvestre incrementaron 4.8 veces las células T CD4⁺ positivas para IFN-gamma en comparación con los ratones inmunes a CJ2-gD2 infectados de manera simulada (p <0,0001). Más significativamente, el número de células CD4⁺ T secretoras de IFN γ detectadas en ratones infectados por el HSV-2 vacunados previamente con CJ2-gD2 era 18 veces mayor que en los ratones vacunados de manera simulada infectados por HSV-2 (p <0,0001). No se detectaron células CD4⁺ T positivas para IFN- γ en los ratones control infectados y vacunados de manera simulada en condiciones idénticas. Estos hallazgos muestran que la inmunización con CJ2-gD2 provoca una fuerte respuesta de memoria de las células T CD4⁺.

Si bien hubo un aumento mayor de 2 veces de las células T CD8⁺ secretoras de IFN- γ en ratones vacunados con CJ2-gD2 en comparación con los controles vacunados de forma simulada, se detectaron números similares de células T CD8⁺ secretoras de IFN- γ en los bazo de ratones infectados de manera simulada por el HSV-2 y ratones vacunados con gD2 de CJ2 infectados por HSV-2 (Fig. 7B). Por tanto, se llevó a cabo la segunda serie de experimentos de recuerdo, en la que los ratones vacunados de manera simulada y los ratones vacunados con CJ2-gD2 fueron expuestos o expuestos de manera simulada al HSV-2 de tipo silvestre (n = 3) 5-6 semanas después de la segunda vacunación. Se realizaron ensayos ELISPOT de CD4⁺ y CD8⁺ en el día 4 después de la infección (Fig. 7C y 7D). Se detectó un aumento de 8.6- y 5.7 veces en las células T CD4⁺ y CD8⁺ secretoras de IFN- γ , respectivamente, en los ratones inmunes a CJ2-gD2 tras la infección por HSV-2 en comparación con los ratones inmunes a CJ2-gD2 infectados de manera simulada (células T CD4⁺: p = 0,035; células T CD8⁺: p = 0,01). Además, después de la estimulación con HSV-2, las células T CD4⁺ y CD8⁺ secretoras de IFN γ fueron más de 8 y 9,5 superiores, respectivamente, en los ratones vacunados con CJ2-gD2 en comparación con los ratones vacunados de manera simulada (células T CD4⁺: p = 0,036; células T CD8⁺: p = 0,01). En conjunto, estos estudios demuestran que la inmunización con CJ2-gD2 puede provocar respuestas de memoria robustas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HSV-2, que se pueden recordar de manera eficaz durante la infección por HSV-2.

30 Proyección contra la infección genital y la enfermedad de HSV-2 en ratones inmunizados

Entre cinco a seis semanas después de la inmunización inicial, los ratones fueron expuestos por vía intravaginal a 50 LD₅₀ (5 x 10⁵ PFU/ratón) de la cepa G de HSV-2. Se tomaron muestras vaginales en los días 1, 2, 3, 5 y 7 después de la exposición. Los ratones se observaron durante un periodo de seguimiento de 21 días para la incidencia de la enfermedad por HSV-2 genital y diseminada. Como se muestra en la Fig. 8A, los rendimientos de los virus de exposición se redujeron más de 200 veces en el día 1 (p <0,001) y 130 veces en el día 2 (p <0,0001) en los ratones inmunizados con CJ2-gD2 (n = 9), en comparación con los controles inmunizados de manera simulada (n = 10). Aunque no hubo una diferencia significativa en la reducción de los virus de exposición producidos los días 1, 2 y 3 después de la exposición, entre los grupos de ratones inmunizados con CJ2-gD2 y con N2-C535C (n = 10), la inmunización con CJ2-gD2 fue más eficaz que la de CJ9-gD en la reducción de los virus de exposición producidos en los días 1 (p = 0,03), 2 (p = 0,025) y 3 (p <0,007). No se detectó ningún o casi ningún virus de exposición en ratones inmunizados con CJ2-gD2, N2-C535C, o CJ9-gD el día 5 después de la exposición, mientras que todos los ratones vacunados de forma simulada siguieron produciendo virus con un rendimiento promedio de más de 5 x 10³ PFU/ml. Ningún virus de exposición estaba presente en los materiales de los frotis vaginales recogidos el día 7 después de la estimulación en los tres grupos de los ratones inmunizados. En un experimento separado, se observó que mientras que no hubo producción de virus por los ratones inmunizados con CJ2-gD2 el día 5 después de la exposición, se detectó la presencia de HSV-2 de tipo silvestre en 5 de los 7 ratones inmunizados con N2-C535C y en 4 de los 7 ratones inmunizados con CJ9-gD.

