

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 787**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2010 PCT/EP2010/006020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11038933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2010 E 10765381 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2483306**

54 Título: **Anticuerpo anti-VHS**

30 Prioridad:

01.10.2009 EP 09012454

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

06.06.2019

73 Titular/es:

**HEIDELBERG IMMUNOTHERAPEUTICS GMBH
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 460
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**ROGGENDORF, MICHAEL;
EIS-HÜBINGER, ANNA-MARIA;
KRAUSS, JÜRGEN;
SCHNEWEIS, KARL EDUARD;
ARNDT, MICHAELA;
KRAWCZYK, ADALBERT;
EXNER, EVELYN y
DÄUMER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 715 787 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

Anticuerpo anti-VHS

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo anti-VHS como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho anticuerpo, una célula hospedadora que comprende dicha secuencia de nucleótidos, una célula de hibridoma capaz de producir dicho anticuerpo y el uso de dicho anticuerpo como un fármaco, en particular para su uso en la fabricación de un fármaco para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades asociadas con el VHS en un sujeto; tal como se define en las reivindicaciones.

El virus del Herpes simple (VHS) patógeno humano es un virus de ADN dermatotrópico y neutrotópico, cuyas manifestaciones clínicas se originan principalmente a partir de la piel y de la mucosa cercana, en de forma secundaria lugar conduce a complicaciones neurológicas tales como neuritis, meningitis, encefalitis, mielitis, polirradiculitis entre otros. En deficiencia innata, adquirida y también iatrogénica inmune, hasta cierto alcance se informan progresiones severas con una alta letalidad. Debido a las tasas de infección elevadas de la población con el VHS 1 de tipo 1 (VHS-1, 95 %; *H. labialis*, *H. cornea*, eccema herpético) y VHS de tipo 2 (VHS-2, 10-30 %; *H. genitalis*, *H. neonatorum*) y debido a la frecuente reactivación del virus, que persiste de forma latente durante toda la vida en los ganglios neuronales sensoriales y autónomos, el VHS es de relevancia clínica particular. Independientemente del tipo de virus, los objetivos terapéuticos sintomáticos de la infección por VHS primaria o con recidiva son la inhibición de la replicación del virus, acortamiento del tiempo de sufrimiento, y prevención de las complicaciones sistémicas que influyen en la frecuencia del agravamiento.

En el reconocimiento temprano y la dosis correcta, los agentes virustáticos se usan con éxito para terapia antiviral. Los agentes virustáticos más comunes (por ejemplo, aciclovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridina) son análogos de nucleósidos o pirofosfato, cuyo principio activo común se basa en la inhibición de la síntesis de ADN en células infectadas con virus.

Uno de los agentes terapéuticos más importantes para el tratamiento de infecciones por VHS es el aciclovir, análogo de nucleósido de purina. Se fosforila por la timidina quinasa viral y a continuación interfiere con la ADN polimerasa viral. Por el contrario, la ADN polimerasa humana es menos susceptible contra el aciclovir en un factor de 30-50, razón por la que se observan efectos secundarios simplemente marginales.

Sin embargo, a pesar del desarrollo de agentes virustáticos de acción selectiva, el tratamiento quimioterapéutico de las enfermedades virales sigue representando un grave problema. En particular, el desarrollo de cepas resistentes contra los agentes quimioterapéuticos comunes observados durante el tratamiento profiláctico y terapéutico de larga duración en pacientes inmunodeprimidos es problemático. Como resultado, en más de un 10 % de los casos, debido a la falta de agentes virustáticos eficaces, se observa una infección generalizada de avance rápido con progresión letal.

En la actualidad, el análogo de pirofosfato, foscarnet, se usa en particular en pacientes inmunodeprimidos contra el virus del herpes resistente al aciclovir. Este agente causa una inhibición directa de la ADN polimerasa viral y no tiene influencia en la timidina quinasa. Sin embargo, el uso de foscarnet produce graves efectos secundarios indeseables, tales como insuficiencia renal, problemas cardíacos, toxicidad en la médula ósea y también puede causar ulceración cutánea. Debido a sus efectos teratogénicos, el foscarnet tampoco se puede administrar durante el embarazo. Además, se observa la formación de cepas de resistencia cruzada, lo que hace que el desarrollo de agentes terapéuticos alternativos sea altamente necesario. En la actualidad no hay disponibilidad de una inmunoprofilaxis pasiva. Un par de vacunas experimentales para la inmunización activa contra VHS1 y VHS2 no mostraron éxito verificable.

Los anticuerpos son muy prometedores para el tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunes e infecciones líricas. El documento JP 6135854 describe un agente terapéutico para la infección por el virus del herpes simple en el que un anticuerpo monoclonal humano contra el VHS y un análogo de ácido nucleico antiviral tal como el aciclovir (ACV) se administran de forma simultánea o sucesiva en forma de inyección mediante infusión por goteo intravenoso. El documento DK 187286 desvela anticuerpos que presentan de actividades inmunológicas multispecíficas con respecto a la glicoproteína D (gD) de VHS-1 y VHS-2 (gD-1 y gD-2 de VHS). El documento WO 1997/26329 describe anticuerpos monoclonales humanos útiles para el diagnóstico y tratamiento de VHS-1 y VHS-2. Este último anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal VHS 863 para unirse al antígeno glicoproteína D de VHS-1 y VHS-2. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.950.595 desvela un hibridoma ratón-humano que produce un anticuerpo antiviral-humano, un proceso para la preparación del mismo y un anticuerpo monoclonal antiviral-humano.

Además, se describe la humanización de otro anticuerpo monoclonal murino (Fd79) (Kogae *et al*, 1986) específico para VHS 1/2 (Co, M.S. *et al*, 1991; Zeitlin L. *et al*, 1998). Este anticuerpo reconoce un epítipo compartido de

glicoproteína B (gB) de VHS1 y VHS2.

Además, el Fd79 humanizado se ha producido tanto en plantas transgénicas como en la línea celular eucariota SP2/0 y posteriormente se ha caracterizado, mostrando una afinidad de 53 nM.

Navarro *et al.*, (Navarro *et al.*, 1992) describe dominios en la glicoproteína B del virus I del herpes simple que funcionan en la penetración del virus, propagación de célula a célula y fusión celular. De forma más específica, se describen anticuerpos monoclonales denominados H126, H1375, H1435 y H 1815 que se unen al dominio D2a antigénico. Se describe que estos anticuerpos tienen epítomos que abarcan las posiciones 273, 274, 278 y/o 263 a 283 de gB.

El anticuerpo H1815 murino monoclonal reconoce un epítipo similar pero no idéntica con la región de los aminoácidos 263-283 de la glicoproteína B (gB) (Navarro *et al.*, 1992). Sin embargo, H1815 no es capaz de neutralización o inhibición viral de la "propagación de célula a célula".

Además, recientemente se ha descrito un análisis de función de estructura de la glicoproteína B del virus del herpes simple virus con fusión sin actividad (Roller *et al.*, 2008).

Por último, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.180.370 describe inmunoglobulinas humanizadas y métodos para preparar las mismas. Además, el documento WO 2003/105782 se refiere a especificidad de injerto de un anticuerpo murino sobre un armazón humano.

Por lo tanto, los agentes quimioterapéuticos tienen efectos secundarios no deseados y se observa un aumento del número de cepas resistentes.

Por lo tanto un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo anti-VHS (humanizado) que sea capaz de neutralizar la infección por VHS e inhibir la propagación de célula a célula.

Además, un objeto de la invención es proporcionar un agente profiláctico y/o terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas al VHS que superen las desventajas de los agentes quimioterapéuticos aplicados de forma convencional que se han mencionado anteriormente.

De forma sorprendente, se encontró que un anticuerpo de acuerdo con la invención resuelve este objeto.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una alternativa prometedora a los agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de infección por VHS basándose en los anticuerpos producidos de forma recombinante, que pueden ser humanizados. Estos anticuerpos son capaces de bloquear ambos mecanismos virales para extenderse dentro de un hospedador. Neutralizan de forma eficaz las partículas de virus sin célula e inhiben la extensión del virus de célula a célula. Dado que los anticuerpos se unen de forma específica a un epítipo altamente conservado de la glicoproteína B (gB) de superficie de la envoltura del VHS1 y del VHS2, que es esencial para el ciclo de replicación viral, el desarrollo de resistencia a fármaco es lo más improbable.

Aunque el efecto del anticuerpo murino de la invención ya se ha descrito en parte, véase, Eis-Hübinger *et al.*, Intervirology (1991); 32: 351-360 y Eis-Hübinger *et al.*, Journal of General Virology (1993); 74: 379-385, el propio anticuerpo o la secuencia de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de la invención así como el epítipo al que se une nunca se ha publicado o se ha hecho disponible al público. En resumen, el anticuerpo (humanizado) proporciona una o más de las siguientes ventajas:

- La eficacia del anticuerpo monoclonal murino de la invención ya se ha demostrado (véase, Eis-Hübinger *et al.*, 1991; Eis-Hübinger *et al.*, 1993). Además, los investigadores muestran en la sección de Ejemplos que el anticuerpo humanizado de la invención también es capaz de neutralizar la infección vírica por VHS1 y VHS2 *in vitro* e inhibir la extensión vírica mediante la inhibición del mecanismo de "propagación de célula a célula". En el contexto de la progresión de la infección en seres humanos, el sistema inmunológico humano no es capaz de generar especificidades de anticuerpo para evitar de manera eficaz la propagación de célula a célula habitual del VHS 1/2.
- La aplicación profiláctica así como terapéutica frecuente y de larga duración de los agentes quimioterapéuticos conservativos tales como aciclovir y foscarnet conduce a un aumento de la formación de cepas virales resistentes. Este problema de resistencia se puede superar con el anticuerpo anti-VHS (humanizado) que se describe en el presente documento, administrado solo o en combinación con un agente virustático tal como aciclovir y/o foscarnet, dado que depende de un mecanismo de acción diferente.
- El anticuerpo que se describe en el presente documento se une de forma específica a un epítipo de la proteína gB del VHS. El desarrollo de resistencia del VHS contra el anticuerpo de la invención no se va a esperar, ya que las mutaciones en la proteína gB conducen a pérdida de capacidad infección vírica.
- Los pacientes en los que la administración sistémica de los agentes virustáticos convencionales está contraindicada se benefician particularmente del anticuerpo (humanizado) que se describe en el presente documento.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se caracterizan en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a las siguientes secciones 1 a 12:

1. Anticuerpo que se une a la glicoproteína gB de VHS1 y VHS2 que comprende las regiones determinantes de la complementariedad que se muestran en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, en las que el anticuerpo tiene una constante de disociación K_D como máximo de 40 nM, preferentemente como máximo de 30 nM, más preferentemente como máximo de 20 nM, incluso más preferentemente como máximo de 15 nM, como máximo de 13 nM y como máximo de 10 nM.
2. Anticuerpo de la sección 1, en la que el anticuerpo en una concentración como máximo de 20 nM, preferentemente como máximo de 16 nM, más preferentemente como máximo de 12 nM, como máximo de 10 nM, y lo más preferentemente como máximo de 8 nM, es capaz de neutralizar una cantidad definida de VHS de 100 TCID₅₀ a un 0 %.
3. Anticuerpo de la sección 1 o 2, en las que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 70 % con respecto a los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y de 112 a 122 de la SEQ ID NO: 9 y en las posiciones 1 a 23, 40 a 54, 62 a 93, y de 103 a 113 de la SEQ ID NO: 10.
4. Anticuerpo de una cualquiera de las secciones 1-3, en las que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 80 %, preferentemente un 100 % con respecto a los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y de 112 a 122 de la SEQ ID NO: 7 y en las posiciones 1 a 23, 41 a 55, 63 a 94, y 104 a 114 de la SEQ ID NO: 8.
5. Anticuerpo de cualquiera de las secciones 1-4, en las que el anticuerpo es un anticuerpo divalente o multivalente.
6. Anticuerpo de una cualquiera de las secciones 1-5, en las que el anticuerpo se conjuga con un resto efector, un resto terapéutico, o una etiqueta detectable.
7. Composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las secciones 1-6 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las secciones 1-5.
9. Célula hospedadora, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las secciones 1 -5.
10. Anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las secciones 1-6 para uso como un fármaco.
11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las secciones 1-6 para uso en un método, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad asociada con el VHS en un sujeto.
12. El anticuerpo para uso de acuerdo con la sección 11, en la que la enfermedad asociada con el VHS va acompañada con una o más de las siguientes características:
 - (a) presencia de una recidiva oral,
 - (b) presencia de una recidiva genital,
 - (c) eccema herpético,
 - (d) herpes neonatal,
 - (e) deficiencia inmunológica, pacientes inmunocomprometidos,
 - (f) resistencia contra un agente virustático,
 - (g) encefalitis,
 - (h) meningitis,
 - (i) meningoencefalitis,
 - (j) infecciones oculares, y/o
 - (k) infecciones por VHS generalizadas.

Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad que se muestran en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6. Además, se proporciona un anticuerpo, que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo que comprende las regiones determinantes de la complementariedad que se muestran en las SEQ ID NOs: 1-6.

Además, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo que se describe en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, se proporciona un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo tal como se define en las reivindicaciones, una célula que comprende dicha secuencia de nucleótidos mientras que se desvela una célula de hibridoma capaz de producir dicho anticuerpo.

Por último, en el presente documento también se desvelan el anticuerpo tal como se define en las reivindicaciones para uso en medicina, y el uso del anticuerpo tal como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades asociadas con el VHS en un sujeto.

Los diversos aspectos de la invención como se definen en las reivindicaciones adjuntas y en las realizaciones preferentes contenidas en las reivindicaciones dependientes se incorporan con la presente por referencia.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad que se muestran en las SEQ ID NO: 1 (TSGMSVG), SEQ ID NO: 2 (HIWWNNDKYYKPALKS), SEQ ID NO: 3 (IYYGYRPPYAMDY), SEQ ID NO: 4 (RSSQSIVHSNGNTYLE), SEQ ID NO: 5 (KVSNRFS), y SEQ ID NO: 6 (FQGSHVPWS).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas gamma globulina que consisten en su forma natural de dos cadenas pesadas largas y dos cadenas ligeras pequeñas unidas mediante enlaces disulfuro (véase la Fig 3). Existen cinco tipos de cadena pesada de Ig de inmunoglobulina: α , δ , ϵ , γ , y μ . El tipo de cadena es a la presente define la clase (isotipo) del anticuerpo; estos son anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante en la región variable. La región constante es casi idéntica en todos los anticuerpos de origen natural del mismo isotipo de la misma especie. Una cadena ligera también consta de un dominio constante y un dominio variable. En mamíferos existen dos tipos de cadena ligera de inmunoglobulina, lambda (λ) y kappa (κ).

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, la propiedad única de un anticuerpo dado se determina por las regiones variables (V). De forma más específica, bucles variables, tres cada uno en las cadenas ligeras (V_L) y tres en las cadenas pesadas (V_H), son responsables de la unión a antígeno, es decir, de su especificidad hacia el antígeno. Estos bucles se denominan las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR). Dado que las CDR de ambos dominios V_H y V_L contribuyen al sitio de unión a antígeno, es la combinación de las cadenas pesadas y las ligeras, y no cualquiera sola, lo que determina la especificidad final hacia el antígeno.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que es capaz de unirse a un antígeno, en el que la especificidad de unión se determina por las CDR que se muestran en las SEQ ID NOs: 1 a 6. Por lo tanto, "anticuerpo" pretende relacionarse con cualquier polipéptido que comprenda al menos un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno constan de al menos el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, colocados de modo tal que ambos dominios en conjunto son capaces de unirse al antígeno específico. Uno "anticuerpo" incluye un anticuerpo completo, o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo fragmentos de Fab, $F(ab)_2$ o scFv (véase también la Fig 3).

Con respecto a la expresión "anticuerpo completo", se pretende que cualquier anticuerpo tenga una estructura del dominio general habitual de un anticuerpo de origen natural (es decir, que comprende una cadena pesada de tres o cuatro dominios constantes y una cadena ligera de un dominio constante así como los respectivos dominios variables), aunque cada dominio puede comprender modificaciones adicionales, tales como mutaciones, delecciones, o inserciones, que no cambian la estructura del dominio general.

Un "fragmento de anticuerpo" también contiene al menos un fragmento de unión a antígeno como se ha definido anteriormente, y presenta la misma función y especificidad que el anticuerpo completo a partir del que se obtiene el fragmento. Los fragmentos de Fab se pueden generar usando la enzima papaína para escindir una inmunoglobulina. La enzima pepsina produce escisión por debajo de la región bisagra y, por lo tanto, por debajo de los enlaces disulfuro, de modo que se forma un fragmento de $F(ab)_2$. Además, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se pueden funcionar en conjunto para formar un fragmento variable de una sola cadena (scFv).

Además, se pretende que el término "anticuerpo" comprenda todos los isotipos de inmunoglobulina que se han mencionado anteriormente, es decir, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM, que incluye cualquier subclases de estos isotipos. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferentemente un anticuerpo IgG1 o IgG2. Dado que el anticuerpo se puede expresar y producir de forma recombinante, el anticuerpo también puede comprender dos regiones constantes de cadenas pesadas diferentes, por ejemplo una cadena pesada de IgG1 y una cadena pesada de IgG2, o cadenas pesadas de diferentes especies. Sin embargo, las cadenas pesadas son preferentemente de la misma especie. Además, el anticuerpo puede comprender cualquiera de una cadena ligera lambda o una cadena dijera kappa.

Como se muestra en el Ejemplo 2, la valencia del anticuerpo tiene una gran influencia en la eficacia para mediar la neutralización viral inhibir la propagación de célula a célula, y los mejores resultados se han mostrado con anticuerpos divalentes, es decir, con un anticuerpo que tiene dos regiones de unión a antígeno. Los ejemplos de anticuerpos divalentes son anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo divalente, tal como un fragmento de $F(ab)_2$. Por lo tanto, en una realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo divalente, preferentemente en el que el anticuerpo es un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo, en particular en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento de $F(ab)_2$. En una realización preferente alternativa, en anticuerpos un anticuerpo con un equivalente, es decir, un anticuerpo que tiene dos o más sitios de unión, incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, preferentemente un triacuerpo o un tetracuerpo, o inmunoglobulinas completas tales como un pentámero de IgM o inmunoglobulinas relacionadas. Estos formatos de anticuerpo se conocen en la técnica.

También se desvela que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, preferentemente en el que el anticuerpo es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, más preferentemente en el que el anticuerpo humanizado se obtiene a partir de una secuencia de línea germinal humana, como se discute a continuación. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que al menos una región de una inmunoglobulina de una especie se condensa con otra reelección de una inmunoglobulina de otra especie mediante ingeniería genética con el fin de reducir su inmunogenicidad. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico se muestra en la Fig 3A, que representa regiones V_L y V_H de murino condensadas con la parte restante de una inmunoglobulina humana. Un tipo particular de anticuerpos quiméricos son los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados se producen mediante injerto del ADN que codifica las CDR de un anticuerpo humano el ADN que codifican el armazón del anticuerpo humano. La construcción de ADN resultante se puede usar a continuación para expresar y producir anticuerpos que normalmente no son tan inmunogénicos como el anticuerpo precursor no humano o como un anticuerpo quimérico, ya que las CDR simplemente no son humanas.

Se describe que el anticuerpo puede ser capaz de inhibir la extensión de la infección por VHS a partir de una célula infectada a una segunda célula adyacente en una infectada (propagación de célula a célula).

La propagación de célula a célula es la capacidad del virus del herpes para extenderse desde una célula infectada a una célula adyacente no infectada, *sin liberar partículas sin células*. Con el fin de examinar si un anticuerpo es capaz de inhibir la extensión del VHS desde una célula infectada a una segunda célula no infectada adyacente (propagación de célula a célula), se puede usar el siguiente ensayo.

Las células Vero que crecen hasta confluencia en cubre objetos de vidrio de placas de cultivo tisular de 24 pocillos se infectan durante 4 h a 37 °C con una cantidad constante de virus de 400 TCID₅₀/pocillo. Una dosis media de infección de cultivo (1 TCID₅₀) es la cantidad de un agente citopatógeno, tal como un virus, que producirá un efecto citopático en un 50 % de las células cultivadas inoculadas. El inóculo de virus posteriormente se retira, las células se lavan dos veces con PBS y adicionalmente se incuban durante 2 días a 37 °C en 1 ml de DMEM, FCS al 2 %, Pen/Estrep que contiene un exceso de cualquiera de diferentes anticuerpos anti-VHS o suero de control anti-VHS policlonal con el fin de evitar la expansión viral a través del sobrenadante. Los antígenos virales de las células infectadas con el VHS se detectan con un suero de cabra-anti-VHS policlonal etiquetado con fluorescencia (BETHYL Laboratories, Montgomery, TX USA, N.º de Catálogo A190-136F, N.º de Lote A190-136F-2).

Preferentemente, un anticuerpo es capaz de inhibir la propagación de célula a célula si menos de un 20 % de las células adyacentes están infectadas, preferentemente en el que menos de un 15 %, menos de un 10 %, menos de un 5 %, más preferentemente menos de un 3 % y lo más preferentemente menos de un 1 % de las células adyacentes están infectadas en el ensayo que se ha mencionado anteriormente.

Además, en una realización preferente adicional, el anticuerpo tiene una constante de disociación K_D como máximo de 40 nM, preferentemente como máximo de 30 nM, más preferentemente como máximo de 20 nM, incluso más preferentemente como máximo de 15 nM, como máximo tal como 13 nM, como máximo de 10 nM.

La K_D representa la constante de disociación como una medida de la propensión de un complejo a disociarse de forma reversible en sus componentes (es decir, la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno) y es la inversa de la constante de asociación. La K_D se puede calcular a partir de la ecuación de Scatchard y en la técnica se conocen métodos para determinar la K_D .

En una realización preferente adicional, el anticuerpo en una concentración como máximo de 20 nM, preferentemente como máximo de 16 nM, más preferentemente como máximo de 12 nM, como máximo de 10 nM, por ejemplo como máximo 8 nM es capaz de neutralizar una cantidad definida de VHS de 100 TCID₅₀ al 100 %.

"Neutralización" en el presente documento se refiere a que el anticuerpo produce opsonización del virus de modo que no puede infectar ninguna célula adicional. Un ensayo para evaluar si un anticuerpo en una concentración como máximo de 20 nM es capaz de neutralizar una cantidad definida de VHS de 100 TCID₅₀ se proporciona en Eis-Hübinger *et al*, 1991, y en Eis-Hübinger *et al*, 1993, y en los Ejemplos 1 y 2 que siguen a continuación.

Además, en una realización preferente, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 70 %, preferentemente al menos un 75 %, al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 %, y lo más preferentemente un 98 % (global) en las regiones marco conservadas en comparación con los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 (o las posiciones 1 a 30, 36 a 49, 66 a 94, y de 103 a 113 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 9 y en las posiciones 1 a 23, 40 a 54, 62 a 93, y 103 a 113 (o las posiciones 1 a 23, 35 a 49, 57 a 88, y 98 a 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 10, como se ilustra en la Fig 4.

SEQ ID NO: 9:

QVTLKESGPG ILLPSQTLSSL TCSFSGFSL S TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL
GHIWWNNDKY YKPALKSRLT ISKDTSNKQV FLKIASVVT A DTATYYCARI
YYGYRPPYAMD YWGQGTSTVTV SS

SEQ ID NO: 10:

DVLTMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLK1 SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
WSFGGGTKLE IKR

Un polipéptido tiene "una identidad de secuencia de al menos un X %" en las regiones marco conservadas con respecto a la SEQ ID NO: 9 o 10, si la SEQ ID NO: 9 o 10 se alinea con la secuencia de mejor emparejamiento de un polipéptido de interés, y la identidad del aminoácido entre esas dos secuencias alineadas es al menos un X % con respecto a las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 (o las posiciones 1 a 30, 36 a 49, 66 a 94, y 103 a 113 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 9 y las posiciones 1 a 23, 40 a 54, 62 a 93, y 103 a 113 (o las posiciones 1 a 23, 35 a 49, 57 a 88, y 98 a 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 10. Un alineamiento de secuencias de aminoácidos de ese tipo se puede realizar usando, por ejemplo, programas de homología informática disponibles al público tales como el programa "BLAST" que se proporciona en la página principal del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>, usando los ajustes por defecto que se proporcionan en el mismo.

En la técnica se conocen métodos adicionales para calcular porcentajes de identidad de secuencias de conjuntos de secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos.

Como alternativa, en otra realización preferente, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, incluso más preferentemente al menos un 95 %, tal como un 98 %, y lo más preferentemente un 100 % (global) en las regiones marco conservadas en comparación con los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 (o las posiciones 1 a 30, 36 a 49, 66 a 94, y 103 a 113 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de las SEQ ID NOs: 7 y las posiciones 1 a 23, 41 a 55, 63 a 94, y 104 a 114 (o las posiciones 1 a 23, 35 a 49, 57 a 88, y 98 a 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 8, como se ilustra en la Fig 4. Un polipéptido tiene "una identidad de secuencias de al menos un X %" en las regiones marco conservadas de la SEQ ID NO: 7 u 8, si la SEQ ID NO: 7 u 8 se alinea con la secuencia con el mejor emparejamiento de un polipéptido de interés, y la identidad del aminoácido entre esas dos secuencias alineadas es al menos un X % con respecto a las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 (o las posiciones 1 a 30, 36 a 49, 66 a 94, y 103 a 113 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 7 y las posiciones 1 a 23, 41 a 55, 63 a 94, y 104 a 114 (o las posiciones 1 a 23, 35 a 49, 57 a 88, y 98 a 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, respectivamente) de la SEQ ID NO: 8.

Las SEQ ID NO: 7 y 8 se obtienen a partir de secuencias de la **línea germinal** humana. Aunque las secuencias marco conservadas de inmunoglobulina humana de línea no germinal son de origen humano, generalmente no se puede excluir que no sean inmunogénicas. Por lo tanto, los presentes investigadores buscaron secuencias de línea germinal, ya que no se hipermutan y, por lo tanto, se espera que no sean inmunogénicas. Por consiguiente, el anticuerpo humanizado se obtiene preferentemente a partir de una secuencia de línea germinal humana, por ejemplo a partir de la SEQ ID NO: 7 y/u 8. Las SEQ ID NO: 7 y 8 son las que siguen a continuación:

SEQ ID NO: 7:

QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL S TSGMRVSWIR QPPGKALEWL
ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARX
XXXXXXXXYFD YWGQGTLLTV SS

SEQ ID NO: 8:

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL DSDDGNTYLE WYLQKPGQSP
QLLIYTLSYR ASGVPRDFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCMQRIEF
PWTFGQGTKV EIKR

En el contexto de la presente invención, se ha determinado que usando las SEQ ID NO: 7 y 8 para la generación del anticuerpo humanizado de la invención, no se requieren retromutaciones con el fin de conseguir la misma afinidad que para el anticuerpo precursor, que puede implicar que el correspondiente anticuerpo humanizado presente una inmunogenicidad muy baja.

En consecuencia, en el contexto de la presente invención esos anticuerpos están preferentemente incluidos, que muestran la misma especificidad que el anticuerpo que comprende las SEQ ID NOs: 9 y 10 o las SEQ ID NOs 7 y 8, respectivamente.

En una realización preferente adicional con el anticuerpo está conjugado con un resto efector, un resto terapéutico, o un resto detectable. En este contexto, el término "conjugado" se refiere a cualquier método conocido en la técnica para conectar funcionalmente dominios de proteína, incluyendo, pero no limitándose a fusión recombinante con o sin dominios de intervención, fusión mediada por proteína, asociación no covalente, y formación de enlace covalente, por ejemplo, enlace disulfuro, enlace peptídico, enlace de hidrógeno, enlace electrostático, y enlace conformacional, por ejemplo, asociaciones de biotina-avidina. La conjugación con un resto efector puede ser mediante medios químicos o recombinantes. Medio químico se refiere a una reacción entre el anticuerpo y el resto efector de modo que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

La expresión "resto efector" se refiere a un compuesto que se pretende que tenga un efecto en una célula a la que se dirige el anticuerpo. El resto efector puede ser, por ejemplo, un resto terapéutico o un resto detectable.

Un "resto terapéutico" es un compuesto que se pretende que actúe como un agente terapéutico, tal como un agente o fármacos citotóxico. A continuación se proporcionan ejemplos de compuestos para la composición farmacéutica.

Una "etiqueta detectable" incluye cualquier compuesto o etiqueta proteica detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos, tal como una etiqueta fluorescente.

La especificidad de un anticuerpo se puede expresar ya sea mediante las CDR o mediante el epítipo al que se une el anticuerpo. Por consiguiente, se desvela un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo del primer aspecto. Como se muestra en la sección de Ejemplos y como se ilustra en las Figs 13A y 13B, este epítipo es un epítipo discontinuo o en su lugar un epítipo pseudocontinuo parcialmente resistente a la desnaturalización situado en los aminoácidos 172-195 y 295-313 de la glicoproteína B de VHS1 y VHS2.

En el contexto que se desvela en el presente documento, el epítipo del anticuerpo 2c de mAb se puede situar dentro de los primeros 487 restos amino-terminales de la proteína gB. Preferentemente, el epítipo puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos situada dentro de la secuencia de aminoácidos entre la posición 172 y 307 de la proteína gB. El epítipo puede comprender la secuencia de aminoácidos consecutivos ₃₀₁IYGYRE₃₀₅ de la proteína gB, preferentemente la secuencia de aminoácidos consecutivos ₃₀₁IYGYRE₃₀₆ o ₃₀₀IYGYRE₃₀₅ más preferentemente la secuencia se puede extender adicionalmente a los extremos (es decir, ₂₉₉IYGYRE₃₀₅ o ₃₀₀IYGYRE₃₀₇). El epítipo de los anticuerpos como se desvela en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos consecutivos 298-313 (₂₉₈SPFYGYREGSHTETS₃₁₃) de gB.

Como alternativa, se describe que el epítipo se puede situar en la secuencia de aminoácidos consecutivos ₁₇₂QVWFGHRYSQFMGIFED₁₈₈. El epítipo puede comprender la secuencia de aminoácidos consecutivos ₁₇₂QVWFGHRYSQFMG₁₈₄.

Preferentemente, en el presente documento se describe que epítipo puede consistir en más de una secuencia de aminoácidos consecutivos. En epítipo puede ser parcialmente un epítipo discontinuo.

Más preferentemente, el epítipo puede comprender dos secuencias de aminoácidos consecutivos. Un epítipo de ese tipo que consiste en dos secuencias de aminoácidos se puede denominar "duótopo". El anticuerpo se puede unir

a ambas secuencias de aminoácidos.

Más preferentemente, se describe que las secuencias de aminoácidos del duótopo pueden comprender la secuencia de aminoácidos ₃₀₀FYGYRE₃₀₅ y una secuencia de aminoácidos situada entre la posición del aminoácido 172 y 188.

5 Incluso más preferentemente, el epítipo puede comprender la secuencia de aminoácidos ₃₀₀FYGYRE₃₀₅ y la secuencia de aminoácidos ₁₇₉YSQFMG₁₈₄ de la proteína gB. Como alternativa, el epítipo o el duótopo se pueden sintetizar por vía química. El epítipo puede ser un epítipo sintetizado por vía química que tiene la secuencia YSQFMG-βA-FYGYRE. La abreviatura βA, como se usa en el presente documento, se refiere a beta-alanina.

10 Más preferentemente, en el presente documento se describe que el epítipo puede comprender la secuencia de aminoácidos FYGYRE y la secuencia de aminoácidos FED de la proteína gB. El epítipo puede ser un epítipo sintetizado por vía química que tiene la secuencia FED- βA-βA-FYGYRE o PFYGYREGFEDF.

15 Una persona con experiencia en la materia puede entender que los epítipo pueden estar comprendidos en la proteína gB, pero también pueden estar comprendidos en un producto de degradación de la misma o pueden ser un péptido sintetizado por vía química. Las posiciones del aminoácido solamente se indican para demostrar la posición de la secuencia de aminoácidos correspondiente en la secuencia de la proteína gB. La invención incluye todos los péptidos que comprenden el epítipo. El péptido puede ser una parte de un polipéptido con una longitud de más de 100 aminoácidos o puede ser un péptido pequeño con menos de 100, preferentemente menos de 50, más
20 preferentemente menos de 25 aminoácidos, incluso más preferentemente menos de 16 aminoácidos. Los aminoácidos de un péptido de ese tipo pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales (por ejemplo, beta-aminoácidos, gamma-aminoácidos, D-aminoácidos) o una combinación de los mismos. Además, se desvela que los respectivos péptidos retro-inversos de los epítipos pueden estar incluidos. El péptido puede estar sin unir o unido. Puede estar unido, por ejemplo, a una molécula pequeña (por ejemplo, un fármaco o un fluoróforo), a un
25 polímero de peso molecular elevado (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polietilen imina (PEI), hidroxipropilmetacrilato (HPMA), etc.) o una proteína, un ácido graso, un resto de azúcar o se puede insertar en una membrana.

A diferencia del anticuerpo H126 conocido en la técnica, se desvela que el epítipo reconocido por el anticuerpo 2c
30 de mAb no es básicamente discontinuo. A diferencia de H126, el anticuerpo se puede unir a un epítipo continuo, por lo tanto una secuencia de aminoácidos consecutivos o se puede unir a un epítipo discontinuo. Por lo tanto, las propiedades del anticuerpo de la presente invención mejoran. Por ejemplo, el anticuerpo 2c de mAb se puede usar para los métodos en los que la proteína diana se desnaturaliza (por ejemplo, electroforesis SDS page) o para la
35 detección de péptidos lineales pequeños.

Con el fin de someter a ensayos y un anticuerpo en cuestión y el anticuerpo del primer aspecto como se desvela en el presente documento reconocen el mismo epítipo, se puede realizar el siguiente estudio de competición: las células Vero infectadas con 3 moi (multiplicidad de infección) are se incuban después de 20 h con concentraciones variables del anticuerpo en cuestión como el competidor durante 1 hora. En una segunda etapa de incubación con el
40 anticuerpo del primer aspecto se aplica en una concentración constante de 100 nM y su unión se detecta mediante citometría de flujo usando un anticuerpo etiquetado con fluorescencia dirigido contra los dominios constantes el anticuerpo del primer aspecto (véase también la sección de Ejemplos y la Fig 6). La unión que se dirige de forma anti-proporcionar la concentración del anticuerpo en cuestión es indicativa de que ambos anticuerpos reconocen el mismo epítipo. Sin embargo, en la técnica se conocen otros muchos ensayos que se pueden usar.

45 Las realizaciones preferentes del segundo aspecto son las mismas que para el primer aspecto, como se ha descrito anteriormente.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz
50 del anticuerpo de acuerdo con el primer por el segundo aspectos y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, en el presente documento la expresión "composición farmacéutica" se puede usar indistintamente con el término "fármaco".

El contenido del anticuerpo en la composición farmacéutica no está limitado siempre y cuando sea útil para
55 tratamiento o prevención, pero contiene preferentemente un 0,0000001-10 % en peso por composición total. Además, el anticuerpo que se describe en el presente documento se usa preferentemente en un vehículo. La elección del vehículo puede depender de la vía de administración y de la concentración del agente o agentes activos y el vehículo puede estar en forma de una composición liofilizada o una solución acuosa. Generalmente, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en el vehículo para hacer que la composición
60 sea isotónica. Los ejemplos del vehículo incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Preferentemente, los excipientes, vehículos, o estabilizantes aceptables no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones usadas, incluyendo tampones tales como citrato, fosfato, y otros ácidos orgánicos; contraiones formadores de sal, por ejemplo sodio y potasio; polipéptidos de bajo peso molecular (> 10 restos de aminoácido) polipéptidos; proteínas, por ejemplo albúmina de suero, o gelatina; polímeros hidrófilos, por ejemplo polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como histidina, glutamina, lisina, asparagina, arginina, o glicina; carbohidratos
65 incluyendo glucosa, manosas, o dextrinas; monosacáridos; disacáridos; otros azúcares, por ejemplo sacarosa,

manitol, trehalosa o sorbitol; agentes quelantes, por ejemplo EDTA; tensioactivos no iónicos, por ejemplo Tween, Pluronic o polietilenglicol; antioxidantes incluyendo metionina, ácido ascórbico y tocoferol; y/o conservantes, por ejemplo cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos, por ejemplo metilo o propil parabencon; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol). Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen con mayor detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., 1985, Mack Publishing Co. La composición también puede contener más de un compuesto activo tal como un agente quimioterapéutico o un agente virustático, incluyendo aciclovir, penciclovir, idoxuridina y foscarnet.

El Aciclovir, también conocido como acicloguanosina (ACV) o 2-Amino-9-(2-hidroxi-etoximetil)-3H-purin-6-ona, es un fármaco antiviral análogo de guanosina, comercializado con nombres comerciales tales como, ACERPES®, Acic®, Aciclobeta®, AcicloCT®, Aciclostad®, Aciclovir, Acic®, Ophtal®, Acivir®, Acivision, Aciclovir®, Aviral®, Ciclovir, Helvevir®, Herpex, Supraviran®, Virucalm®, Virupos®, Virzin, Zoliparin®, Zovir, y Zovirax®. El Penciclovir (2-amino-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)butil]-6,9-dihidro-3H-purin-6-ona) es un fármaco antiviral análogo de guanina, comercializado con nombres comerciales tales como Denavir y Fenistil. El Famciclovir (acetato de 2-[(acetiloxi)metil]-4-(2-amino-9H-purin-9-il)butilo) es un profármaco de penciclovir con biodisponibilidad oral mejorada. La Idoxuridina (2'-Desoxi-5-ioduridina) es un análogo bioquímico del nucleósido uridina y se comercializa con nombres comerciales tales como Virunguent® y Zostrum®. El Foscarnet es la base conjugada del compuesto químico con la fórmula HO₂CPO₃H₂ y se comercializa con nombres comerciales tales como Foscavir® y Triapten®.