Los resultados en la Fig. 9 muestran que los ratones inmunizados con CJ2-gD2 estaban completamente protegidos del desarrollo de lesiones genitales locales y no mostraron signos de enfermedad sistémica después de la exposición al HSV-2 de tipo silvestre (Fig. 9A). Todos los ratones inmunizados de manera simulada desarrollaron lesiones genitales severas y sucumbieron a la infección de HSV-2 de tipo silvestre el día 11 después de la exposición (Fig. 9B). Aunque la inmunización con N2-C535C y CJ9-gD protegió a los ratones contra la exposición letal al HSV-2 de tipo silvestre, el 20% y el 30% de los ratones experimentaron una enfermedad genital local transitoria de grado bajo (puntuación 1) en ratones inmunizados con N2-C535C- y CJ9-gD, respectivamente (Tabla 1). En un experimento similar (Tabla 1), se observó que entre los ratones inmunizados con CJ9-gD (n = 7), 2 ratones experimentaron bajos grados de la enfermedad genital local, y 1 ratón mostró signo de enfermedad sistémica y murió el día 14 después de la exposición, y 3 de cada 7 ratones inmunizados con N2-C535C (43%) mostraron un bajo grado de enfermedad genital local (puntuación = 1). Una vez más, no se observaron signos de la enfermedad herpética local y sistémica en ratones inmunizados con gD2 de CJ2 (n = 7). En conjunto, estos estudios demuestran que CJ2-gD2 es una vacuna más eficaz que N2-C535C y que CJ9-gD en la protección de ratones contra la enfermedad genital tras la exposición intravaginal del HSV -2 de tipo silvestre.

Tabla 1: Porcentaje de protección contra la enfermedad herpética en ratones con inmunización simulada y ratones inmunizados por exposición intravaginal al HSV-2 de tipo silvestre

	Simulados	CJ2-gD2	N2-C535C	CJ9-gD
Exp 1 (n=9-10)	0	100%	80%	70%
Exp 2 (n=7-8)	0	100%	57%	57%

Referencias

1. Abu-Raddad, et al., PLoS ONE 3:e2230 (2008).
2. Ackermann, et al., J. Virol. 52:108-18 (1984).
- 5 3. Adelson, et al., J. Clin. Virol. 33:25-34 (2005).
4. Arvin, et al., Infect. Immun. 40:184-9 (1983).
5. Augustinova, et al., J. Virol. 78:5756-65 (2004).
6. Bourne, et al., Vaccine 14:1230-4 (1996).
7. Brans, et al., J. Invest. Dermatol. 129:2470-9 (2009).
- 10 8. Brans, et al., J. Invest. Dermatol. 128:2825-32 (2008).
9. Bryson, et al., J. Infect. Dis. 167:942-6 (1993).
10. Cai, et al., J. Virol. 67:7501-12 (1993).
11. Cai, et al., J. Virol. 63:4579-89 (1989).
12. Cohen, et al., J. Virol. 49:102-8 (1984).
- 15 13. Coleman, et al., J. Clin. Microbiol. 18:287-91 (1983).
14. Cooper, et al., Cell. Immunol. 239:113-20 (2006).
15. Corey, et al., N. Engl. J. Med. 314:749-57 (1986).
16. DeLuca, et al., J. Virol. 62:732-43 (1988).
17. Dolan, et al., J. Virol. 72:2010-21 (1998).
- 20 18. Dudek, et al., Virology 344:230-9 (2006).
19. Fleming, et al., N. Engl. J. Med. 337:1105-11 (1997).
20. Freeman, et al., Aids 20:73-83 (2006).
21. Glorioso, et al., J. Virol. 50:805-12 (1984).
22. Grammer, et al., J. Immunol. 145:2249-53 (1990).
- 25 23. Gupta, et al., Lancet 370:2127-37 (2007).
24. Handler, et al., J. Virol. 70:6067-70 (1996).
25. Hirsch, Herpes simplex virus, p. 1144-1153. In G. L. Mandell, R. G. J. Douglas, and J. E. Bennett (ed.), Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone Inc., New York (1990).
26. Honess, et al., J. Gen. Virol. 22:159-69 (1974).
- 30 27. Hosken, et al., J. Virol. 80:5509-15 (2006).
28. Johnson, et al., J. Immunol. 145:702-10 (1990).
29. Jones, et al., Herpes 11:12-7 (2004).
30. Kim, et al., J. Immunol. 181:6604-15 (2008).
31. Koelle, et al., Annu. Rev. Med. 59:381-395 (2008).
- 35 32. Koelle, et al., Clin. Microbiol. Rev. 16:96-113 (2003).
33. Koelle, et al., Curr. Eye Res. 30: 929-42 (2005).
34. Koelle, et al., J. Clin. Invest. 91:961-8 (1993).
35. Kousoulas, et al., Virology 166:423-31 (1988).
36. Lakeman, et al., Sex. Transm. Dis. 13:61-6 (1986).
- 40 37. Leib, et al., J. Virol. 63:759-68 (1989).
38. Lewandowski, et al., J. Neuroimmunol. 81:66-75 (1998).
39. Liesegang, Cornea 20:1-13 (2001).
40. Looker, et al., Sex. Transm. Infect. 81:103-7 (2005).
41. Lu, et al., J. Invest. Dermatol. 129:1174-84 (2009).
- 45 42. McGeoch, et al., J. Gen. Virol. 69:1531-74 (1988).
43. McGeoch et al., J. Gen. Virol. 72:3057-3075 (1991);
44. McGeoch et al., Nucl. Acid Res. 14:1727-1745 (1986)
45. McGeoch, et al., Nucleic Acids Res 14:3435-48 (1986).
46. Mertz, et al., Ann. Intern. Med. 116:197-202 (1992).
- 50 47. Mikloska, et al., J. Gen. Virol. 79:353-61 (1998).
48. Mikloska, et al., J. Immunol. 164:5167-76 (2000).
49. Minson, et al., J. Gen. Virol. 67 (Pt 6):1001-13 (1986).
50. Morrison, et al., Virology 243:178-87 (1998).
51. Muller, J. Virol. 61:858-65 (1987).
- 55 52. Nagot, et al., N. Engl. J. Med. 356:790-9 (2007).
53. Para, et al., J. Virol. 55:483-8 (1985).
54. Pereira, Dev. Biol. Stand. 52:115-31 (1982).
55. Pereira, et al., Infect. Immun. 29:724-32 (1980).
56. Perry, et al., J. Gen. Virol. 67:2365-2380 (1986)
- 60 57. Roberts, et al., J. Virol. 62:4307-20 (1988).

58. Roizman, et al., Herpes simplex viruses and their replication, p. 2399-2459. In a. P. M. H. D. M. Knipe (ed.), Fields Virology, 4rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2001).
59. Schmidt, et al., J. Infect. Dis. 149:645-6 (1984).
60. Stanberry, Herpes 11 (Suppl 3):161A-169A (2004).
- 5 61. Stanberry, et al., Clin. Infect. Dis. 30:549-66 (2000).
62. Stanberry, et al., N. Engl. J. Med. 347:1652-61 (2002).
63. Starr, et al., Gene Ther 3:615-23 (1996).
64. Stow, et al., J. Gen. Virol. 67:2571-85 (1986).
65. Tigges, et al., J. Virol. 66:1622-34 (1992).
- 10 66. Whitley, et al, Clin Infect Dis 26:541-53; quiz 554-5 (1998)
67. Xu, et al, J. Infect. Dis. 755:1019-24 (2002).
68. Yao, et al., Hum. Gene Ther. 70: 1811-8 (1999).
69. Yao, et al., Hum. Gene Ther. 70:419-27 (1999).
70. Yao, et al., Antiviral Res. 55: 127-33 (2002).
- 15 71. Yao, et al, J. Virol 69:6249-58 (1995).
72. Yao, et al, J. Virol. 65:8158-68 (1994).
73. Yao, et al, Hum. Gene Ther. P/ 1939-50 (1998).
74. Yao, et al., Mol. Ther. 75: 1133-41 (2006).
75. Zarling, et al, J. Immunol. 756:4669-73 (1986).

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	The Brigham and Women's Hospital, Inc. Yao, Feng	
5	<120>	Vacunas de virus herpes simple	
	<130>	REP08834EP	
10	<150>	10840033.4	
	<151>	2012-06-06	
	<160>	5	
	<170>	PatentIn versión 3.5	
15	<210>	1	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	Escherichia coli	
20	<400>	1	
		tccctatcag tgatagaga	19
	<210>	2	
25	<211>	953	
	<212>	DNA	
	<213>	herpesvirus humano 1	
	<400>	2	
30		atgggagagg cgtcgctgcc ggcccaggcc gccgagacgg aggaggtggg tcttttgtcg	60
		aaaaatacct ccggtccgat gtcgcgccgg cggaaattgt cgcgctcatg cgcaacctca	120
		acagcctgat gggacgcacg cggtttattt acctggcggt gctggaggcc tgtctccgcg	180
35		ttcccatggc caccgcagc agcgccatat ttcggcggat ctatgaccac tacgccacgg	240
		gcgctatccc cagcatcaac gtcaccggag agctggagct cgtggccctg cccccaccc	300
40		tgaacgtaac ccccgctctgg gagctgttgt gctgtgcag caccatggcc gcgcgcctgc	360
		attgggactc ggcggccggg ggatctggga ggaccttcgg ccccgatgac gtgctggacc	420
		tactgacccc cactacgac cgctacatgc agctgggtgtt cgaactgggc cactgtaacg	480
45		taaccgacgg acttctgctc tcggaggaag ccgtcaagcg cgtcgccgac gccctaagcg	540
		gctgtcccc gcgcgggtcc gttagcgaga cggaccacgc ggtggcgctg ttcaagataa	600
50		tctggggcga actgtttggc gtgcagatgg ccaaaagcac gcagacgttt cccggggcgg	660
		ggcgcgttaa aaacctcacc aaacagaaa tcgtgggggtt gttggacgcc caccacatcg	720
		accacagcgc ctgccggacc cacaggcagc tgtacgccct gcttatggcc cacaagcggg	780
55		agtttgccgg cgcgcgcttc aagctacgcg tgcccgcgtg ggggcgctgt ttgcgcacgc	840
		actcatccag cgccaacccc aacgctgaca tcatcctgga ggcggcgctg tcggagctcc	900

ES 2 577 704 T3

ccaccgaggc ctggcccatg atgcaggggg cggatgaactt tagcacccta taa 953

5 <210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> herpesvirus humano 1

10 <400> 3
atcgtccaca cggag 15

15 <210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> herpesvirus humano 2
<400> 4
gctcgagtgc gaaaaaacgt tc 22

20 <210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> herpesvirus humano 2