Preferentemente, el anticuerpo y/o el compuesto activo están incluidos en una cantidad eficaz. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para inducir una respuesta terapéutica detectable en el sujeto al que se va a administrar la composición farmacéutica.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un vector de expresión, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo de la invención. Generalmente, los vectores de expresión son plásmidos que se usan para introducir un gen en cuestión en una célula diana, dando como resultado la transcripción y traducción de la proteína codificada por el gen, es decir, el anticuerpo. Por lo tanto, el vector de expresión contiene secuencias reguladoras tales como regiones promotoras y potenciadoras, así como un sitio de señal de poliadenilación con el fin de dirigir una transmisión eficaz del gen llevado en el vector de expresión. El vector de expresión también puede comprender reacciones necesarias o útiles adicionales, por ejemplo un marcador seleccionable para selección en células eucariotas o procariontes, un origen de replicación, etc.

En consecuencia, en un quinto aspecto la invención se refiere a una célula hospedadora, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención. La célula hospedadora puede ser cualquier célula adecuada para expresar el anticuerpo de la invención e incluye células de mamífero, células de levadura, y células de insecto, preferentemente células de mamífero, más preferentemente líneas de células inmortales tales como líneas de células de mieloma. Las líneas de células adecuadas están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC.

Además, en un sexto aspecto, se desvela una célula de hibridoma capaz de producir el anticuerpo del primer y/o segundo aspecto. Las células de hibridoma son células modificadas por ingeniería capaces de multiplicarse rápidamente y de forma indefinida, produciendo un anticuerpo deseado en grandes cantidades. Las células de hibridoma se preparan retirando linfocitos B que producen anticuerpos a partir del bazo de un animal que se ha estimulado con el antígeno pertinente, que a continuación se fusionan con células inmortales de tumor de mieloma.

En un séptimo aspecto muy importante, la invención se refiere a un anticuerpo de acuerdo con la invención para usó como un fármaco. Más particularmente, se describe un uso del anticuerpo de la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades asociadas con el VHS en un sujeto. Del mismo modo, la invención se refiere al anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades asociadas con el VHS en un sujeto. Además, se describe un método para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades asociadas con el VHS en un sujeto, en el que el anticuerpo de la invención se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. La infección con VHS puede causar varias enfermedades distintas. La infección común de la piel o de la mucosa puede afectar a la cara y a la boca (herpes orofacial), genitales (herpes genital), o manos (panadizo herpético). Los trastornos más graves se producen cuando el virus infecta y daña al ojo (queratitis herpética), o invade el sistema nervioso central, dañando el cerebro (encefalitis herpética). Los pacientes con sistemas inmunológicos inmaduros o suprimidos, tales como recién nacidos, receptores de trasplante o pacientes con SIDA son propensos a varias complicaciones debidas a infecciones por el VHS. Las enfermedades asociadas con el VHS también incluyen herpes gladiatorum, meningitis de Mollaret, posiblemente parálisis de Bell, trastornos asociados con déficits cognitivos de trastorno bipolar, también conocidos como depresión maníaca, trastorno depresivo maníaco o trastorno afectivo bipolar y enfermedad de Alzheimer. Con respecto a la enfermedad de Alzheimer, publicaciones científicas recientes demostraron una sorprendente localización del ADN del virus herpes simple de tipo 1 dentro de las placas beta-amiloides, lo que sugiere que este virus puede ser la causa de las placas. Por último, el uso del anticuerpo de acuerdo con la invención es útil si se observa el desarrollo de cepas resistentes contra agentes virustáticos quimioterapéuticos comunes, por ejemplo, durante el tratamiento profiláctico y terapéutico de larga duración en pacientes

inmunodeprimidos.

Por lo tanto, en una realización preferente, la enfermedad asociada al VHS va acompañada por una o más de las siguientes características: presencia de una recidiva oral, presencia de una recidiva genital, eccema herpético, herpes neonatal, deficiencia inmunológica (pacientes inmunocomprometidos), inmunosupresión, encefalitis, meningitis, meningoencefalitis, infecciones oculares, infecciones por VHS generalizadas y/o resistencia contra un agente virustático.

En una realización preferente alternativa, la enfermedad asociada al VHS va acompañada por intolerancia hacia un agente virustático quimioterapéutico.

Como también se desvela en el presente documento del fármaco puede comprender al menos un agente activo adicional, preferentemente en el que el agente activo es una gente quimioterapéutico o un agente virustático, más preferentemente en el que el agente activo se selecciona entre el grupo que consiste en aciclovir, penciclovir, idoxuridina y foscarnet, como se ha descrito anteriormente.

El sujeto puede ser un mamífero tal como un perro, gato, cerdo, vaca, oveja, caballo, roedor, por ejemplo rata, ratón, y cobaya, o un primate, por ejemplo gorila, chimpancé, y ser humano, preferentemente el sujeto es un ser humano.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la reducción de la replicación del VHS *in vivo* mediante la administración del anticuerpo monoclonal (mAb) 2c después de infección establecida en la membrana mucosa vaginal. Los ratones inmunocompetentes (símbolos rellenos) y con agotamiento de CD4⁺ (símbolos abiertos) se trataron el día 3 y el día 11 después de la infección (flechas) mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con suero inmunológico del VHS policlonal (triángulos), con el 2c de mAb (círculos), o medio de cultivo de control (cuadrados).

La **Figura 2** muestra el efecto de 2c de mAb en la progresión de la infección por VHS en ratones inmunosuprimidos (CD4⁺/CD8⁻). El día 1 y 3 después de la infección (indicado con flechas), a los animales se les administró por vía i.p., cualquiera de medio de control (cuadrados rellenos), suero inmunológico del VHS policlonal (cuadrados abiertos), o 2c de mAb (círculos rellenos). **(A)** Muestra la tasa de supervivencia y **(B)** la replicación viral en la membrana mucosa vaginal.

La **Figura 3** es una presentación esquemática de los anticuerpos obtenidos a partir de 2c de mAb y fragmentos de anticuerpo. **(A)** Anticuerpos completos: la fusión genética de regiones variables de murino (V_L, V_H; parte izquierda) a los dominios constantes humanos (C_L, CH₁, CH₂, CH₃; parte media) da como resultado un anticuerpo quimérico. En un anticuerpo de IgG humanizado (parte derecha), las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal de murino se injertan en el armazón de un anticuerpo humano. **(B)** Fragmentos de anticuerpo: Los fragmentos de Fab monovalente (Fab), que consisten en la cadena ligera (V_L + C_L) y los dos dominios N-terminales de la cadena pesada (V_H + CH₁), o fragmentos divalentes F(ab')₂, que se unen con enlace covalente mediante dos restos de cisteína C-terminales sin emparejar, se pueden producir por medio de digestión de proteasa convencional. Para la generación del anticuerpo scFv de murino ("fragmento variable de una sola cadena"), los genes que codifican los dominios variables V_H y V_L se aislaron de la línea de células de hibridoma 2c y se unieron mediante un segmento que codificaba un péptido de unión flexible ("conector").

La **Figura 4** muestra un alineamiento de secuencias del dominio variable de cadena pesada y ligera (V_H y V_L). El sitio de unión a antígeno se define de acuerdo con Chotia (Chotia y Lesk, 1987; Chotia *et al.*, 1989) (línea de puntos) y Kabat (Kabat y Wu, 1991) (línea discontinua). Las secuencias DP28 y DPK13 de la línea germinal humana se tomaron de la base de datos de V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) y sirvieron como secuencias aceptoras para las CDR del 2c de mAb de murino. **(A)** "restos invariables" (Kabat y Wu, 1991); **(B)** "restos fundamentales" (Chotia *et al.*, 1989) y **(C)** restos en la superficie de contacto de V_H/V_L (Chotia *et al.*, 1985) se marcan con (+) para restos de emparejamiento o (-) para restos de no emparejamiento entre secuencia de murino y humana, respectivamente. **(D)** Restos en sitios núcleo tal como define Chotia (Chotia *et al.*, 1998) como sitios de restos invariables (i); sitios de restos similares (r); restos de superficie (s) R, K, E, D, Q, N; restos neutros (n) P, H, Y, G, A, S, T; y restos internados (b) C, V, L, I, M, F, W respectivamente; los restos neutros internados están marcados con x; los restos neutros de superficie están marcados con y; los sitios de restos sin emparejamiento entre secuencia murina y humana están marcados con letra en negrita; las secuencias insertadas con especificidad, VHhum2c y VLhum2c, con restos de CDR de murino se muestran con letras en negrita. Todos los restos se muestran en el código de letras individuales y se numeran de acuerdo con Kabat (Kabat *et al.*, 1991).

La **Figura 5** muestra las curvas de equilibrio-unión de anticuerpos monoclonales 2c, ch2c y variantes humanizadas hu2c-V1-V4. La especificidad y unión a glicoproteína B en la superficie de células Vero infectadas con F del VHS-1 se determinó mediante citometría de flujo. La actividad de unión a las concentraciones indicadas se proporciona con intensidad de fluorescencia media (MFI) menos fluorescencia de fondo. Las mediciones se realizaron por triplicado; las desviaciones típicas se muestran como barras. Las constantes de afinidad de unión K_D se determinaron ajustando los datos de unión al antígeno al modelo de regresión no lineal de acuerdo con el método de Levenberg-

Marquard.

La **Figura 6** muestra un estudio de competición que demuestra la especificidad del mismo epítipo de los anticuerpos quiméricos y humanizados que el anticuerpo 2c de mAb de murino precursor. Las variantes de mAb ch2c quimérico (círculo abierto) y de mAb humanizado hu2c-V1 (cuadrado), -V2 (triángulo), -V3 (asterisco), -V4 (diamante) compiten con el anticuerpo 2c de mAb precursor para su unión a gB presente en la superficie de células Vero infectadas con VHS-1. Las células Vero infectadas se incuban primero con concentraciones crecientes de cualquiera de mAb ch2c o los mAb humanizados hu2c-V1-V4, seguido de incubación con 100 nM de 2c de mAb como competidor. La intensidad de fluorescencia media (MFI) muestra la unión del competidor aplicado.

La **Figura 7** muestra que la actividad de neutralización del VHS del 2c de mAb precursor y el mAb hu2c-V1 humanizado es independiente del complemento. El VHS-1 se incubó previamente con medio (control), IgG policlonal Cytotect® (120 µg/ml), 2c de mAb (2 µg/ml), o mAb hu2c-V1 (2 µg/ml) en presencia o ausencia de complemento humano al 10 % antes de aplicarlo sobre células Vero. El desarrollo de placas se puntuó 2 días más tarde.

La **Figura 8** muestra la eficacia del mAb h2c-V1 humanizado para neutralizar VHS-1 y VHS-2 obtenidos a partir de aislados de paciente clínicamente resistentes a aciclovir (ACV), ACV and Foscarnet (PFA), o ACV, PFA y Cidovir (CDV) en comparación con cepas de laboratorio no resistentes (VHS-1 F, HSV-1 324hv, VHS-1 17 syn⁺, VHS-2 G), cepas de laboratorio resistentes a ACV VHS-1 TK⁻ y aislados clínicos en los que la resistencia no sea investigado. Para determinar la titulación de mAb h2c-V1 para neutralización completa del virus, se incubaron varias concentraciones de anticuerpos durante 1 h a 37 °C con 100 TCID₅₀ de aislados de VHS-1 o VHS-2 y se incubaron durante 3 días con células Vero. El mAb hu2c-V1 neutraliza las cepas VHS-1 F, VHS-1 324 hv, VHS-1 17 syn⁺, VHS-1 TK⁻ de laboratorio de VHS-1 completamente a concentraciones de 7,8-15,6 nM. Los aislados clínicos del VHS-1 se neutralizan con mAb h2c-V1 del mismo modo independientemente de su perfil de resistencia. Además, la misma eficacia de neutralización del mAb hu2c-V1 se mostró para la cepa VHS-2 G y aislados de VHS-2 resistentes a ACV a concentraciones de 31,3-62,5 nM.

La **Figura 9** muestra la inhibición de la propagación de célula a célula viral con el anticuerpo anti-VHS de la invención. Las células Vero infectadas con VHS-1 F durante 4 h se lavaron dos veces y se incubaron con medio que contenía un exceso de cualquiera de suero de control anti-VHS policlonal humano (1:20), el 2c de mAb de murino (500 nM), fragmentos de anticuerpo obtenidos a partir de 2c F(ab')₂ (500 nM) o Fab (3000 nM) preparado mediante digestión enzimática, el mAb ch2c quimérico (500 nM), o con la variante 1 del mAb humanizado, hu2c-V1 (500 nM), respectivamente. Dos días después de la extensión de la infección del virus se detectó con suero policlonal de cabra-anti-VHS etiquetado con fluorescencia usando un microscopio confocal DM IRE2 de Leica con un aumento de 40 veces. La titulación de la neutralización del anti-VHS policlonal humano se determinó previamente a 1:160 usando 100 TCID₅₀ en un volumen de 100 µl. El suero de anti-VHS a una dilución de 1:20 no puede prevenir la extensión del virus a células adyacentes. La propagación de célula a célula se podría inhibir de forma satisfactoria con 500 nM de cualquiera del 2c de mAb de murino, el fragmento de anticuerpo 2c-F(ab')₂, el mAb quimérico y el humanizado. El fragmento de 2c-Fab monovalente a la concentración más elevada sometida a ensayos de 3.000 nM no fue capaz de inhibir completamente la propagación de célula a célula.

La **Figura 10** muestra la supervivencia de ratones NOD/SCID infectados por vía intravaginal con VHS-1 después de inmunización pasiva con los mAb anti-VHS. Los ratones recibieron, 24 h antes de la infección, PBS por vía intravenosa (cruces), 2,5 mg/kg (cuadrados), 5 mg/kg (triángulos), o 15 mg/kg (círculos) de cualquiera del 2c de mAb precursor (símbolos abiertos) o el mAb hu2c-V1 humanizado (símbolos cerrados). Los ratones se infectaron por vía intravaginal con 1 x 10⁶ TCID₅₀/20 µl de la cepa F del VHS-1 neurovirulenta. Los ratones infectados con síntomas de pérdida de peso, vulvitis/vaginitis o enfermedades neurológicas se sacrificaron, y sus órganos se examinaron para virus infeccioso mediante titulación en monocapas de células Vero tal como se ha descrito anteriormente. Los ratones no infectados se sacrificaron el día 30. Animales por grupo n = 7.

La **Figura 11** muestra la protección de ratones NOD/SCID a los que se les aplican anticuerpos por vía sistémica contra diseminación de VHS-1. Comenzando 24 h después de la infección, los ratones recibieron cualquiera de 15 mg/kg de 2c de mAb o mAb hu2c-V1 humanizado tres veces por vía intravenosa en puntos temporales indicados con flechas (24 h, 40 h, 56 h). Animales infectados por grupo n = 7.

La **Figura 12** muestra que los ratones NOD/SCID infectados por vía intravaginal con un aislado de VHS-1 obtenido a partir de paciente hacia Aciclovir, Foscarnet y Cidovir estaban protegidos de forma significativa contra la encefalitis letal después de tratamiento por vía intravenosa a las 24 h, 40 h, y 56 h después de la infección con 15 mg/kg de mAb hu2c-V1 humanizado. Todos los ratones que recibieron tratamiento convencional dos veces al día con Aciclovir murieron en 28 días.

La **Figura 13** muestra la localización del epítipo de 2c de mAb con respecto a gB. **(A)** Muestra un alineamiento de secuencia de aminoácidos de glicoproteína B (gB) de VHS 1 y VHS2. Se muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína gB de las siguientes cepas (número de registro en NCBI correspondiente entre paréntesis): cepas de VHS1, KOS (P06437), F (P06436), gC-39-R6 (ABM66850), y cepas de VHS2, 333 (ABU45423), HG52 (P08666), y MMA (AAB60547). La secuencia señal de gB está subrayada. La gB madura

comienza en la posición 31 con los aminoácidos AP. La numeración de los aminoácidos se muestra para gB incluyendo la secuencia del péptido señal. Las numeraciones del epítipo se realizan en consecuencia. El 2c de mAb se une a dos regiones separadas dentro de gB (elecciones de secuencia en cajas) como se muestra mediante micromatrices de péptido. Se ha mostrado que los aminoácidos ²⁹⁹PFYGYRE³⁰⁵ son esenciales para unirse para la unión de 2c de mAb. **(B)** Caracterización de 2c de mAb de acuerdo con su reactividad con gB recombinante en diferentes condiciones de transferencia de Western. La gB recombinante (730t) se resolvió en un SDS-PAGE al 8 % en condiciones nativas (N) o desnaturalizantes (D), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se incubó durante 1 h en tampón de bloqueo TNT que contenía leche al 2 %. Las membranas se sondearon con anticuerpos monoclonales específicos para gB, mAb H1817, mAb H126, o 2c de mAb, y la unión a gB se detectó mediante suero de cabra-anti-ratón policlonal conjugado con HRP y quimioluminiscencia. Para los controles, se usaron los mAb H1817 y H126, que reconocen un epítipo continuo (Bender *et al.*, 2007) y un epítipo discontinuo (Kousoulas *et al.*, 1988), respectivamente. Un patrón de tinción habitual para un epítipo lineal se obtuvo en análisis de transferencia de Western con mAb H1817 que nuestra detección de formas monoméricas y triméricas de gB en condiciones no reductoras y tinción predominante única de monómero de gB en condiciones reductoras. Tal como se esperaba, el mAb H126 reaccionó con gB solo en condiciones nativas. El reconocimiento únicamente de la banda superior de la proteína gB > 170 kDa indica que mAb H126 se une de forma específica a la gB trimérica. El 2c de mAb reaccionó con gB nativa y desnaturalizada, sin embargo, la reactividad en condiciones desnaturalizantes era mucho más débil en comparación con mAb H1817 indica que 2c de mAb se une un epítipo discontinuo que parece que es resistente a la desnaturalización o al repliegamiento durante la electroforesis en SDS-PAGE y por lo tanto se denomina epítipo "pseudocontinuo" (Bender *et al.*, 2007). La masa molecular (kDa) se indica en la parte izquierda y la migración del trímero y monómero de gB en la parte derecha.

La **Figura 14** muestra la formación de mapas de péptidos de 2c de mAb para gB. **(A)** Localización esquemática de regiones de unión A y B identificadas en una biblioteca de péptidos que se extiende al dominio extracelular de gB desde los aminoácidos 31 a 505. Los péptidos 13méricos se sintetizaron en la membrana de celulosa continua con un desplazamiento de 3 aminoácidos y el 2c de mAb unido se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa mediante quimioluminiscencia. Los dominios funcionales I-V corresponden a la estructura cristalina de gB por Heldwein *et al.*, y las regiones no resueltas en la estructura cristalina se muestran en color gris (24), S, señal de secuencia. **(B)** Intensidades de señal de fluorescencia a partir de barridos láser de alta resolución con péptidos 13méricos inmovilizados en porta objetos de vidrio mediante un conector flexible.

La **Figura 15** muestra la localización de los epítopos 2c de mAb neutralizantes en la estructura cristalina de gB (PDB-ID 2GUM). El diagrama de cintas del trímero de gB se muestra. Los asteriscos indican los bucles de fusión de dos protómeros, los bucles de fusión del tercer protómero no son visibles. Los restos representados en mapas del epítipo de 2c de mAb discontinuo, F₁₇₅ a A₁₉₀ y F₃₀₀ as E₃₀₅, se indican en representación de superficie en color gris oscuro para un protómero y con color gris claro los otros protómeros.

La **Figura 16** muestra el barrido de dúotopo de 2c de mAb. Las secuencias consenso (subrayadas) de las regiones A y B de unión a 2c de mAb (barras discontinuas) se sintetizaron como dúotopos (barras de color blanco y negro) unidos directamente o separados por uno o dos espaciadores de β-alanina (B, B-B). La reactividad de mAb 2 c con dúotopos se registró mediante intensidades de señal de fluorescencia de barridos con las de alta resolución.

La **Figura 17** muestra las curvas de equilibrio-unión para 2c de mAb, 2c-F(ab')₂, 2c-Fab, y 2c-scFv tal como se determina mediante citometría de flujo. Las actividades de unión a células Vero infectadas con **(A)** VHS-1 F o **(B)** VHS-2 G a las concentraciones indicadas se muestran como porcentaje de intensidad de fluorescencia media máxima. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado; las barras representan desviaciones típicas.

La **Figura 18** muestra la inhibición de la unión del virión de VHS-1 por 2c de mAb a células diana. Las diluciones en serie de **(A)** 2c de mAb (0,98 - 125 nM) o **(B)** gamma globulina humana polivalente (Intratect®) (0,33 - 42 μM) se añadieron a monocapas de células Vero en placas de microtitulación de 96 pocillos siguiendo una incubación previa con 100 TCID₅₀ de VHS-1 (neutralización antes de la unión) o después de la absorción de 100 TCID₅₀ de VHS-1 a células diana (neutralización después de la unión). La titulación más elevada de anticuerpo e IgG humana polivalente, respectivamente, que previenen el efecto citopático inducido por virus (CPE) en diez individuos inoculados como capas celulares a un 100 % y un 50 % con respecto a controles se determinaron después de la incubación durante 72 h a 37 °C y se consideró como el punto final. Los errores estándar de la media de tres experimentos independientes fueron < 0,1.

La **Figura 19** muestra el efecto de los anticuerpos anti-gB neutralización *in vitro* del VHS. **(A)** Diluciones de anticuerpos divalentes 2c de mAb (IgG) y 2c-F(ab')₂, y 2c-Fab monovalente se incubaron durante 1 h con 100 TCID₅₀ de VHS-1 F o VHS-2 G antes de inoculación sobre células Vero. CPE se puntuó 72 h más tarde como se describe en la Fig. 3. Se muestran concentraciones de anticuerpos requeridas para neutralizar un 100 % del inoculó viral de uno de tres experimentos replicados representativos. **(B)** Actividad antiviral de fragmentos de 2c-Fab reticulados con las IgG anti-Fab de murino.

La **Figura 20** muestra la supervivencia dependiente de la dosis de ratone siendo deficientes tratados con 2c de mAb. Los ratones NOD/SCID recibieron diferentes dosificaciones individuales de 2c de mAb por vía intravenosa 24 h antes

de la estimulación intra vaginal con 1×10^6 TCID₅₀ de VHS-1. Animales por grupo $n = 7$ para PBS, $n = 9$ todos los otros grupos.

La **Figura 21** muestra la eliminación de una infección por VHS-1 establecida de membranas de la mucosa genital en ratones NOD/SCID mediante aplicación por vía sistémica de 2c de mAb o mAb hu2c-V1 humanizado contra la diseminación de VHS-1. Comenzando 24 h después de la infección, los ratones recibieron 15 mg/kg de 2c de mAb (símbolos abiertos) o mAb hu2c-V1 humanizado (símbolos cerrados) tres veces por vía intravenosa en puntos temporales indicados con flechas (24 h, 40 h, 56 h). Las titulaciones de virus vaginal de ratones tratados con anticuerpo o control se determinaron a partir de irrigaciones vaginales cultivadas en capas de células Vero. Las barras de error indican desviación típica.

La **Figura 22** muestra el barrido de péptido en la secuencia de gB de VHS-1 del aminoácido 31 a 505. Péptidos de 15 meros unidos a membranas de celulosa con un solapamiento de 12 aminoácidos (15/12 barridos) que dan como resultado un total de 175 aplicaciones puntuales de péptidos diferentes se incubaron con MAb 2c. El 2c de mAb unido a péptido se detectó usando un fragmento de Fab de IgG anti-ratón etiquetado con peroxidasa y un sustrato quimioluminiscente similar al luminol. Se encontró que el 2c de mAb se unía a un triplete (péptidos 49-51) y un doblete (péptidos 90-91) de péptidos de gB consecutivos designaba los sitios de unión A y B. La secuencia de gB común para los péptidos de cada sitio está resaltada con letras en negrita (parte inferior) y representa la secuencia de gB de los restos 181 a 189 y los restos 301 a 312.

La **Figura 23** muestra el barrido de péptido en la secuencia de gB de VHS-1 del aminoácido 296 a 315. Péptidos de 13 meros unidos a membranas de celulosa, cada péptido desplazándose a lo largo de la secuencia en un aminoácido (13/12 barridos) sintetizados por duplicado, se incubaron con 2c de mAb seguido de detección mediante transferencia de Western con quimioluminiscencia. La unión de 2c de mAb se observó para una serie de cinco péptidos. La secuencia común para los cinco péptidos reactivos es ₃₀₀FYGYREGSH₃₀₈.

La **Figura 24** muestra el barrido del motivo fundamental en la secuencia de gB del resto 295 a 315. La secuencia de gB de VHS-1 del aminoácido 295 a 315 se diseccionó en péptidos hexméricos, cada uno desplazándose a lo largo de la secuencia en un aminoácido, dando como resultado un total de 16 péptidos. Se hizo un marco de la secuencia obtenida a partir de gB con cuatro restos clasificados de forma aleatoria en cada extremo, N- y C-terminal. Se identificaron dos partidos consecutivos que representaban la secuencia de gB, ₃₀₀FYGYRE₃₀₅ y ₃₀₁YGYREG₃₀₆ que se unían a 2c de mAb. La secuencia común para estos péptidos está resaltada en letras en negrita (péptido 6 y 7).

La **Figura 25** muestra la cinética de eliminación de VHS-1 en las membranas de la mucosa genital de ratones C57BL/6 que recibieron suero inmunológico policlonal transferido de forma pasiva (cuadrado abierto, cuadrado relleno), 2c de mAb (círculo abierto, círculo cerrado), o medio de cultivo precipitado como control (triángulo abierto, triángulo relleno) 24 horas antes de la inoculación del virus. Los datos de los ratones inoculados con la cepa F de tipo silvestre (wt) y sus derivados mutantes R126 (Y303N), R1375 (R304Q), R1435 (H308Y), y R233 (R328H) se dan mediante símbolos abiertos, los datos los ratones inoculados con la cepa KOS 321 de tipo silvestre y su derivado mutante B4.1 (E305K) se dan mediante símbolos cerrados. Intervalo de E.S. ($\log_{10}$) y n.º de ratones inoculados: cepa F de wt, cuadrado abierto, $\pm 1,5$ a 0,12 ratones; círculo abierto, $\pm 0,4$ a 0,7 ratones; triángulo abierto, $\pm 1,3$ a 0,9 ratones; cepa KOS de wt, cuadrado relleno, $\pm 1,4$ a 0,8 ratones; círculo relleno, $\pm 0,6$ a 0,8 ratones; triángulo relleno, $\pm 1,4$ a 0,8 ratones; cepa R126 de mutante F (Y303N), cuadrado abierto, $\pm 0,6$ a 0,5 ratones; círculo abierto, $\pm 0,6$ a 0,6 ratones; triángulo abierto, $\pm 0,5$ a 0,6 ratones; cepa R1375 de mutante F (R304Q), cuadrado abierto, $\pm 1,2$ a 11 ratones; círculo abierto, $\pm 1,3$ a 0,10 ratones; triángulo abierto, $\pm 1,2$ a 0,11 ratones; cepa B4.1 de mutante KOS (E305K), cuadrado relleno, $\pm 0,9$ a 0,12 ratones; círculo relleno, $\pm 0,7$ a 0,12 ratones; triángulo relleno, $\pm 0,9$ a 0,10 ratones; cepa R1435 de mutante F (H308Y), cuadrado abierto, $\pm 1,4$ a 0,6, 6 ratones; círculo abierto, 0, 5 ratones; triángulo abierto, $\pm 1,0$ a 0,6, 6 ratones; cepa R233 de mutante F (R328H), cuadrado abierto, $\pm 1,0$ a 0, 5 ratones; círculo abierto, $\pm 0,1$ a 0, 5 ratones; triángulo abierto, $\pm 1,1$ a 0, 6 ratones.

La **Figura 26** muestra la comparación de la reactividad de 2c de mAb con respecto al péptido 90 (véase la Fig. 22, secuencia de gB ₂₉₈SPFYGYREGSHT₃₁₂; parte izquierda), y un péptido diseñado para que comprendiera los restos críticos del sitio B, un conector de glicina, y el motivo FEDF obtenido a partir del sitio A (PFYGYRE -G-FEDF; parte derecha).

Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente con los siguientes ejemplos que no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de un anticuerpo monoclonal de murino (mAb) 2c con especificidad para la glicoproteína B (gB) del virus del herpes simple de tipo 1 y de tipo 2 (VHS1, VHS2)

Para la generación de un mAb específico de anti-VHS, los ratones BALB/c se inmunizaron con la cepa 342 hv del

VHS1 inactiva da por UV. Posteriormente en los esplenocitos de murino se immortalizara mediante fusión somática a la línea X63-Ag8.653 de células de mieloma y una línea de células de hibridoma que secretan el 2c de mAb específico de anti-VHS (IgG2a) se aisló mediante identificación sistemática de los sobrenadantes en clones de células individuales usan en inmunoensayos enzimáticos, ensayos de inmunofluorescencia así como ensayos de neutralización de VHS. Los estudios de unión desvelaron que 2c de mAb reconoce un epítipo discontinuo, compartido de la glicoproteína gB de VHS1 y VHS2. La glicoproteína B tiene una longitud de aproximadamente 904 aminoácidos y está integrada en un trímero en la membrana viral y en la membrana células infectadas con VHS 1/2. Es de relevancia particular que 2c de mAb no solamente neutralizar la extensión de las partículas virales extracelulares, sino que también inhibe de forma eficaz la ruta de infección directa desde la célula infectada inicialmente a células no infectadas adyacentes (propagación de célula a célula), que es característico del VHS. El último proceso normalmente no se va a inhibir con el repertorio de anticuerpo específico para VHS de origen natural en seres humanos.

Con el fin de examinar la eficacia del 2c de mAb *in vivo*, se ha elegido una ruta de infección en el modelo de ratón, que se parece muy de cerca a las relaciones de infección natural en seres humanos. Por lo tanto, los ratones C57BL/6J se infectaron mediante aplicación de la cepa 342 hv de VHS1 en la membrana de la mucosa vaginal intacta. Para inhibición de la replicación del VHS *in vivo*, el 2c de mAb se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones en diferentes puntos temporales después de la infección. En ambos animales inmunocompetentes y con agotamiento de linfocitos T CD4⁺, el 2c de mAb es capaz de inhibir la propagación viral en la membrana de la mucosa vaginal y la formación de lesiones inflamatorias dentro de un breve periodo de tiempo (**Fig. 1**).

A diferencia del suero de VHS policlonal, el 2c de mAb fue capaz de inhibir la replicación viral así como prevenir una enfermedad de progresión letal, generalizada con una alta eficacia en animales inmunosuprimidos con linfocitos T totalmente agotados (CD4⁺ y CD8⁺) (**Fig. 2**). La administración de 2c de mAb 24 h antes de la inoculación viral protegió a los animales de forma eficaz contra la infección (Eis-Hübingen *et al.*, 1993).

Con el fin de examinar la influencia del número de sitios de unión a antígeno (valencia) y la parte Fc en las propiedades neutralizantes, los fragmentos de Fab y F(ab')₂ del 2c de mAb se generaron mediante digestión de proteasa convencional al igual que se clonó como un "Fv de una sola cadena" (scFv) recombinante de 2c de mAb, se produjo y se purificó (**Fig. 3**) usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las constantes de afinidad (K_D) se determinaron mediante citometría de flujo usando células Vero infectadas con VHS que expresaban la proteína gB como única proteína asociada a membrana en la superficie celular durante el ciclo de replicación de VHS natural, como un método bien conocido en la técnica. Los resultados se muestran en la **Tabla 1** que sigue a continuación.

Tabla 1 Constantes de afinidad (K_D) del 2c de mAb de murino y de los fragmentos de anticuerpo de 2c generados

Cepa:	VHS-1 F				VHS-2 G
Valencia:	<i>divalente</i>		<i>monovalente</i>		<i>divalente</i>
	2c IgG	2c-F(ab') ₂	2c-Fab	2c-scFv	2c IgG
K _D [nM]	10	7	17	19	10

En comparación con el 2c de mAb precursor, el fragmento de F(ab')₂ un ligero aumento de la afinidad. Los fragmentos de Fab y scFv tienen una afinidad casi idéntica, que, sin embargo, se debe a su monovalencia de aproximadamente 1,7 - a 1,9 veces más débil que la afinidad del mAb precursor.

La actividad neutralizante de anticuerpos se determinó mediante un ensayo de dilución de punto final estándar usando células Vero cultivadas como monocapa sin placas de microtitulación. En resumen, 100 TCID₅₀ de VHS se incubaron previamente en 100 µl de medios de cultivo celular durante 1 h a 37 °C con diluciones en serie de anticuerpos (2c-IgG y F(ab')₂: 0,98 nM-125 nM; Fab: 23 nM-3000 nM) antes de inoculación de células Vero. Después de 72 h de incubación a 37 °C la concentración de anticuerpos requerida para evitar la formación de CPE inducida por virus a un 100 % se determinó como titulación de neutralización completa. Además, la capacidad de neutralización del virus de fragmentos de 2c-Fab monovalentes se determinó en presencia de anticuerpos reticulados.

Tabla 2 Neutralización completa de una cantidad definida de virus de 100 TCID₅₀

Cepa:	VHS-1 F			VHS-2 G		
Valencia:	<i>divalente</i>		<i>monovalente</i>	<i>divalente</i>		<i>monovalente</i>
Concentración K _D [nM]	2c IgG	2c-F(ab') ₂	2c-Fab	2c IgG	2c-F(ab') ₂	2c-Fab
	8	4	3000	31	16	3000

Se pudo demostrar que el 2c de mAb precursor y sus fragmentos de F(ab')₂ y Fab son capaces de una neutralización completa de VHS1 y VHS2. Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo monovalente muestran una eficacia de neutralización significativamente reducida para VHS 1/2 en comparación con 2c de mAb. Una concentración más elevada de 375 veces y 97 veces del fragmento de Fab es necesaria para una neutralización de un 100 % de VHS1 y VHS2, respectivamente. El scFv mostró un efecto reductor de placas pero no fue capaz de inhibir completamente CPE a la concentración más elevada sometida al ensayo de 3000 nM (los datos no se muestran). La capacidad de neutralización viral del fragmento de Fab de 2c monovalente pudo aumentar dos veces mediante la adición de un exceso de una IgG específica anti-Fab (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Inglaterra) a la etapa de incubación previa (no se muestra). Por el contrario, el fragmento de F(ab')₂ divalente presenta una actividad de neutralización prácticamente dos veces más eficaz tanto para VHS1 como para VHS2 en comparación con el 2c de mAb precursor. En conclusión, la valencia del anticuerpo desempeña un papel importante para sus propiedades de neutralización. Las concentraciones del anticuerpo más elevadas requeridas para la neutralización completa de VHS-2 se pueden explicar con una cantidad más elevada de partículas no infecciosas producidas por VHS-2 en comparación con VHS-1, tal como se confirma mediante la determinación con RT-PCR de los números de copias de ADN para VHS-1 y VHS-2 (los datos no se muestran).

Los detalles adicionales para las propiedades de 2c de mAb y su producción se proporcionan en Eis-Hübinger *et al.*, 1991, y Eis-Hübinger *et al.*, 1993.

Ejemplo 2

Quimerización y Humanización de 2c de mAb

Con el fin de usar el anticuerpo monoclonal murino 2c como un agente terapéutico, el anticuerpo se modificó usando métodos de ingeniería genética con el objetivo de reducir o eliminar su inmunogenicidad durante la administración a seres humanos, a la vez que se retenía totalmente la especificidad del anticuerpo precursor. Por consiguiente, se generó un anticuerpo quimérico y un anticuerpo monoclonal humanizado con la misma especificidad que el 2c de mAb (**Fig. 3**).

En primer lugar, los genes auténticos de las cadenas pesada y ligera variables (V_H, V_L) del 2c de mAb se aislaron y se amplificaron a partir de la línea de células de hibridoma usando 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR. Un anticuerpo IgG1 quimérico (ch2c) se generó clorando los genes de V_H y V_L amplificados en vectores de expresión contruidos con el compañero de cooperación de los investigadores, el Dr. Grosse-Hovest (Universität Tübingen), que contiene las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un isotipo de IgG1 humana. Por último el anticuerpo se secretó en sobrenadantes de cultivo celular de células de mieloma murino Sp2/0 transfectadas de forma estable.

Con el fin de reducir adicionalmente la inmunogenicidad, se construyó un anticuerpo humanizado. Por lo tanto, las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que codifican segmentos genéticos del 2c de mAb (2c V_L-CDR1/2/3 y 2c V_H-CDR1/2/3) se clonaron en armazones aceptores de inmunoglobulina de marco humano adecuados de los genes de la línea germinal humana de V_H y V_L, respectivamente (injerto de CDR). Los armazones aceptor es de línea germinal humana adecuados para clonación de las regiones CDR de la cadena ligera y la cadena pesada del 2c de mAb se determinaron mediante alineamiento de secuencias con las correspondientes regiones marco conservadas humanas de la base de datos de V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). DP28 mostró la identidad de secuencias del marco más elevada para la correspondiente secuencia de V_H de cadena pesada mAb 2v de murino (identidad de secuencias de un 88,5 %); DPK13 mostró en la identidad de la secuencia marco más elevada para la correspondientes secuencia de V_L de cadena ligera de 2c de mAb (identidad de secuencias de un 88,9 %). Por lo tanto, los segmentos genéticos que codifican la CDR del anticuerpo donante de murino 2c (es decir, 2c V_L-CDR1/2/3 y 2c V_H-CDR1/2/3) se clonaron en marcos a sectores que codificaban DP28 y DPK13, respectivamente.