25 <400> 5
cggggcgctc ggctaac 17

REIVINDICACIONES

1. Un virus recombinante del virus herpes simplex 2 (HSV-2) dominante negativo de replicación defectuosa, que comprende dentro de su genoma:
 - 5 a) una primera secuencia que codifica una primera glicoproteína D (gD2) de HSV-2, en donde dicha secuencia está unida operativamente a un primer promotor de ICP4 de HSV-1 que contiene tet-O;
 - b) una segunda secuencia que codifica una segunda (gD2) de HSV-2, en donde dicha segunda secuencia está unida operativamente a un segundo promotor de ICP4 de HSV-1 que contiene tet-O;
 - 10 c) una tercera secuencia que codifica una primera proteína UL9 C535C (SEQ ID NO: 2), en donde dicha tercera secuencia está unida operativamente a un primer promotor temprano inmediato de hCMV que contiene tet-O con un truncamiento en -236pb del promotor de longitud completa; y
 - d) una cuarta secuencia que codifica una segunda proteína UL9 C535C (SEQ ID NO: 2) en donde dicha cuarta secuencia está unida operativamente a un segundo promotor temprano inmediato de hCMV tet que contiene que contiene tet-O con un truncamiento en -236pb del promotor de longitud completa;
 - 15 y en donde dicho genoma no comprende una secuencia que codifica una proteína ICP0 funcional.
2. El virus recombinante de la reivindicación 1, en donde:
 - a) dichos primero y segundo promotores de ICP4 de HSV-1 que contienen tet-O y dichos primero y segundo promotores tempranos inmediatos de hCMV que contienen tet-O tienen cada uno un elemento TATA;
 - 20 b) cada una de dichas secuencias del promotor que contienen Tet-O comprenden dos sitios de unión al represor op2 unidas por 2-20 nucleótidos de unión, en donde el primer nucleótido de dicho operador tet está entre los nucleótidos 6 y 24 de 3 ' hasta el último nucleótido de dicho elemento TATA ;
 - c) dicha primera secuencia que codifica una gD2 de HSV-2 y dicha segunda secuencia que codifica una gD2 de HSV-2 se encuentran en 3 ' respecto de dichos primero y segundo promotores de ICP4 de HSV-1 que contienen Tet-O respectivamente;
 - 25 d) dicha tercera secuencia que codifica una proteína UL9 C535C (SEQ ID NO: 2) y dicha cuarta secuencia que codifica una proteína UL9 C535C (SEQ ID NO: 2) se encuentran en 3 ' respecto de dichos primero y segundo promotores tempranos inmediatos de hCMV que contienen tet-O respectivamente.
3. El virus recombinante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que expresa también uno o más genes inmunomoduladores recombinantes, por ejemplo, IL12 o IL15;

gB de HSV-2 bajo el control del promotor temprano inmediato de hCMV o de HSV que contienen tet-O; y/o

gC de HSV-2 bajo el control del promotor temprano inmediato de hCMV o de HSV que contienen tet-O.
4. El virus recombinante de una cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que expresa gB de HSV-2 bajo el control promotor temprano inmediato de hCMV o de HSV que contienen tet-O.
- 35 5. El virus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la transcripción de dicha tercera secuencia que codifica la proteína UL9 C535C (SEQ ID NO: 2) y la transcripción de dicha primera secuencia que codifica gD2 de HSV-2 están en orientación opuesta, y en donde la transcripción de dicha cuarta secuencia que codifica la proteína C535C UL9 (SEQ ID NO: 2) y la transcripción de dicha segunda secuencia que codifica gD2 de HSV-2 están en orientación opuesta.
- 40 6. El virus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los promotores ICP4 carecen de una secuencia de unión al ADN de ICP4.
7. Una vacuna que comprende el virus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma de dosis unitaria.
8. La vacuna de la reivindicación 7, en donde el virus recombinante está presente en un mínimo de 1×10^7 pfu por dosis unitaria, por ejemplo, 1×10^7 a 1×10^9 pfu por dosis unitaria.
- 45 9. La vacuna de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, para su uso en la inmunización de un paciente contra la infección de HSV-1 o de HSV-2.

10. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 o la vacuna para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el paciente es seropositivo para HSV-1, seropositivo para HSV-2, seropositivo tanto para HSV-1 como para HSV-2, o seronegativo para la infección por HSV-1 y HSV-2.