En el contexto de humanización de anticuerpos monoclonales, es necesario identificar los aminoácidos en las regiones marco conservadas humanas, que podrían ser perjudiciales para la integridad de la estructura de las CDR de murino introducidas y por lo tanto con respecto a las propiedades de unión a antígeno. Normalmente, los aminoácidos de ese tipo se identifican usando modelos de homología generados por ordenador, y las posiciones que

parece que son estéricamente fundamentales se mutan a la correspondiente secuencia de murino, con el fin de retener las propiedades de unión a antígeno del mAb detonante en murino (véase. Queen *et al*, 1989). Sin embargo, los aminoácidos potencialmente fundamentales también se pueden identificar usando bases de datos de repertorio de anticuerpo y evaluando su significancia crítica basándose en anticuerpos de referencia con una estructura tridimensional conocida (véase Krauss *et al*, 2003). Por consiguiente, se determinaron varios aminoácidos potencialmente fundamentales en la región marco de V_H y V_L (**Fig. 4**) y cuatro variantes de 2c de mAb humanizado en las que estos aminoácidos potencialmente fundamentales se retromutaron sucesivamente a su correspondiente resto de murino se generaron mediante PCR de extensión de solapamiento (**véase la Tabla 3 que sigue a continuación**).

Tabla 3 Variantes de 2c de mAb con Retromutaciones en regiones marco conservadas para secuencia de donante murino

Variante de mAb humanizado	Injerto de CDR de 2c		Retromutaciones para la secuencia de donante de amazón de 2c murino	
	V _L	V _H	V _L	V _H
h2c-V1	CDR 1/2/3	CDR1/2/3	-	-
h2c-V2	CDR 1/2/3	CDR1/2/3	-	N76K
h2c-V3	CDR1/2/3	CDR1/2/3	-	N76K, V79F
h2c-V4	CDR1/2/3	CDR1/2/3	I2V	N76K, V79F

Las variantes de anticuerpo humanizado h2c-V1-4 se construyeron prolongando los genes de V_H y V_L humanizados en el vector de expresión que se ha mencionado anteriormente construido con el compañero de cooperación de los investigadores, el Dr. Grosse-Hovest (Universität Tübingen). Por último el anticuerpo se expresó después de transfección estable de la línea de células de mieloma de murino Sp2/0. Después de selección de clones con tasas de producción específica elevadas, los anticuerpos se produjeron de forma cuantitativa y se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo celular para caracterización adicional.

Caracterización del anticuerpo de IgG1 anti-VHS quimérico y humanizado

La constante de afinidad (K_D) se determinó del mismo modo mediante citometría de flujo como se ha descrito para los fragmentos de anticuerpos de 2c de mAb precursor y de anticuerpo 2c (véase el Ejemplo 1), usando células Vero infectadas con VHS. Los resultados se muestran en la **Fig 5**.

El anticuerpo quimérico ch2c retuvo la afinidad del anticuerpo precursor 2c de mAb. En el caso de las variantes humanizadas, solo el injerto de CDR al igual que para la variante h2c-V1 fue lo suficiente como para conservar una afinidad comparable a la del 2c de mAb de murino. Por lo tanto las oscuras sucesivas adicionales de los restos de armazón humano con respecto a la respectiva secuencia de murino no fueron necesarias para mejorar la integridad estructural del sitio de unión a antígeno. La variante h2c-V2 incluso exhibe una afinidad menor de dos veces en comparación con 2c de mAb.

Con el fin de demostrar que las variantes de anticuerpo 2c de mAb quimérico y de anticuerpo humanizado mAb h2c 1-4 reconocen el mismo epítipo que el 2c de mAb precursor, se realizaron estudios de competición. Las células Vero infectadas con VHS-1 (3 moi, 20 h) se incubaron primero durante 1 hora con concentraciones crecientes del anticuerpo mAb ch2c quimérico o los mAb hu2c V1-V4 humanizados, respectivamente. En una segunda etapa de incubación se añadió 100 nM del 2c de mAb precursor y su unión se detectó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo etiquetado con fluorescencia dirigido contra los dominios constantes de murino (**Fig. 6**).

El estudio de competición muestra que la señal de fluorescencia que representa la unión del competidores inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos sin etiquetar aplicados en la primera etapa de incubación. Esto demuestra que las variantes de mAb quimérico y de mAb humanizado compiten con 2c de mAb para el mismo sitio de unión específico y por lo tanto reconocen el mismo epítipo.

La capacidad de neutralización viral de mAb ch2c y las cuatro variantes de h2c humanizadas se examinó con preparaciones de anticuerpo purificado como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la **Tabla 4** que sigue a continuación. Las concentraciones respectivas necesarias para una neutralización de un 50 % y una neutralización completa de VHS de una cantidad viral definida de 100 TCID₅₀ se indican.

Tabla 4 Concentraciones de anticuerpos requeridas para una neutralización de un 50 % o completa de una cantidad viral definida de 100 TCID₅₀

mAb concentración [nM] requerida para	2c	ch2c	h2c-V1	h2c-V2	h2c-V3	h2c-V4
50 % de neutralización	4,3	3,5	3,7	5,1	3,3	3,7
100 % de neutralización	7,8	7,8	7,8	15,6	7,8	7,8

El mAb ch2c quimérico y todos los mAbs h2c humanizados con la excepción de mAb h2c-V2 neutralizan el VHS con la misma eficacia que el 2c de mAb precursor. La eficacia de neutralización reducida a dos veces de mAb h2c-V2 se correlaciona con la afinidad más baja de esta variante. Para caracterización experimental y evaluación preclínica adicionales se eligió mAb h2c-V1, ya que esta variante posee la misma afinidad y propiedades de neutralización de virus que el anticuerpo precursor 2c de mAb. Además mAb h2c-V1 no tiene en las regiones marco conservadas retromutaciones para la secuencia dadora de murino y por lo tanto se espera que tenga un potencial inmunogénico bajo en seres humanos.

La influencia del complemento en la actividad de neutralización del mAb h2c-V1 humanizado y el 2c de mAb de murino se investigó usando el ensayo de reducción de placas. A diferencia del suero de globulina hiperinmune humana (Cytotect®, Biotest AG) el 2c de mAb precursor y la variante humanizada mAb h2c-V1 neutralizan VHS independientemente del complemento para la gB de VHS-1 neutralizan un 50 % de la entrada viral con titulaciones entre 0,8 - 160 µg/ml (Navarro *et al*, 1992, Virology 186). Las titulaciones requeridas para neutralizar VHS-1 (F) en un 50 % usando ensayo de dilución de punto final de las variantes de 2c de mAb murino, el mAb ch2c quimérico y el mAb humanizado son 3,3 - 5,1 nM, que corresponde a 0,49 - 0,78 µg/ml (véase la **Tab. 4**).

Los ensayos de neutralización de aislados clínicos de VHS-1 y VHS-2 demuestran las mismas susceptibilidades para la inactivación con la variante h2c-V1 de mAb humanizado en comparación con las cepas de VHS-1 y VHS-2 de laboratorio. Además, el mAb h2c-V1 neutraliza el VHS de aislados de paciente clínicamente resistentes al aciclovir (ACV), ACV y Foscarnet (PFA), o ACV, PFA y Cidovir (CDV) con la misma eficacia que las cepas de laboratorio no resistentes o aislados clínicos con resistencia desconocida (**Fig 8**). Por lo tanto, el mAb h2c-V1 humanizado representa un nuevo agente antiviral potente que supera limitaciones mediante fármacos antiherpéticos convencionales que inducen cepas de VHS resistentes.

Para su extensión dentro de un hospedador, el VHS usados mecanismos: liberación de partículas sin células y propagación de célula a célula, directa. La propagación de célula a célula del VHS puede proporcionar ventajas con respecto a la extensión sin celular, tales como una replicación viral y diseminación directa rápidas, y resistencia a elementos de la respuesta inmunológica humoral. Con el fin de examinar la propagación de célula a célula con los anticuerpos anti-VHS, las células Vero se sembraron encubrir objetos de vidrio en una placa de cultivo tisular de veinticuatro pocillos, se cultivaron hasta confluencia, y se inocularon con VHS-1 F a 400 TCID₅₀ por pocillo durante 4 h a 37 °C. El inóculo del virus se aspiró, las células Vero se lavaron dos veces con PBS se cultivaron adicionalmente durante 48 h a 37 °C en 1 ml de DMEM que contenía FBS al 2 %, antibióticos, y cualquiera de un exceso de anticuerpos neutralizantes, suero anti-VHS policlonal humano o anticuerpos no neutralizantes para fines de control. Después de 48 h el medio de cultivo se retiró, las monocapas de células Vero se lavaron dos veces con solución salina tamponada con HEPES, y se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Las monocapas de células se aclararon dos veces con PBS y se incubaron durante 15 min en 500 µl de tampón de bloqueo que contenía Tween 20 al 0,05 % en solución salina tamponada con HEPES. Los antígenos virales se detectaron mediante tinción de monocapas de células infectadas con VHS-1 con suero de cabra-anti-VHS policlonal conjugado con FITC (BETHYL, Montgomery, TX, USA) diluido a 1:100 en tampón de bloqueo. Las monocapas de células se lavaron tres veces con PBS y se montaron con Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Las células positivas para inmunofluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal DM IRE2 de Leica con un aumento de 40 veces (**Fig. 9**).

El anti-VHS suero policlonal humano (1:20) no tiene efecto inhibitorio en la propagación de célula a célula del VHS (**Fig. 9A**). El 2c de mAb precursor y su fragmento de F(ab)₂ inhiben, a una concentración de 500 nM, la propagación de célula a célula completamente y solo se detectan células infectadas con VHS individuales (**Fig. 9B y C**). El fragmento de Fab, que se aplicó en una concentración seis veces más elevada del 2c de mAb precursor se reduce en comparación con el suero anti-VHS policlonal humano la propagación de célula a célula ligeramente, pero no es capaz de inhibir la propagación de célula a célula completamente (**Fig. 9D**). Como ya se ha mostrado en el ensayo de neutralización, estos resultados confirman que la divalencia de los anticuerpos neutralizantes desempeña un papel fundamental para su capacidad para inhibir la extensión del VHS. La variante de mAb ch2c quimérico y la variante de mAb h2c-V1 humanizado inhiben la propagación de célula a célula del VHS a una concentración de

500 nM tan eficaz como el 2c de mAb precursor (**Fig. 9E y F**). Un ensayo de inhibición de placas convencional (Highlander *et al.*, 1988) que se realizó adicionalmente confirmó los resultados obtenidos por evaluación con el microscopio confocal.

Los experimentos de protección del VHS *in vivo* iniciales muestran que una sola dosis i.v. de 5 mg/kg del mAb h2c-V1 humanizado al igual que el 2c de mAb precursor prolonga la supervivencia de ratones inmunocomprometidos gravemente infectados con VHS-1 F por vía intravaginal (NOD-SC1D) de forma significativa (**Fig. 10**). Los ratones que reciben 15 mg/kg de cualquiera del mAb h2c-V1 humanizado o del 2c de mAb precursor están totalmente protegidos contra la encefalitis letal (**Fig. 10**). Además, el 2c de mAb-V1 humanizado también confiere protección de la diseminación viral y encefalitis letal en presencia de una infección con VHS periférica establecida. Los ratones NOD/SCID una titulación elevada de VHS-1 en irrigaciones vaginales a las 24 h después de la estimulación viral del resultado letal de la infección cuando se trataban de forma repetida a las 24 h, 40 h y 56 h por vía intravenosa con 15 mg/kg de 2c de mAb-V1 o 2c de mAb humanizados (**Fig. 11**). Además, el anticuerpo 2c de mAb-V1 humanizado también evitaba la encefalitis letal en ratones NOD/SCID con infección establecida de una cepa de VHS de múltiple resistencia. Por el contrario, todos los ratones que recibieron Aciclovir murieron (**Fig. 12**).

Formación de mapas de epítomos

Los estudios de unión que usan células COS-1 transfectadas con plásmidos de expresión que codifican gB de longitud completa (31-904) o mutantes de gB con truncamientos C-terminales en las posiciones 720, 630, 503, 487, y 470 situaron al epítipo reconocido por el 2c de mAb de murino precursor dentro de los primeros 487 aminoácidos de la gB. Las investigaciones adicionales que usan solapamientos de péptidos largos de 15 aminoácidos (aa) sintéticos unidos en fase sólida con 12 aa entretejidos secuenciales mostraron, que 2c de mAb forma mapa con un epítipo conformacional. El MAb 2c se unió a tres péptidos consecutivos que representan la secuencia de la glicoproteína B desde el aa 175 al 195 (región A). Además, 2c de mAb se une fuertemente a un péptido que representa los aminoácidos 298-312 (²⁹⁸SPFYGYREGSHTHT₃₁₂) (SEQ ID NO: 17) y se une de forma moderada to al péptido posterior que representa los aminoácidos 301-315. (**Fig. 13A y Fig. 22**). La caracterización de 2c de mAb de acuerdo con su reactividad en transferencias de Western con gB recombinante (gB(730)t, proporcionado amablemente por Florent Bender, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), que se separó en condiciones de SDS-PAGE nativo o desnaturizante, confirma que 2c de mAb reconoce un epítipo discontinuo que es parcialmente resistente a la desnaturalización o que se reforma durante las condiciones de transferencia de Western, y por lo tanto se denomina epítipo "pseudocontinuo" (Ref Bender, F *et al.* J. Virol. 2007, 81 p3872-3841) (**Fig. 13B**).

Con el fin de identificar epítomos en la proteína gB del VHS-1 pertinentes para la actividad neutralizante de virus de mAb2c, se han estudiado mutantes de VHS-1 resistentes a anticuerpo monoclonal (mar) con intercambios individuales de aminoácidos (aa) en su glicoproteínas (**Tabla 5**).

Tabla 5 Actividad de neutralización y unión de 2c de mAb hacia mutantes de VHS-1 resistentes a anticuerpo monoclonal (mar)

Mutante mar	Intercambio de aminoácido dentro de la proteína gB del mutante mar ^a	neutralización %	unión
R126 ^(1,2)	Y->N ₃₀₃	0	-
R1375 ⁽³⁾	R->Q ₃₀₄	0	-
B4.1 ⁽⁴⁾	E->K ₃₀₅	0	-
R1435 ⁽³⁾	H->Y ₃₀₈	100	+++
R233 ⁽¹⁾	R->H ₃₂₈	100	+++

(a) numeración de acuerdo con la glicoproteína B madura incluyendo secuencia señal (Fig. 13A)

(1) Kousoulas *et al.*, 1984

(2) Pellett *et al.*, 1985

(3) Kousoulas *et al.*, 1988

(4) Highlander *et al.*, 1989

Mab 2c no neutralizó los mutantes mar, R126, R1375, y B4.1, pero neutralizó completamente la capacidad de infección de los votantes R1435 y R233, respectivamente. Además, los ensayos de inmunofluorescencia confirmaron que 2c de mAb no se une a células Vero infectadas con los mutantes mar, R126, R1375, y B4.1. Estos resultados indican que los aminoácidos Y₃₀₃, R₃₀₄ y E₃₀₅ son esenciales para la actividad de neutralización de mAb2c. Una fuerte señal de fluorescencia se obtuvo usando células Vero infectadas con los mutantes mar, R1435 y R233.

En particular, se encontró que el reconocimiento y unión de 2c de mAb a los aminoácidos 303-305 de gB era esencial para su función (neutralización viral, inhibición de la propagación de célula a célula). Ya que esta región de gB está altamente conservada entre las cepas VHS-1 y VHS-2, se supone que estos aminoácidos pertenecen a la maquinaria de fusión al núcleo de gB y son esenciales para la entrada del virus. Por lo tanto, la aparición de mutantes de gB naturales, a los que 2c de mAb no se une, es incluso improbable en presión de selección elevada.

Ejemplo 3

Determinación de afinidad de anticuerpo

Las monocapas de células Vero se infectaron a una confluencia de un 80-90 % con VHS-1 o VHS-2 a MOI 3 y se recogieron al día siguiente mediante tripsinización seguido de lavado en PBS. Las mediciones de unión a la superficie celular de los anticuerpos 2c se realizaron como se ha descrito anteriormente (1). En resumen, fragmentos de 2c de mAb purificados o fragmentos derivados de anticuerpo 2c-F(ab')₂, 2c-Fab, y 2c-scFv se incubaron por triplicado a concentraciones de 0,03 nM - 500 nM con 5 x 10⁵ células Vero en 100 µl de tampón FACS (PBS, FBS al 2 %, azida sódica al 0,1 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de tampón FACS y se incubaron con IgG de cabra-anti-ratón específica de Fab etiquetada con FITC, (15 µg/ml, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, Inglaterra) a la detección de 2c de mAb, 2c-F(ab')₂, y 2c-Fab unidos. El scFv unido se detectó incubando primero con concentraciones de saturación del mAb 9E10 anti-c-myc (10 µg/ml; Roche, Indianapolis, IN, USA), seguido de dos lavados e incubación con IgG de cabra-anti-ratón específica de Fcy etiquetada con FITC (15 µg/ml; Jackson ImmunoResearch). Las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en tampón FACS. La fluorescencia se midió en un FACScalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), y la intensidad de presencia media (MFI) se calculó usando el software CellQuest (BD Biosciences). La fluorescencia del fondo se restó y las constantes de unión en equilibrio se determinaron usando el método de Marquardt y Levenberg a la regresión no lineal con la versión 4.0 de GraphPad Prism (GraphPad Software La Jolla, CA).

Caracterización de epítomos

La inmunorreactividad de 2c de mAb con glicoproteína B truncada nativa o desnaturalizada, gB(730)t (4), proporcionada amablemente por Roselyn J. Eisenberg y Gary H. Cohen (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) se realizó básicamente como se describe (4): la gB(730)t purificada (0,75 µg) se resolvió en SDS-PAGE al 8 % en condiciones no reductoras (tampón de muestra que contiene SDS al 0,2 %) o desnaturalizantes (tampón de muestra que contiene SDS al 2 % y β-Mercaptoetanol 155 mM, 2 min a 95 °C) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de membrana se bloquearon con leche al 2 % en tampón TNT (Tris.HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,05 %) durante 1 hora seguido de incubación con 5 µg/ml de anticuerpos 2c de mAb específicos para glicoproteína B, H126 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) y H1817 (Novus) en leche al 2 %/tampón TNT durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo de cabra-anti-ratón policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:20.000 QED Bioscience Inc. San Diego, CA, USA) y quimioluminiscencia (Thermo Scientific,) usando el Analizador de Imágenes Luminiscentes LAS 3000 Image Analyzer (Fujifilm, Tokio, Japón).

Las células COS-1 se transfectar o de forma transitoria con el método de DEAE-dextrano con plásmido se codificaban cualquiera de la gB del VHS-1 de longitud completa (31-904, pRB9221) o mutantes de delección C-terminal truncados en las posiciones 720 (pTS690), 630 (pPS600), 503 (pRB9510), 487 (pRB9509), y 470 (pRB9508). Los plásmidos fueron proporcionados amablemente por L. Pereira (52, 55). Los ensayos de inmunofluorescencia con células transfectadas usando anticuerpos mAb2c o anticuerpos de control se realizaron como se describe en cualquier parte (53).