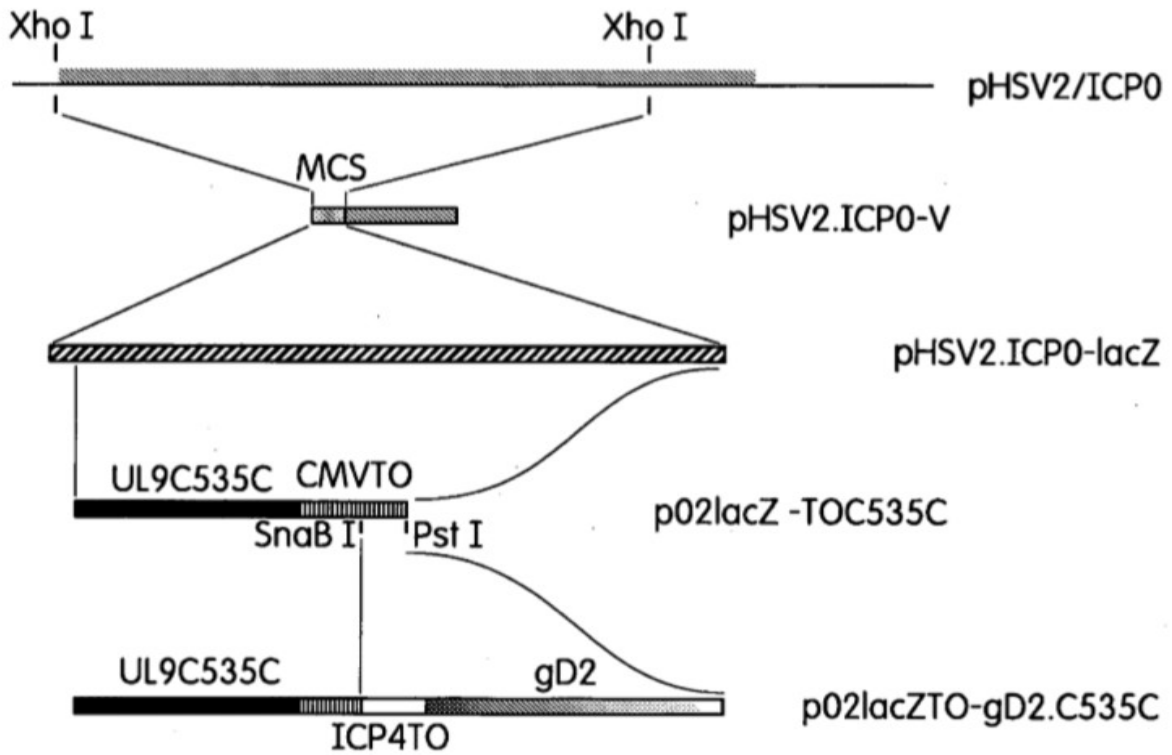


FIG. 1A

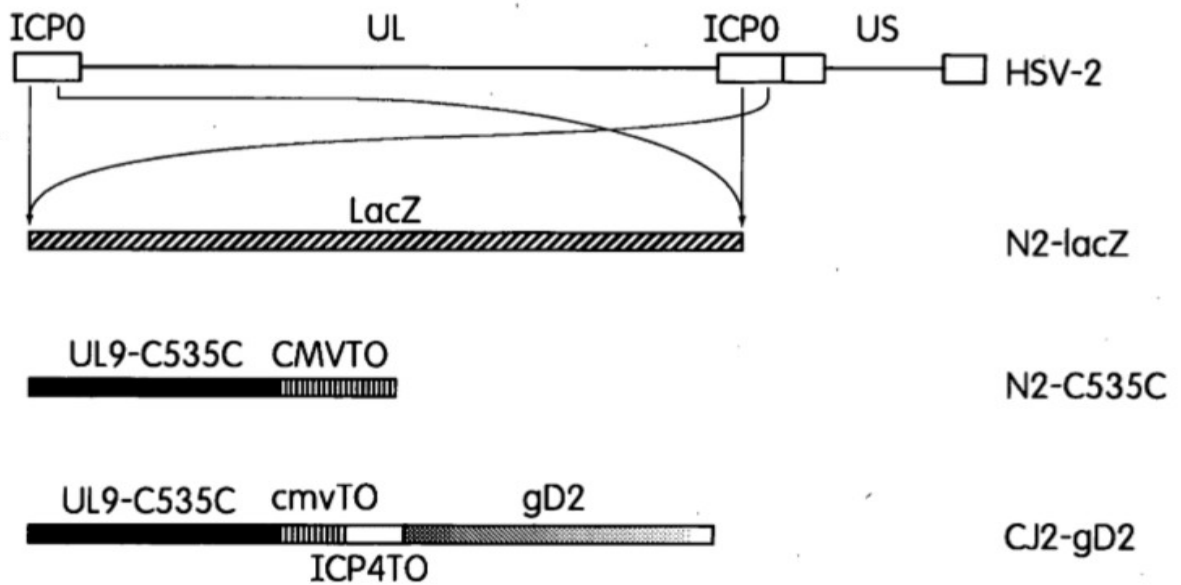


FIG. 1B

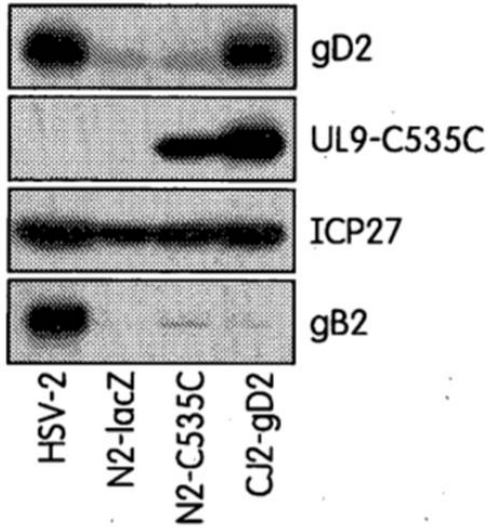


FIG. 2A

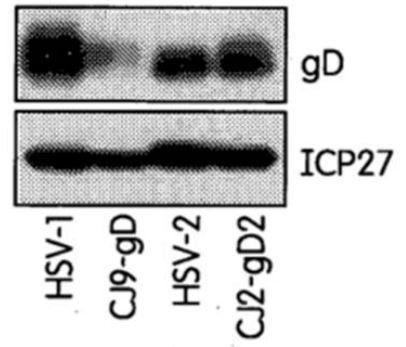


FIG. 2B

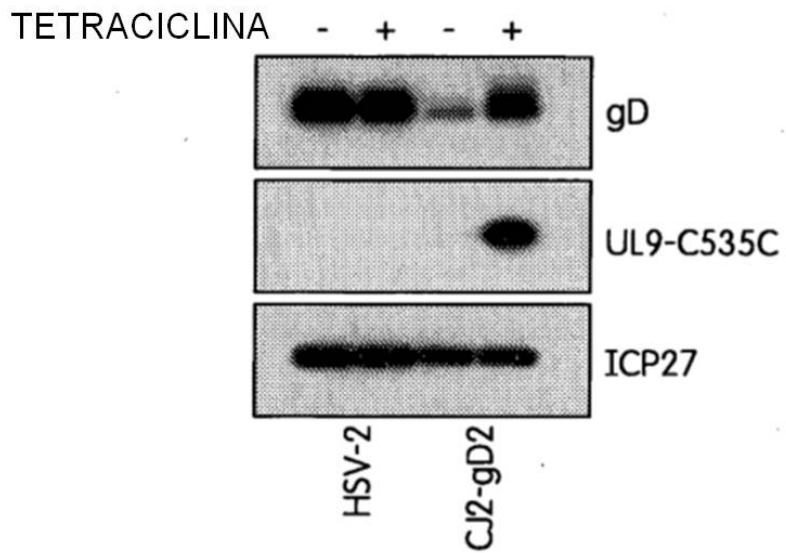


FIG. 3

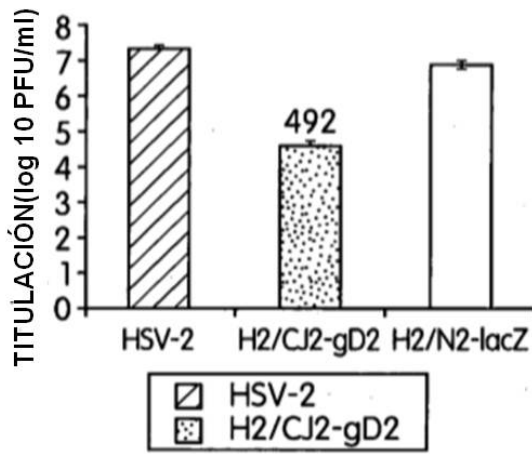


FIG. 4A

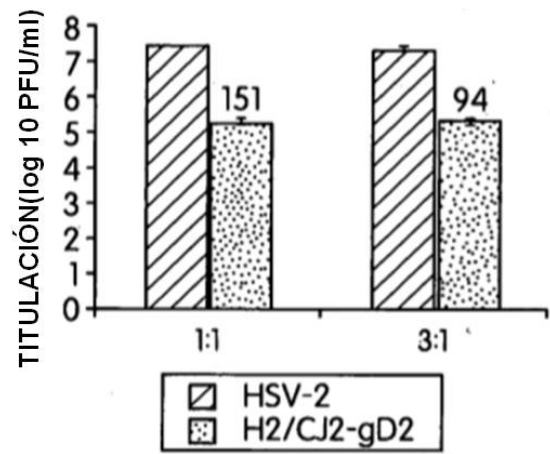


FIG. 4B

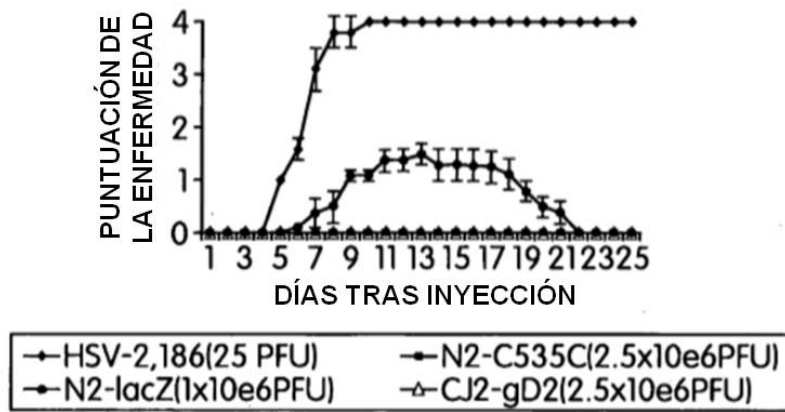


FIG. 5A

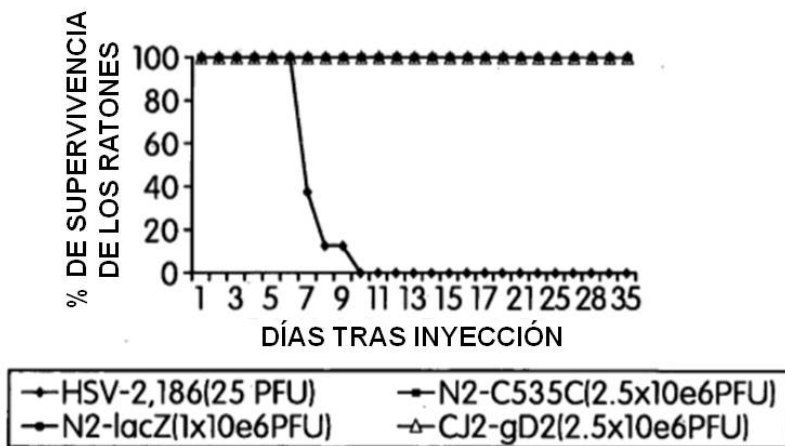


FIG. 5B