Formación de mapas de péptidos

Los péptidos 13méricos y duótopos de solapamiento unidos a celulosa se prepararon de forma automática de acuerdo con protocolos convencionales de SPOT-Síntesis tal como se ha descrito (20, 34) (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania). Además, los precios acoplados con una etiqueta de reactividad y un conector se inmovilizaron de forma quimioselectiva en una superficie de vidrio modificado en tres submatrices idénticas y se purificó a la retirada de secuencias truncadas y acetiladas mediante etapas de lavado posteriores. Las micromatrices de péptidos se bloquearon con TBS que contenía tampón de bloqueo (Pierce International) durante 2 h, y se incubaron con 10 µg/ml de 2c de mAb en tampón de bloqueo durante 2 h. Las micromatrices de péptidos se lavaron con tampón TBS que contenía Tween al 0,1 % (T-TBS) y el anticuerpo unido a péptido en la membrana peptídica se transfirió sobre una membrana de PVDF. La IgG anti-ratón ya fuera etiquetada con peroxidasa (Sigma) o etiquetada con fluorescencia (Pierce) se usó con anticuerpo secundario a una concentración final de 1 µg/ml en tampón de bloqueo. Después de 2 h de incubación y un lavado final con T-TBS, las membranas de PVDF se analizaron usando sustrato de quimioluminiscencia (Roche Diagnostics). Las micromatrices de péptidos en portaobjetos de vidrio se lavaron minuciosamente con T-TBS y tampón SSC 3 mM (JPT Peptide Technologies), se secaron con nitrógeno y se hizo un barrido usando un escáner de fluorescencia de alta resolución (Axon GenePix 4200 AL). Las intensidades de la señal de fluorescencia (Light Units, LU) se analizaron usando software de reconocimiento de aplicación puntual (GenePix 6.0) y se corrigieron para intensidades de fondo a partir de incubación es de control con IgG anti-ratón

secundaria.

Ensayo de neutralización de virus

La actividad neutralizante de anticuerpos se determinó mediante ensayo de dilución en el punto final como se ha descrito anteriormente (16). En resumen, diluciones en serie de anticuerpos se incubaron con 100 TCID₅₀ de VHS-1 o VHS-2 durante 1 h a 37 °C en medio de cultivo celular. El inóculo de virus de anticuerpo se aplicó a monocapas de células Vero cultivadas en placas de microtitulación y el efecto citopático (CPE) se puntuó después de incubación durante 72 h a 37 °C. La concentración de anticuerpos requerida para reducir el CPE inducido por virus en un 100 % se determinó como titulación de neutralización completa. Además, la capacidad de neutralización de virus de fragmentos de 2c-Fab monovalentes se investigó en presencia de anticuerpos de reticulación, añadiendo un exceso de las IgG de Fab anti-murino (2600 nM, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, Inglaterra) a la etapa de incubación previa. Para fines de control, el virus sin anticuerpo y el anticuerpo solo se usaron para inducir el CPE máximo o nada de CPE, respectivamente. Los ensayos de neutralización de virus se repitieron al menos dos veces con resultados similares.

Ensayo de Neutralización Después de Unión

Las monocapas de células enfriadas previamente (4 °C durante 15 min) se infectaron con 100 TCID₅₀ de VHS-1 F a 4 °C durante 1 h para permitir la absorción de virus antes de diluciones en serie de cualquiera de 2c de mAb o una preparación de IgG polivalente de plasma humano (Intratect®, Biotest AG, Dreieich, Alemania, se añadieron (neutralización después de unión). Para comparar la eficacia de la neutralización antes de unión con respecto a después de unión de 2c de mAb en condiciones experimentales idénticas, 100 TCID₅₀ de VHS-1 F se incubaron durante 1 h a 4 °C con las mismas diluciones de anticuerpo antes de añadirlos a monocapas de células Vero. Las células Vero inoculadas de ambos ensayos se incubaron durante otro periodo de 1 h a 4 °C antes de su transferencia a 37 °C. Las titulaciones de neutralización se determinaron después de 72 h como se ha descrito en el ensayo de neutralización estándar que se ha mencionado anteriormente.

Ensayo de propagación de célula a célula

Las células Vero que crecen en cubreobjetos de vidrio hasta confluencia se inocularon con VHS-1 F a 400 TCID₅₀ por pocillo en 500 µl durante 4 h a 37 °C. El inóculo de virus se aspiró, las células Vero se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron adicionalmente durante 48 h a 37 °C en presencia o ausencia de un exceso de anticuerpos neutralizantes en 1 ml de medio de crecimiento con FBS al 2 %. Los sueros humanos combinados obtenidos a partir de donantes inmunizados con titulaciones elevadas de inmunoglobulinas anti-VHS-1 se usaron como control a una dilución de 1:20, las concentraciones de anticuerpos divalentes 2c de mAb y 2c-F(ab')₂ fueron 500 nM y las del 2c-Fab monovalente 3000 nM. Después de 48 h el medio de cultivo se retiró, las monocapas de células Vero se lavaron dos veces con solución salina tamponada con HEPES, y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Para visualizar, las células de extensión viral se aclararon dos veces con PBS, se incubaron durante 15 minutos en 500 µl de solución salina tamponada con HEPES con Tween 20 al 0,05 % y se tiñeron con suero de cabra-anti-VHS policlonal conjugado con FITC (1:100, BETHYL, Montgomery, TX, USA). Las células teñidas se lavaron tres veces con PBS, se montaron en medio de montaje que contenía 0,2 g/ml de Mowiol 4-88 (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal DM IRE2 de Leica con un aumento de 40 veces. La inhibición de la propagación de célula a célula se sometió a ensayo además de ensayo de neutralización de virus después de la adsorción. Las células Vero que crecían hasta confluencia en placas de seis pocillos se incubaron durante 4 h a 37 °C con 200 TCID₅₀ de VHS-1 F en 3 ml de DMEM que contenía FBS al 2 %, y antibióticos. Las monocapas de células se lavaron dos veces con PBS y se cubrieron con medio de formación de placas caliente (DMEM, agarosa al 5 % (p/v), FBS al 10 %, antibióticos) que contenía un exceso de anticuerpos neutralizantes por sueros neutralizantes de VHS-1 humano policlonal. La formación de placas se analizó mediante microscopía de luz después de incubación durante 48 h a 37 °C.

Cuantificación de ADN

Los genomas de VHS-1 y VHS-2 se cuantificaron realizando en PCR tiempo real (RT). El ADN se purificó a partir de muestras que contenían cantidades equivalentes de partículas infecciosas de VHS-1 y VHS-2 usando el sistema extracción de ácido nucleico automatizado MagNA Pure LC System (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN viral a continuación se cuantificó realizando RT-PCR (Lightcycler, Roche) usando el kit de cuantificación de VHS-1 / VHS-2 RealArt (Qiagen).

Experimentos de protección de ratón

Los ratones (NOD-SCID) inmunodeficientes combinados diabético/severo no obeso en ver a anestesiados (NOD.CB17-Prkdc^{scid} /J, Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld, Alemania), 6-8 semanas de edad, se estimularon por vía intravaginal con 20 µl de inóculo de 1 x 10⁶ TCID₅₀ de VHS-1 F por ratón. El pegamento de piel (Epiglu, Meyer-Haake Medical Innovations, Wehrheim, Alemania) se aplicó sobre la vulva para prevenir la descarga del inóculo de virus. El inóculo administrado indujo tasas de infección > 94 % tal como se

evalúa mediante cultivo de lavado vaginal. Los ratones se examinaron diariamente después de la inoculación viral para pérdida de peso, vulvitis/vaginitis (enrojecimiento, descarga mucopurulenta y signos de inflamación) y enfermedad neurológica. Los ratones que presentaban cualquiera de estos síntomas se sacrificaron inmediatamente. Los ratones se inmunizaron de forma pasiva mediante inyección intravenosa (i.v.) de 2c de mAb purificado ya fuera 24 h antes de la inoculación viral para profilaxis inmune o 24 h, 40 h, y 56 h después de la infección viral para tratamiento terapéutico. Los ratones se evaluaron por infección mediante determinación de titulaciones de virus de irrigaciones vaginales obtenidas los días 1, 2, 4, 6 y 8 después de la infección y en el momento de la muerte usando el ensayo de dilución en el punto final en células Vero. Las cargas virales en órganos (bazo, glándula adrenal, pulmón, corazón, hígado, riñón, médula espinal, y cerebro) de los ratones sacrificados se determinaron después de homogeneización de órganos mediante valoración en monocapas de células Vero como se describe en cualquier parte (41). Cada grupo de ensayo y de control contenía 9-10 animales con infección por VHS-1 detectable.

Resultados

Formación de mapas y análisis del epítipo de gB reconocido por 2c de mAb.

La estructura cristalina recientemente determinada del ectodominio de gB de VHS de tipo 1 (VHS-1) desveló un trímero de múltiples dominios con cinco dominios estructurales distintos: dominio I (base), dominio II (medio), dominio III (núcleo), dominio IV (corona), y dominio V (rama) (24). Para caracterizar el epítipo neutralizante de 2c de mAb, los investigadores sometieron a ensayo su reactividad con gB(730t)(4) recombinante en análisis de transferencia de Western ya fuera en condiciones reductoras o no reductoras. Como controles, los investigadores usaron mAb H1817, que reconoce un epítipo lineal (4) y mAb H126 que reconoce un epítipo discontinuo (33). Un patrón de tinción habitual para un éxito policial se obtuvo con análisis de transferencia de Western con mAb H1817 que nuestra detección de formas monoméricas y triméricas de gB en condiciones no reductoras y una tinción única predominante de monómero de gB en condiciones reductoras (Fig. 13B). Como se esperaba, el mAb H126 reaccionó con gB solamente en condiciones nativas. De forma sorprendente, el reconocimiento únicamente de la banda superior de proteína gB > 170 kDa sugiere que mAb H126 es específico de trímero (Fig. 13B). El mAb 2c reaccionó con gB nativa y desnaturalizada, sin embargo, la reactividad en condiciones desnaturalizantes fue mucho más débil en comparación con mAb H 1817 (Fig. 13B). La reactividad débil con monómeros de gB en condiciones desnaturalizantes se ha informado anteriormente para un conjunto de otros anticuerpos neutralizantes que se unen a epítipo los discontinuos que parece que son resistentes a la desnaturalización o al repliegamiento durante la electroforesis en SDS-PAGE y por lo tanto se denominan epítipo os "pseudocontinuos" (4).

Para identificar el epítipo específico implicado en la unión de 2c de mAb los investigadores usaron péptidos derivados de gB presentados en micromatrices específicas. En primer lugar, la secuencia de gB que presenta los aminoácidos 31 a 505 se preparó mediante Spot-Síntesis como solapamiento de péptidos 13méricos unidos con extremos amino terminales acetilados sin carga a una membrana de celulosa continua con un desplazamiento de 3 aminoácidos. Para evitar el desplazamiento del equilibrio de unión para el anticuerpo que no forma complejo, los barridos de péptido de 2c de mAb se inmovilizaron sobre una membrana de PVDF antes de detección mediante quimioluminiscencia. Como se muestra en la representación esquemática de la gB de longitud completa con dominios funcionales indicados (Fig. 14A), la reactividad de 2c de mAb se limitó a péptidos que abarcaban dos regiones separadas dentro del dominio I, tres partidos consecutivos que comprendían los restos 175 a 193 (región de unión A) y los péptidos de solapamiento que comprendían los restos 295 a 310 (región de unión B). Para validar ambas regiones identificadas, los investigadores usaron un conjunto adicional de péptidos 13méricos purificados inmovilizados en porta objetos de vidrio mediante un conector flexible. En comparación con el tamiz de celulosa la lectura de este barrido de micromatriz mediante fluorescencia confirmó las mismas regiones de unión a epítipo (Fig. 14B). Debido a la aplicación de péptidos purificados y un sistema de barrido de micromatriz de alta resolución los péptidos consecutivos en ambos sitios de unión se reconocieron mediante mAb2c en esta micromatriz peptídica (Fig. 14B).

Los investigadores hicieron mapas de los sitios de unión identificados para 2c de mAb a la estructura de gB resuelta (24). De forma interesante, el péptido ¹⁷²QWFGHRYSQFMG¹⁸⁴ (SEQ ID NO: 18) que muestra reactividad más fuerte con 2c de mAb se solapó con uno de los dos supuestos bucles de fusión (bucle de fusión 1 ¹⁷³VWFGHRY¹⁷⁹) (SEQ ID NO: 19) situado en un subdominio curvado del dominio I (22) (Fig. 15). Sin embargo, la localización del sitio de unión A en la base del trímero de gB hace que sea inaccesible para 2c de mAb en la estructura de gB disponible representando de la manera más probable la conformación después de la fusión (24). Los restos del sitio de unión B se exponen y se sitúan en la parte superior del dominio I (Fig. 15).

Para evaluar adicionalmente el epítipo dependiente de la conformación de 2c de mAb, las secuencias consenso de ambas fracciones de unión se conectaron en diversas combinaciones como dúotopos ya fuera directamente o por separado con uno o dos espaciadores de β-alanina (Fig. 16). Recientemente se ha mostrado que las inserciones del conector en proximidad cercana al bucle de fusión 1 después del resto E₁₈₇ dan como resultado mutantes de gB con deficiencia de fusión (40, 61), aunque gB seguía traen una conformación posterior a la fusión (61). Por lo tanto, los investigadores incluyeron, además del motivo consenso ¹⁷⁹YSQFMG¹⁸⁴ (SEQ ID NO: 20) de la región de unión A, el motivo ¹⁸⁶FED¹⁸⁸ de la región de unión A en barridos de dúotopo separados. En comparación con el péptido

¹⁷²QWFGHRYSQFMG₁₈₄ (SEQ ID NO: 18) que presenta la reactividad de unión más fuerte con 2c de mAb en los barridos de péptidos 13méricos (Fig. 16), la combinación de ambos motivos del sitio de unión A con el péptido consenso ³⁰⁰FYGYRE₃₀₅ (SEQ ID NO: 21) del sitio de unión B dio como resultado dos duótopos con un aumento de las intensidades de la señal (Fig. 16., conjuntos de duótopo I y II). Mientras que la resistencia a la unión de 2c de mAb al duótopo ¹⁷⁹YSQFMG₁₈₄-βA-³⁰⁰FYGYRE₃₀₅ (SEQ ID NO: 22) solo aumentó ligeramente, una casi saturación de la intensidad de la señal de fluorescencia se obtuvo con el duótopo ¹⁸⁶FED₁₈₈-βA-βA-³⁰⁰FYGYRE₃₀₅ (SEQ ID NO: 23).

Por lo tanto, los resultados de las micromatrices peptídica se corresponden a los resultados de transferencia de Western y demuestran que 2c de mAb reconoce un epítipo dependiente de la conformación. Para evitar la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular, 2c de mAb se debería unir a la conformación de fusión previa de gB. Sin embargo, el epítipo neutralizante de 2c de mAb forma mapas solamente en parte con la superficie de la conformación de gB presente en la estructura cristalina de gB disponible (24) e indica que gB podría adoptar conformaciones distintas durante la entrada.

Caracterización de anticuerpos divalentes y monovalentes derivados de 2c de mAb

Varios investigadores han usado anticuerpos monoclonales para identificar regiones en gB esenciales para su función en la entrada del virus (4, 25, 39, 52). Se ha sugerido que los anticuerpos neutralizantes, de los que se han formado mapas para una región funcional única en la base del trímero de gB que comprende restos del extremo C-terminal del dominio V y restos del dominio I de un protómero próximo, interfieren con la actividad fusogénica de gB (4). Por lo tanto, los investigadores han hecho la hipótesis de que el anticuerpo monovalente que se une al epítipo de 2c de mAb dentro del dominio I cercano al extremo C terminal del dominio V podrían bloquear de forma suficiente los cambios conformacional es cooperativos después de la activación de gB. Dado que 2c de mAb neutraliza VHS-1 sin complemento *in vitro* (16), los investigadores generaron fragmentos de F(ab')₂ y Fab convencionales y una variable de fragmento de una sola cadena recombinante (scFv) como herramientas valiosas para estudiar el mecanismo de que se hace la hipótesis mediado por 2c de mAb. La homogeneidad de las frases de anticuerpo generadas se controlaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (los datos no se muestran). El análisis de citometría de flujo usando células Vero ya fueran infectadas son infectadas con VHS-1 o VHS-2, respectivamente, demostró unión específica de fragmentos de anticuerpos derivados de 2c de mAb y 2c de mAb (los datos no se muestran). Los investigadores usaron citometría de fluorescencia para determinar las curvas equilibrio unión de los anticuerpos para células Vero infectadas con VHS-1 y VHS-2 (Fig. 17). Los resultados de estos estudios demostraron afinidades aparentes más elevadas para la IgG completa y el fragmento de F(ab')₂ que para dar los fragmentos Fab y scFv, respectivamente (Tabla 6). El incremento de la unidad funcional (avidez) hacia los anticuerpos divalentes con respecto a las afinidades determinadas de los anticuerpos monovalentes indica que los anticuerpos divalentes eran capaces de unirse a dos epítipo se gB en la superficie celular de forma simultánea. Los 2c de mAb y 2c-F(ab')₂ divalentes mostraron una afinidad aparente más elevada en 1,7-2,8 veces en comparación con sus homólogos monovalentes.

El ligero incremento en la aparente K_D del fragmento F(ab')₂ con respecto a la IgG se podría deber a la flexibilidad más elevada de los sitios de unión a antígeno dentro de la construcción de F(ab')₂. Las afinidades aparentes similares para 2c de mAb. 2c-F(ab')₂, y 2c-Fab a células Vero infectadas tanto con VHS-1 como con VHS-2 confirmó que el epítipo de gB reconocido no se diferencia estructuralmente entre ambos virus (Tabla 6).

Tabla 6: Constantes de equilibrio aparentes de 2c de mAb y fragmentos de anticuerpo derivados para unión a células Vero infectadas con VHS-1 F o VHS-2 G.

^a K _D (nM)	IgG	F(ab') ₂	Fab	scFv
	divalente		monovalente	
VHS-1 F	10,2	6,9	17,3	19,2
VHS-2 G	10,7	8,8	17,7	n.d.

^a Los valores de K_D para unión a gB en células infectadas con VHS se determinaron mediante ajustes de los datos a partir de las curvas de equilibrio-unión determinadas mediante citometría de flujo (Fig. 17) con respecto a la ecuación de Marquardt-Levenberg.