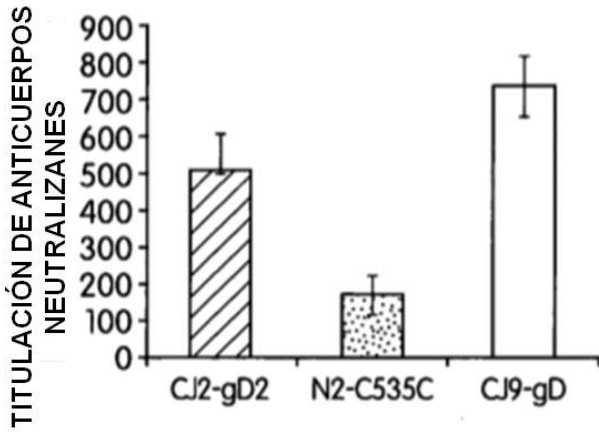


FIG. 6A

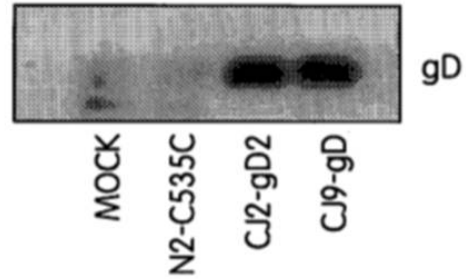


FIG. 6B

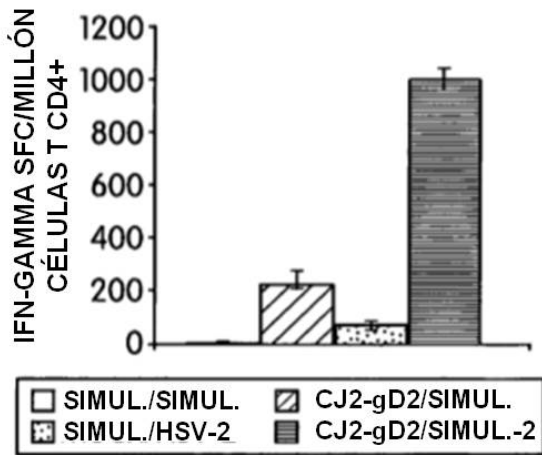


FIG. 7A

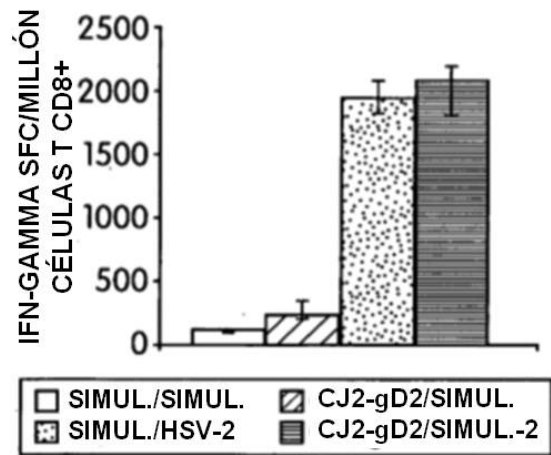


FIG. 7B

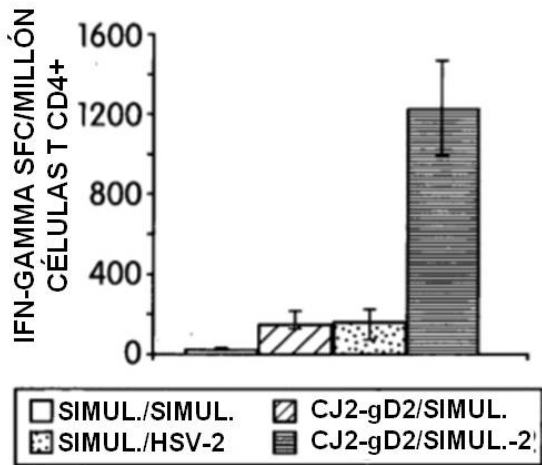


FIG. 7C

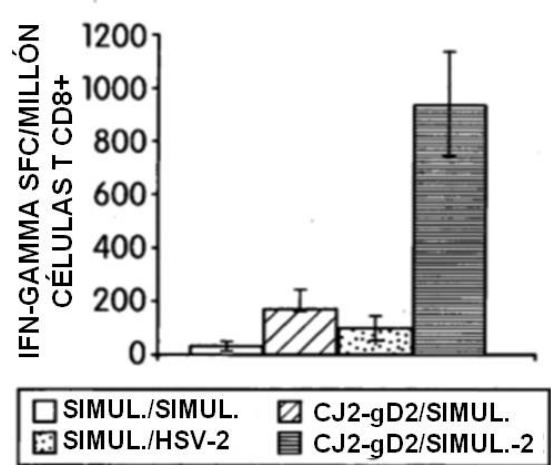


FIG. 7D

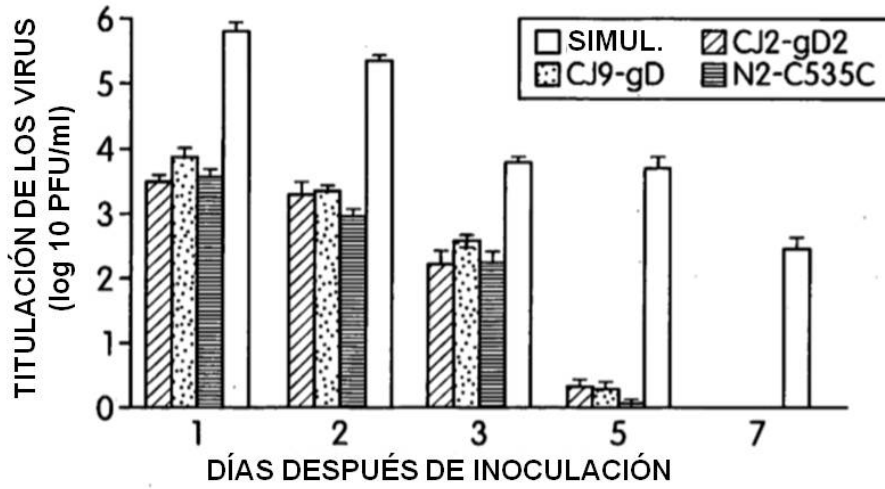


FIG. 8

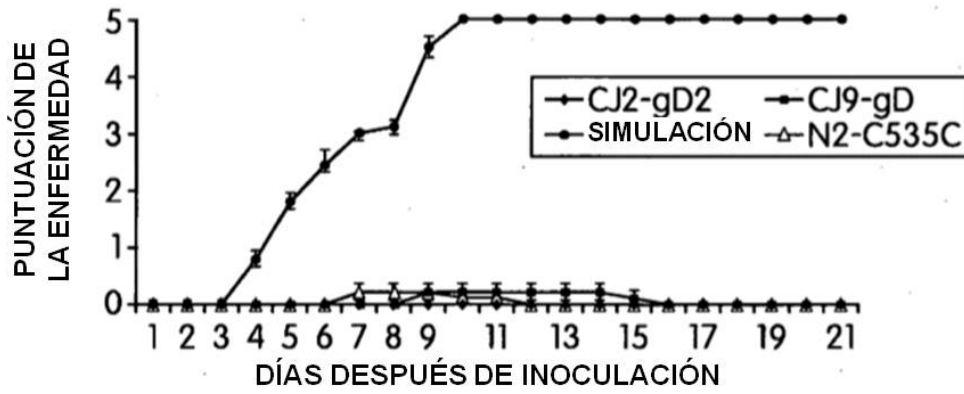


FIG. 9A

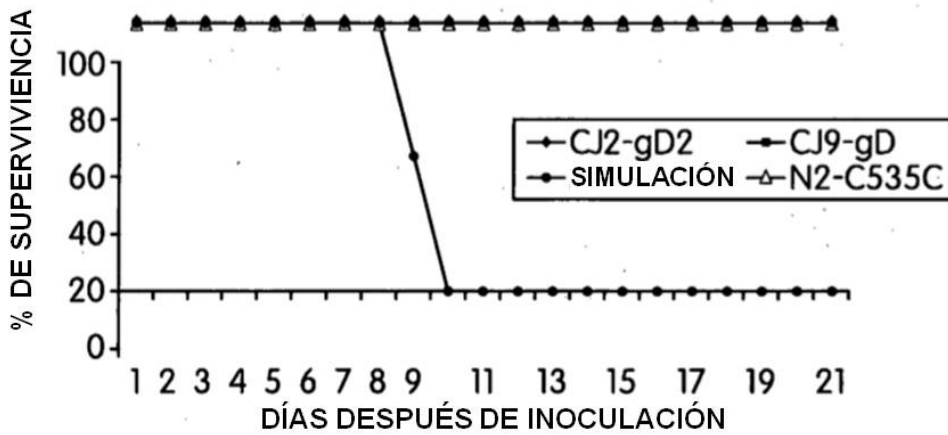


FIG. 9B

ATGGGAGAGGCGTCGCTGCCGGCCCAGGCCGCCGAGACGGAGGAGGTGGGTCTTTTGTGCGAA
AAATACCTCCGGTCCGATGTCGCGCCGGCGGAAATTGTCGCGCTCATGCGCAACCTCAACAG
CCTGATGGGACGCACGCGGTTTATTTACCTGGCGTTGCTGGAGGCCTGTCTCCGCGTTCCCA
TGGCCACCCGCAGCAGCGCCATATTTTCGGCGGATCTATGACCACTACGCCACGGGCGTCATC
CCCACGATCAACGTCACCGGAGAGCTGGAGCTCGTGGCCCTGCCCCCACCCTGAACGTAAC
CCCCGTCTGGGAGCTGTTGTGCCTGTGCAGCACCATGGCCGCGCGCCTGCATTGGGACTCGG
CGGCCGGGGGATCTGGGAGGACCTTCGGCCCCGATGACGTGCTGGACCTACTGACCCCCAC
TACGACCGCTACATGCAGCTGGTGTTCGAACTGGGCCACTGTAACGTAACCGACGGACTTCT
GCTCTCGGAGGAAGCCGTCAAGCGCGTTCGCCGACGCCCTAAGCGGCTGTCCCCCGCGCGGGT
CCGTTAGCGAGACGGACCACGCGGTGGCGCTGTTCAAGATAATCTGGGGCGAACTGTTTGGC
GTGCAGATGGCCAAAAGCACGCAGACGTTTCCCAGGGCGGGGCGCGTTAAAAACCTCACCAA
ACAGACAATCGTGGGGTGTGGACGCCCACCACATCGACCACAGCGCCTGCCGGACCCACA
GGCAGCTGTACGCCCTGCTTATGGCCCACAAGCGGGAGTTTGCAGGCGCGCGCTTCAAGCTA
CGCGTGCCCGCGTGGGGGCGCTGTTTGCACGCACTCATCCAGCGCCAACCCCAACGCTGA
CATCATCCTGGAGGCGGCGCTGTCGGAGCTCCCCACCGAGGCCTGGCCCATGATGCAGGGG
CGGTGAACTTTAGCACCTATAA

FIG. 10