Actividad de neutralización de anticuerpos monovalentes y divalentes *in vitro*

Una eficacia de neutralización igual de 2c de mAb independientemente de si se añadía anticuerpo antes (antes de la unión) o después (después de la unión) de viriones de VHS-1 que interactúan con células Vero (Fig. 18A) indicó que 2c de mAb no interfiere con la unión del virus a células diana. Por el contrario, la gamma globulina humana policlonal

Intratect® se neutralizó claramente por inhibición de unión de virión a células diana (Fig. 18B). Las actividades neutralizantes de fragmentos F(ab')₂, Fab y scFv derivados de 2c de mAb se compararon con homólogo de IgG precursor en un ensayo de neutralización estándar en células Vero. El 2c de mAb precursor redujo el efecto citopático inducido por VHS-1 (CPE) en un 100 % a una concentración de 8 nM. De forma interesante, una concentración de 2c de mAb de más de 4 veces se requirió para reducir completamente el CPE inducido por VHS-2 (Fig. 19A). El 2c-F(ab')₂ divalente redujo el CPE inducido tanto por VHS-1 como por VHS-2 dos veces más eficazmente que el 2c de mAb precursor. De forma sorprendente, los investigadores observaron una diferencia fundamental en la capacidad de los fragmentos de anticuerpo 2c monovalente para neutralizar VHS-1 y VHS-2. En comparación con el 2c de mAb precursor, fueron necesarias concentraciones más elevadas aprox. 375 veces y 94 veces de 2c-Fab para reducir el CPE inducido por VHS-1 y VHS-2 en un 100 %, respectivamente (Fig. 19A). El 2c-scFv recombinante mostró un efecto reductor de placa con el microscopio de luz, pero no fue capaz de reducir el CPE inducido por VHS en un 100 % incluso a la concentración sometida a ensayo más elevada de 3.000 nM (los datos no se muestran).

Dado que tanto los anticuerpos divalentes 2c de mAb como 2c-F(ab')₂ neutralizaron VHS-2 aproximadamente cuatro veces menos eficazmente que VHS-1 (Fig. 19A), los investigadores analizaron los números de copias del genoma de VHS-1 y VHS-2 que contenían cantidades iguales de partículas infecciosas mediante PCR cuantitativa en tiempo real. En comparación con VHS-1, se encontró un número cuatro veces mayor de equivalentes genómicos para VHS-2 (los datos no se muestran) que se correlacionan bien con la mayor titulación de anticuerpos de 2c de mAb y 2c-F(ab')₂ requerido para la neutralización de VHS-2.

Los ensayos de neutralización como se muestra en la Fig. 19A indicaron una fuerte correlación entre la valencia del anticuerpo y la eficiencia de neutralización. En consecuencia, los investigadores investigaron si la capacidad de los fragmentos 2c-Fab para eliminar la infección por el virus podría restablecerse mediante el enlace cruzado de los fragmentos Fab. El ensayo de neutralización del virus se repitió para 2c-Fab en la ausencia o presencia de IgG que reaccionan con fragmentos Fab murinos. Como se muestra en la Fig. 19B, la reticulación de 2c-Fab incrementó de forma drástica la actividad neutralizante pero no pudo restaurarla a la misma eficacia que para el 2c de mAb precursor. Las IgG contra Fab murinas son las no mostraron ningún efecto sobre la neutralización del virus (los datos no se muestran).

Inhibición de la propagación de célula a célula

Aunque los fragmentos 2c-Fab no neutralizaron de forma eficaz los viriones libres, se informó que los fragmentos de anticuerpos de tamaño pequeño tienen propiedades de difusión más favorables (66), los investigadores investigaron su actividad para evitar que el VHS-1 cruzara las uniones celulares de las células infectadas a las no infectadas. Ambos anticuerpos divalentes, 2c de mAb y 2c-F(ab')₂, anularon completamente la propagación del VHS-1 en monocapas de células Vero y solo las células infectadas únicas se pudieron visualizar mediante inmunofluorescencia indirecta (Fig. 9). A pesar de la capacidad del suero humano policlonal para neutralizar los viriones libres, no logró inhibir la propagación viral de la célula a célula. Es muy probable que este sea el resultado de la población heterogénea de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra numerosos epítomos de VHS. En comparación con el suero inmune humano policlonal, el fragmento monovalente 2c-Fab fue capaz de controlar la propagación de célula a célula en cierta medida. Sin embargo, en contraste con sus homólogos divalentes, el fragmento monovalente 2c-Fab no fue capaz de anular completamente la propagación viral incluso sometida a ensayo a una concentración 6 veces mayor (Fig. 9). Por lo tanto, la valencia del anticuerpo desempeñó un papel fundamental también en la inhibición de la propagación del VHS-1 entre células adyacentes.

Inmunoprotección de ratones inmunodeficientes contra la infección por VHS diseminada

Los investigadores mostraron previamente que los ratones con agotamiento de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ estaban completamente protegidos de la encefalitis letal por transferencia pasiva de 2c de mAb después de la infección por VHS-1 intravaginal (17). Los linfocitos citolíticos naturales (NK) que se acumulan en el sitio de la infección por VHS-2 en seres humanos (28) son la fuente inicial de interferón-γ (45), que desempeña un papel esencial para el control de la infección por VHS (2, 45, 62). Más recientemente, se ha demostrado por primera vez que los linfocitos NK humanos median la protección contra la infección genital primaria por VHS en ratones humanizados como una respuesta inmune innata (37). Para investigar, si 2c de mAb confiere actividad antiviral independientemente de la respuesta inmunológica mediada por un anticuerpo, los investigadores usaron un modelo de ratón NOD/SCID, que además de la deficiencia de linfocitos T y B de SCID, carecen de linfocitos NK y función de macrófagos y la capacidad para estimular la vía del complemento. La infección por VHS-1 intravaginal (1 x 10⁶ TCID₅₀) de ratones NOD/SCID dio como resultado una enfermedad sistémica progresiva rápida con un tiempo de supervivencia promedio de 9 días. Las titulaciones de VHS en órganos se determinaron mediante un ensayo de dilución de punto final que muestra altas titulaciones virales en la médula espinal (2,3 x 10⁶ TCID₅₀), cerebro (3,8 x 10⁵ TCID₅₀), y vaginal mucosa (1,4 x 10⁶ TCID₅₀), titulaciones moderadas en riñón (1,7 x 10⁴ TCID₅₀) y glándulas adrenales (1,1 x 10⁴ TCID₅₀) y titulaciones bajas en pulmón (1,1 x 10³ TCID₅₀) y corazón (1,9 x 10² TCID₅₀) (los datos no se muestran). Para evaluar la eficacia terapéutica de 2c de mAb, los ratones NOD/SCID se trataron por vía intravenosa con 2,5 mg/kg, 5 mg/kg o 15 mg/kg de anticuerpo 24 h antes de la estimulación intravaginal de VHS-1 (Fig. 20). Los ratones que recibieron dosis bajas de anticuerpos no estaban completamente protegidos contra la

infección letal por VHS-1. Sin embargo, los tiempos medios de supervivencia de los ratones tratados con 5 mg/kg de 2c de mAb fueron 2,6 veces más prolongados cuando se compararon con los ratones control que recibieron PBS. Las titulaciones de VHS-1 en los órganos investigados de ratones no protegidos contra la encefalitis letal fueron comparables al grupo de control no tratado. Por el contrario, la protección total de los animales se siguió a una dosis de 15 mg/kg de 2c de mAb. Las titulaciones virales y los órganos de ratones protegidos por el anticuerpo estaban por debajo del límite de detección de 1×10^4 TCID₅₀.

A continuación los investigadores evaluaron si la inmunización después de la exposición con 2c de mAb también confiere protección contra la diseminación viral y la encefalitis letal en presencia de una infección periférica por VHS establecida. Los ratones NOD/SCID con una titulación elevada de VHS-1 en irrigaciones vaginales a las 24 h después de la exposición viral se seleccionaron repetidamente a las 24 h, 40 h y 56 h por vía intravenosa con 15 mg/kg de 2c de mAb (Fig. 11 y Fig. 21). El grupo de control tratado con PBS mostró una eliminación constante del virus por la vagina hasta que los ratones con síntomas neurológicos tuvieron que ser sacrificados entre el día 7 y el día 9. Por el contrario, 2c de mAb eliminó la infección por VHS-1 establecida el día 8 y evitó completamente el resultado letal de la infección ($3 \times 300 \mu\text{g}$; $P = 0,0003$ en comparación con PBS). Además, no se detectaron viriones en las neuronas sensoriales ni en los órganos respectivos de los animales tratados con 2c de mAb un mes después de la infección (los datos no se muestran).

Discusión

Siguiendo las etapas que toman los virus para entrar en las células diana, los mAbs neutralizantes de virus pueden inhibir la entrada mediante varios mecanismos. La interacción específica de proteínas de la superficie viral con proteínas celulares, lípidos o carbohidratos representa la etapa inicial de la infección, que puede ser bloqueada por anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos que inhiben la unión del virus se unen directamente al sitio de unión del receptor del virión, tal como el mAb F105 que reacciona con el sitio de unión a CD4 de VIH-1 gp120 y Fab HC19 que cubre el sitio de unión al receptor de la hemaglutinina de la gripe (HA) (6, 19, 54), o interfieren estéricamente con el acoplamiento del receptor, como la unión de Fab HC45 en 17A la proximidad al sitio de unión al receptor de HA (18). Además de la unión esencial de gD de VHS a uno de sus receptores celulares, gB desempeña un papel en la unión del virión a las células diana. Recientemente, se ha descrito la existencia de dos receptores de superficie celular verdaderos independientes de proteoglicano de sulfato de heparán y/o factores de unión para VHS gB (5, 23, 60). El receptor de tipo 2 similar a inmunoglobulina emparejado (PILR α) se ha caracterizado como un posible receptor de proteína de gB al menos en ciertos tipos de células (60). Para 2c de mAb, los ensayos comparativos de neutralización previos y posteriores al acoplamiento mostraron que el anticuerpo no puede inhibir la unión del virus a la superficie celular, sino que bloquea la entrada viral. Se ha demostrado anteriormente que la interacción de las membranas lipídicas de gB con los restos hidrófobos e hidrófilos fundamentales de su dominio de fusión (22, 23) se puede bloquear por los mAbs que reconocen epítopos muy cerca de los bucles de fusión (4, 22). Debido a que el epítipo conformacional de 2c de mAb se superpone parcialmente con el bucle de fusión 1, los investigadores razonan que la unión de 2c de mAb interfiere con la transmisión más probable de la señal fusogénica y evalúan la neutralización en la etapa posterior a la unión/previa a la fusión como modo posible de acción.

El reordenamiento estructural desencadenado es una característica fundamental de las glicoproteínas fusogénicas virales, que da como resultado distintas conformaciones de fusión previa inclusión posterior. Se han hecho mapas de los epítopos de diferentes mAb neutralizantes a lo largo de los dominios laterales de los picos y en la punta de la corona de la estructura cristalina gB (4, 24). El epítipo de 2c de mAb se asigna a una región funcional única (FR1) en la base del trímero gB que consiste en restos dentro de la hélice C-terminal αF del dominio V y restos dentro del dominio I de un protómero próximo (4). El modelo de homología de los investigadores muestra que una parte del epítipo discontinuo (F₃₀₀ a E₃₀₅) reconocido por 2c de mAb se localiza en la sección superior del dominio I de gB, que tiene características de un dominio de homología de pleckstrina (PH) (7, 38). Sin embargo, la otra parte del epítipo (F₁₇₅ a A₁₉₀) que también se encuentra en el dominio I, está enterrada y sería inaccesible a la unión de 2c de mAb a menos que gB sufra un cambio conformacional importante. Por lo tanto, los investigadores plantean la hipótesis de que 2c de mAb impide la transición de gB preferentemente en la conformación de fusión previa. Sobre la base de la localización del epítipo de 2c de mAb y la suposición de que los cambios conformacionales después de la activación son cooperativos, los investigadores razonan que la interacción monovalente de 2c de mAb sería suficiente para bloquear la yuxtaposición del dominio fusogénico de gB y la membrana celular. De forma sorprendente, sin embargo, ninguno de los fragmentos de anticuerpos monovalentes generados (Fab y scFv) fue capaz de neutralizar de manera eficaz los viriones libres o de inhibir la propagación viral de célula a célula. Por el contrario, ambas moléculas divalentes, 2c de mAb y 2c-F(ab')₂, fueron altamente eficaces para la neutralización del virus e inhibición de la propagación de célula a célula. La retención de la actividad de unión específica y comparable de todos los anticuerpos derivados de 2c de mAb en este estudio excluye las diferencias funcionales de los anticuerpos monovalentes y divalentes debido al deterioro del reconocimiento del antígeno. La unión multivalente de las inmunoglobulinas aumenta su afinidad funcional (26). Sin embargo, la ganancia en la afinidad funcional se correlaciona inversamente con la afinidad intrínseca del sitio de unión del anticuerpo (49). El único aumento moderado de las constantes en equilibrio entre 1,7 y 2,8 para los anticuerpos divalentes 2c, IgG y F(ab')₂ cuando se comparan con sus homólogos monovalentes, scFv y Fab, no es inusual para los anticuerpos con afinidades intrínsecas en el rango nanomolar bajo. Por lo tanto, la afinidad aparente más elevada de hecho indica que se produce una unión multivalente (mayor avidéz) al antígeno gB y sugiere que la actividad antiviral de 2c de mAb y 2c-

F(ab')₂ es una consecuencia de la reticulación de gB. La eficacia de neutralización inferior de los anticuerpos monovalentes con respecto a los anticuerpos divalentes o multivalentes con especificidad para el antígeno gH del virus de la varicela zóster (VZV) se ha discutido como una cuestión de impedimento estérico debido a los diferentes tamaños de estos anticuerpos (15). Aunque los investigadores no pueden excluir completamente esta posibilidad como posible mecanismo de neutralización adicional para las variantes de 2c de mAb, esto parece poco probable debido a que no se observó una correlación directa entre el tamaño del anticuerpo, la eficacia de neutralización y la inhibición de la propagación de célula a célula. Además, nuestros datos muestran que el 2c-F(ab')₂ más pequeño tenía una actividad de neutralización del virus aún mejor que el 2c-IgG más grande. Por lo tanto, las observaciones actuales indican que la reticulación de gB es el mecanismo clave para la actividad antiviral de 2c de mAb y sugiere que la estabilización de la conformación de la fusión previa de gB a través de la inmovilización de los trímeros de gB inhibe la activación de la señal fusogénica. Un estudio más reciente de Silverman *et al.* (61) propuso que un fenotipo deficiente en la fusión del ectodominio de gB del VHS-1 después de la inserción de cinco aminoácidos después del resto E₁₈₇ cerca del bucle de fusión 1 puede no resultar de la interferencia con cambios conformacionales de gB sino de la interferencia con otras funciones de gB mecanísticas. En el dútopo de los investigadores, los barridos de 2c de mAb reaccionaron con el dútopo del sitio de unión más fuerte A/B₁₈₆FED₁₈₈-βA-βA₃₀₀FYGYRE₃₀₅ (SEQ ID NO: 23) que cubre el sitio de inserción en particular E₁₈₇, que parece ser fundamental para la función de gB. Por lo tanto, es tentador especular que la reticulación de 2c de mAb altera la capacidad de gB para interactuar con los otros componentes de la maquinaria de fusión del VHS. Sin embargo, es necesaria una investigación futura, ya que los resultados de los investigadores no permiten distinguir si la reticulación bloquea el cambio conformacional de la propia gB o bloquea la interacción entre gB, gD y gH/gL, que se produce durante la fusión celular (3) y es esencial para completar el proceso de fusión (65). La conformación de gB de VHS-1 observada en los cristales resueltos (24) sugiere representar la forma posterior a la fusión y aún no se ha caracterizado un modelo de fusión previa de gB. Por lo tanto, los estudios cristalográficos de rayos X de 2c de mAb o su F(ab')₂ en complejo con gB podrían proporcionar información sobre la conformación nativa de gB y una mejor comprensión de la transmisión de la señal fusogénica.

Los estudios que evalúan la eficacia protectora de los anticuerpos anti-gD y anti-gB aplicados por vía tópica para prevenir la transmisión vaginal de la infección por VHS-2 en ratones demostraron la viabilidad de los anticuerpos recombinantes diseñados como nuevos microbicidas vaginales (67-69). Las infecciones severas e incluso mortales por VHS se pueden producir en recién nacidos con infección materna, en pacientes con infecciones oculares recurrentes, o en pacientes gravemente inmunocomprometidos. Para investigar si la aplicación sistémica del anticuerpo anti-gB de los investigadores confiere protección también en un entorno *in vivo* altamente inmunodeficiente, los investigadores usaron un modelo de ratón NOD/SCID. Los investigadores usaron inoculación intravaginal con VHS-1 como una ruta establecida de infección ganglionar con la propagación axonal del virus que causa la parálisis de las extremidades posteriores y la encefalitis herpética mortal en ratones inmunocompetentes, así como en ratones con agotamiento de linfocitos T (16, 17). Aquí los investigadores demuestran que 2c de mAb no solo protege completamente a los ratones NOD/SCID en la fase aguda de la infección primaria por VHS-1, sino que también es eficaz para prevenir completamente la enfermedad neurológica y la muerte, incluso después de que haya comenzado la propagación del virus periférico. La propagación del VHS de célula a célula es una forma muy eficaz de transferencia viral a través de sinapsis neuronales y uniones estrechas, así como para sortear las barreras inmunológicas del sistema inmunitario adaptativo. El mAb 2c tanto disminuye la expresión del virus de los tejidos vaginales infectados como inhibe la propagación axonal del VHS. Otros informes mostraron que la administración de las IgG anti-VHS después de la exposición viral puede reducir la cantidad de infecciones ganglionares agudas en animales (16, 42). De forma coherente, se demostró que la IgG anti-gD humana recombinante administrada por vía intraperitoneal a ratones con infección por VHS-1 corneal se localiza en las fibras nerviosas infectadas con VHS y las neuronas sensoriales (59). Además, la inmunización pasiva de animales inmunocompetentes con mAbs específicos para VHS gD, gC o gB administrada después de la exposición en momentos apropiados demostró protección contra la enfermedad neurológica inducida por VHS (13, 16). Sin embargo, de varios estudios en animales también se ha llegado a la conclusión de que la inmunidad humoral por sí sola no es eficaz en el control de las infecciones por VHS.

La potencia protectora *in vivo* del anticuerpo de los investigadores es independiente de las funciones efectoras inmunes. También se ha concluido a partir de varios estudios en animales en la bibliografía que la inmunidad humoral sola no es eficaz en el control de las infecciones por VHS. De acuerdo con este punto de vista, se ha informado que la administración de suero hiperinmune anti-VHS-1 es ineficaz para la protección de ratones inmunodeprimidos o inmunodeficientes (47, 48, 50, 51, 56). El tratamiento sistémico de ratones atímicos desnudos 24 h después de la infección por VHS-1 con un mAb anti-gD humano prolongó la supervivencia en comparación con los controles no tratados, pero no impidió la muerte (58). Otro estudio mostró en un modelo de ratón queratitis estromal inducida por VHS-1, que un mAb anti-gD previno la muerte de ratones con agotamiento de linfocitos CD4T⁺ o CD8⁺ pero no pudo prevenir la muerte cuando los ratones presentaban agotamiento en ambos subconjuntos de linfocitos T de forma simultánea (64).

Para el conocimiento de los investigadores, por primera vez demostraron la eficacia protectora de un mAb de reticulación anti-gB aplicado por vía sistémica que previene la propagación de VHS-1 neuronal completamente independientemente de los mecanismos y el complemento de los efectos celulares. La especificidad de 2c de mAb para un epítipo común de gB que es esencial para la replicación de VHS y su alta eficacia protectora sin el requisito de reclutar funciones adicionales de efector inmune indica un gran potencial para este anticuerpo como un nuevo

agente inmunoterapéutico.

Listado de referencias para el Ejemplo 3

- 5 1. Arndt, M. A., J. Krauss, R. Schwarzenbacher, B. K. Vu, S. Greene, y S. M. Rybak. 2003. Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 107: 822-829.
2. Ashkar, A. A., y K. L. Rosenthal. 2003. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 77: 10168-10171.
- 10 3. Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, T. M. Cairns, B. Reilly, G. H. Cohen, y R. J. Eisenberg. 2007. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18718-18723.
4. Bender, F. C., M. Samanta, E. E. Heldwein, M. P. de Leon, E. Bilman, H. Lou, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, y G. H. Cohen. 2007. Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions. *J Virol* 81: 3827-3841.
- 15 5. Bender, F. C., J. C. Whitbeck, H. Lou, G. H. Cohen, y R. J. Eisenberg. 2005. Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol* 79: 11588-11597.
6. Bizebard, T., B. Gigant, P. Rigolet, B. Rasmussen, O. Diat, P. Bosecke, S. A. Wharton, J. J. Skehel, y M. Knossow. 1995. Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* 376: 92-94.
- 20 7. Blomberg, N. E. Baraldi, M. Nilges, y M. Saraste. 1999. The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem Sci* 24: 441-445.
8. Brown, Z. A., J. Benedetti, R. Ashley, S. Burchett, S. Selke, S. Berry, L. A. Vontver, y L. Corey. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N Engl J Med* 324: 1247-1252.
- 25 9. Burbelo, P. D., Y. Hoshino, H. Leahy, T. Krogmann, R. L. Hornung, M. J. Iadarola, y J. I. Cohen. 2009. Serological diagnosis of human herpes simplex virus type 1 and 2 infections by luciferase immunoprecipitation system assay. *Clin Vaccine Immunol* 16: 366-371.
- 30 10. Carter, C., S. Savic, J. Cole, y P. Wood. 2007. Natural killer cell receptor expression in patients with severe and recurrent Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infections. *Cell Immunol* 246: 65-74.
11. Cook, M. L., y J. G. Stevens. 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun* 7: 272-288.
- 35 12. Cunningham, A. L., R. R. Turner, A. C. Miller, M. F. Para, y T. C. Merigan. 1985. Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *J Clin Invest* 75: 226-233.
13. Dix, R. D., L. Pereira, y J. R. Baringer. 1981. Use of monoclonal antibody directed against herpes simplex virus glycoproteins to protect mice against acute virus-induced neurological disease. *Infect Immun* 34: 192-199.
14. Donaghy, H., L. Bosnjak, A.N. Harman, V. Marsden, S. K. Tying, T. C. Meng, y A. L. Cunningham. 2009. Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *J Virol* 83: 1952-1961.
- 40 15. Drew, P. D., M. T. Moss, T. J. Pasieka, C. Grose, W. J. Harris, y A. J. Porter. 2001. Multimeric humanized varicella-zoster virus antibody fragments to gH neutralize virus while monomeric fragments do not. *J Gen Virol* 82: 1959-1963.
16. Eis-Hübinger, A. M., K. Mohr, y K. E. Schneweis. 1991. Different mechanisms of protection by monoclonal and polyclonal antibodies during the course of herpes simplex virus infection. *Intervirology* 32: 351-360.
- 45 17. Eis-Hübinger, A. M., D. S. Schmidt, y K. E. Schneweis. 1993. Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes. *J Gen Virol* 74 (Pt 3): 379-385.
18. Fleury, D., B. Barrere, T. Bizebard, R. S. Daniels, J. J. Skehel, y M. Knossow. 1999. A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site. *Nat Struct Biol* 6: 530-534.
- 50 19. Fleury, D., S. A. Wharton, J. J. Skehel, M. Knossow, y T. Bizebard. 1998. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol* 5: 119-123.
20. Frank, R., y H. Overwin. 1996. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 66: 149-169.
- 55 21. Grubor-Bauk, B., A. Simmons, G. Mayrhofer, y P. G. Speck. 2003. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NK T cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 170: 1430-1434.
22. Hannah, B. P., T. M. Cairns, F. C. Bender, J. C. Whitbeck, H. Lou, R. J. Eisenberg, y G. H. Cohen. 2009. Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J Virol* 83: 6825-6836.
- 60 23. Hannah, B. P., E. E. Heldwein, F. C. Bender, G. H. Cohen, y R. J. Eisenberg. 2007. Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* 81: 4858-4865.
24. Heldwein, E. E., H. Lou, F. C. Bender, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, y S. C. Harrison. 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313: 217-220.
- 65 25. Highlander, S. L., W. H. Cai, S. Person, M. Levine, y J. C. Glorioso. 1988. Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *J Virol* 62: 1881-1888.

26. Kaufman, E.N., y R. K. Jain. 1992. Effect of bivalent interaction upon apparent antibody affinity: experimental confirmation of theory using fluorescence photobleaching and implications for antibody binding assays. *Cancer Res* 52: 4157-4167.
27. Kipriyanov, S. M., O. A. Kupriyanova, M. Little, y G. Moldenhauer. 1996. Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell- surface antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 196: 51-62.
- 5 28. Koelle, D. M., C. M. Posavad, G. R. Barnum, M. L. Johnson, J. M. Frank, y L. Corey. 1998. Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 101: 1500-1508.
29. Kohl, S. 1991 . Role of antibody-dependent cellular cytotoxicity in defense against herpes simplex virus infections. *Rev Infect Dis* 13: 108-1 14.
- 10 30. Kohl, S., D. L. Cahall, D. L. Walters, y V. E. Schaffner. 1979. Murine antibody-dependent cellular cytotoxicity to herpes simplex virus-infected target cells. *J Immunol* 123: 25-30.
31. Kohl, S., N. C. Strynadka, R. S. Hodges, y L. Pereira. 1990. Analysis of the role of antibody-dependent cellular cytotoxic antibody activity in murine neonatal herpes simplex virus infection with antibodies to synthetic peptides of glycoprotein D and monoclonal antibodies to glycoprotein B. *J Clin Invest* 86: 273-278.
- 15 32. Kohl, S., M. S. West, C. G. Prober, W. M. Sullender, L. S. Loo, y A. M. Arvin. 1989. Neonatal antibody-dependent cellular cytotoxic antibody levels are associated with the clinical presentation of neonatal herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 160: 770-776.
33. Kousoulas, K. G., B. Huo, y L. Pereira. 1988. Antibody-resistant mutations in cross-reactive and type-specific epitopes of herpes simplex virus 1 glycoprotein B map in separate domains. *Virology* 166: 423-431.
- 20 34. Kramer, A., y J. Schneider-Mergener. 1998. Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods Mol Biol* 87: 25-39.
35. Krummenacher, C , V. M. Supekari, J. C. Whitbeck, E. Lazear, S. A. Connolly, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, D. C. Wiley, y A. Carfi. 2005. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO J* 24: 4144-4153.
- 25 36. Kuhn, J. E., G. Dunkler, K. Munk, y R. W. Braun. 1987. Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. *J Med Virol* 23: 135-1 50.
37. Kwant-Mitchell, A., A. A. Ashkar, y K. L. Rosenthal. 2009. Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J Virol* 83: 10664-10676.
- 30 38. Lemmon, M. A., y K. M. Ferguson. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350 Pt 1: 1-18.
39. Li, W., T. J. Minova-Foster, D. D. Norton, y M. I. Muggeridge. 2006. Identification of functional domains in herpes simplex virus 2 glycoprotein B. *J Virol* 80: 3792-3800.
- 40 40. Lin, E., y P. G. Spear. 2007. Random linker-insertion mutagenesis to identify functional domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13140-13145.
- 35 41. Lingen, M., F. Hengerer, y D. Falke. 1997. Mixed vaginal infections of Balb/c mice with low virulent herpes simplex type 1 strains result in restoration of virulence properties: vaginitis/vulvitis and neuroinvasiveness. *Med Microbiol Immunol* 185: 217-222.
42. McKendall, R. R., T. Klassen, y J. R. Baringer. 1979. Host defenses in herpes simplex infections of the nervous system: effect of antibody on disease and viral spread. *Infect Immun* 23: 305-311.
- 40 43. Mester, J. C , J. C. Glorioso, y B. T. Rouse. 1991 . Protection against zosteriform spread of herpes simplex virus by monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 163: 263-269.
44. Mikloska, Z., A. M. Kesson, M. E. Penfold, y A. L. Cunningham. 1996. Herpes simplex virus protein targets for CD4 and CD8 lymphocyte cytotoxicity in cultured epidermal keratinocytes treated with interferon-gamma. *J Infect Dis* 173:7-17.
- 45 45. Milligan, G. N, y D. I. Bernstein. 1997. Interferon-gamma enhances resolution of herpes simplex virus type 2 infection of the murine genital tract. *Virology* 229: 259-268.
46. Milligan, G.N., D. I. Bernstein, y N. Bourne. 1998. T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J Immunol* 160: 6093-6100.
- 50 47. Minagawa, H., S. Sakuma. S. Mohri.. R. Mori, y T. Watanabe. 1988. Herpes simplex virus type 1 infection in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Arch Virol* 103: 73-82.
48. Nagafuchi. S., H. Oda, R. Mori, y T. Taniguchi. 1979. Mechanism of acquired resistance to herpes simplex virus infection as studied in nude mice. *J Gen Virol* 44: 715-723.
- 55 49. Nielsen, U. B., G. P. Adams, L. M. Weiner, y J. D. Marks. 2000. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* 60: 6434-6440.
50. Oakes, J. E. 1975. Invasion of the central nervous system by herpes simplex virus type 1 after subcutaneous inoculation of immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 131 : 51-57.
51. Oakes, J. E. 1975. Role for cell-mediated immunity in the resistance of mice to subcutaneous herpes simplex virus infection. *Infect Immun* 12: 166-172.
- 60 52. Pereira, L., M. Ali, K. Kousoulas, B. Huo, y T. Banks. 1989. Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: neutralizing epitopes map in regions of continuous y discontinuous residues. *Virology* 172: 1 1-24.
53. Pereira, L., T. Klassen, y J. R. Baringer. 1980. Type-common and type-specific monoclonal antibody to herpes simplex virus type 1. *Infect Immun* 29: 724-732.
- 65 54. Posner, M. R., T. Hideshima, T. Cannon, M. Mukherjee, K. H. Mayer, y R. A. Byrn. 1991. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunol*

146: 4325-4332.

55. Qadri, I., C. Gimeno, D. Navarro, y L. Pereira. 1991. Mutations in conformation-dependent domains of herpes simplex virus 1 glycoprotein B affect the antigenic properties, dimerization, and transport of the molecule. *Virology* 180: 135-152.

56. Rager-Zisman, B., y A. C. Allison. 1976. Mechanism of immunologic resistance to herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection. *J Immunol* 116: 35-40.

57. Reed, J. L., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497.

58. Sanna, P. P., A. De Logu, R. A. Williamson, Y. L. Horn, S. E. Straus, F. E. Bloom, y D. R. Burton. 1996. Protection of nude mice by passive immunization with a type-common human recombinant monoclonal antibody against HSV. *Virology* 215: 101-106.

59. Sanna, P. P., T. J. Deerinck, y M. H. Ellisman. 1999. Localization of a passively transferred human recombinant monoclonal antibody to herpes simplex virus glycoprotein D to infected nerve fibers and sensory neurons in vivo. *J Virol* 73: 8817-8823.

60. Satoh, T., J. Arai, T. Suenaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P. G. Spear, L. L. Lanier, y H. Arase. 2008. PILRALpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132: 935-944.

61. Silverman, J. L., S. Sharma, T. M. Cairns, y E. E. Heldwein. 2010. Fusion-deficient insertion mutants of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B adopt the trimeric postfusion conformation. *J Virol* 84: 2001-2012.

62. Smith, P. M., R. M. Wolcott, R. Chervenak, y S. R. Jennings. 1994. Control of acute cutaneous herpes simplex virus infection: T cell-mediated viral clearance is dependent upon interferon-gamma (IFN-gamma). *Virology* 202: 76-88.

63. Spear, P. G., y R. Longnecker. 2003. Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77: 10179-10185.

64. Staats, H. F., J. E. Oakes, y R.N. Lausch. 1991. Anti-glycoprotein D monoclonal antibody protects against herpes simplex virus type 1-induced diseases in mice functionally depleted of selected T-cell subsets or asialo GM1+ cells. *J Virol* 65: 6008-6014.

65. Subramanian, R. P., y R. J. Geraghty. 2007. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2903-2908.

66. Yokota, T., D. E. Milenic, M. Whitlow, y J. Schlom. 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52: 3402-3408.

67. Zeitlin, L., P. E. Castle, K. J. Whaley, T. R. Moench, y R. A. Cone. 1998. Comparison of an anti-HSV-2 monoclonal IgG and its IgA switch variant for topical immunoprotection of the mouse vagina. *J Reprod Immunol* 40: 93-101.

68. Zeitlin, L., S. S. Olmsted, T. R. Moench, M. S. Co, B. J. Martinell, V. M. Paradkar, D. R. Russell, C. Queen, R. A. Cone, y K. J. Whaley. 1998. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol* 16: 1361-1364.

69. Zeitlin, L., K. J. Whaley, P. P. Sanna, T. R. Moench, R. Bastidas, A. De Logu, R. A. Williamson, D. R. Burton, y R. A. Cone. 1996. Topically applied human recombinant monoclonal IgG1 antibody and its Fab and F(ab')₂ fragments protect mice from vaginal transmission of HSV-2. *Virology* 225: 213-215.

Ejemplo 4

Ensayo de neutralización de virus

Los ensayos de neutralización se realizaron en placas de microtitulación en células Vero, ya sea como ensayo de reducción de placa con una cantidad excesiva de anticuerpos para determinar la sensibilidad de neutralización del virus o como método de dilución de punto final para determinar la titulación de neutralización de la solución de anticuerpo. Los ensayos de reducción de placa se realizaron por incubación de 250 unidades formadoras de placa con 20 µg de MAb 2c. Después de dos horas se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión de células Vero (1,5 x 10⁵ células/ml). Después de 3 días las células se tiñeron con violeta de cristal. Para la valoración del punto final, las soluciones de anticuerpos diluidos (0,025 ml) se incubaron con 100 TCID₅₀ de VHS-1 en 0,025 ml, y 0,025 ml de complemento de cobaya, diluido a 1:10. Las titulaciones se expresaron como recíprocos de la dilución más alta del suero evitando el efecto citopático inducido por el virus en un 50 % de los cultivos.

Construcción de mutantes de delección de gB y expresión en células COS-1.

La construcción de los plásmidos que codifican gB de VHS-1 de longitud completa (gB(1-904) = pMT2gB), gB(1-720), gB(1-630), gB(1-505), gB(1-503), gB(1-487), y gB(1-707) se ha descrito en otra parte [30, 31]. Los plásmidos fueron proporcionados amablemente por Leonore Pereira. Universidad de California, San Francisco. Los plásmidos que codifican gB(1-130), gB(1-223), gB(183-488) y gB(436-642) se construyeron clonando los amplicones de PCR, flanqueados por los sitios de enzimas de restricción *Bam* HI y *Xho* I, en el vector de expresión eucariota pSVL (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania). Un clon de plásmido subgenómico de la cepa 17+ del VHS-1 [33; GenBank X14112] que contiene los nucleótidos de gB 52588 a 60362 se usó como molde en PCR. Para la expresión de construcciones de gB truncadas en el extremo N-terminal, el ADN que codifica la secuencia señal de gB se amplificó mediante PCR con un cebador que contiene un sitio *Xho* I en su extremo en la posición 5' y se insertó en la

posición 5' en el ADN que codifica gB de los plásmidos subfragmentados gB(183-488), y gB (436-642). La correcta integración de la inserción y su secuencia se confirmaron mediante secuenciación de nucleótidos. Las células COS-1 se cultivaron en cubreobjetos (diámetro de 10 mm) colocados en placas de 24 pocillos y plásmidos transfectados con el método DEAE-dextrano [34]. La expresión de gB y sus derivados truncados se verificó mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta con una mezcla de los anticuerpos monoclonales de gB de ratón anti-VHS-1 bien caracterizados, H1396 y H1781. Las células COS-1 transfectadas y fijadas se hicieron reaccionar con MAb 2c y se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia.

Mutagénesis dirigida al sitio de gB y construcción de virus recombinante

Se introdujeron mutaciones de aminoácidos individuales en la gB de VHS-1 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos usando el Sistema de mutagénesis *in vitro* Altered Sites™ (Promega, Mannheim, Alemania). En resumen, la secuencia de codificación de gB dentro de pMT₂gB [31] se transfirió en el vector de mutagénesis fagémico de *E. coli* pAlter-1. Las moléculas de ADN de pALTER-IgB de una sola hebra se prepararon por infección de células de JM109 de *E. coli* transformadas con pALTER-IgB con el fago R408. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante con los cebadores de des emparejamiento (posición mutada subrayada) como sigue a continuación:

Y296N (N = mutación), 5'-GGGACATGTTCACAAAGTC-3';	(SEQ ID NO: 24);
Y296F, 5'-GGGACATG <u>A</u> ACACAAAGTC-3'	(SEQ ID NO: 25);
M297L, 5'-ACGGGGACAGGTACACAAA-3'	(SEQ ID NO: 26);
M297T, 5'-AACGGGGAC <u>G</u> TGTACACAA-3'	(SEQ ID NO: 27);
M297V, 5'-ACGGGGAC <u>C</u> GTACACAAA-3'	(SEQ ID NO: 28);
S268A, 5'-AAAACGGGGC <u>C</u> ATGTACAC-3'	(SEQ ID NO: 29);
P299S, 5'-CGTAAACG <u>A</u> GGACATGTA-3'	(SEQ ID NO: 30);
F300Y, 5'-TAGCCGTAA <u>I</u> ACGGGGACA-3'	(SEQ ID NO: 31);
F300I, 5'-TAGCCGTAA <u>I</u> CGGGGACA-3'	(SEQ ID NO: 32);
Y301N, 5'-GTAGCCGT <u>I</u> AAACGGGG-3'	(SEQ ID NO: 33);
G302R, 5'-CCCGGTAGC <u>G</u> GTAACGG-3'	(SEQ ID NO: 34);
G302V, 5'-TCCCGGTAG <u>A</u> CGTAAACG-3'	(SEQ ID NO: 35);
Y303N, 5'-ACCCCTCCCGGT <u>I</u> GCCGTAAACG-3'	(SEQ ID NO: 36);
R304G, 5'-ACCCCTCCCGGTAGCCGTA-3'	(SEQ ID NO: 37);
R304L, 5'-GACCCCTCC <u>A</u> GGTAGCCGT-3'	(SEQ ID NO: 38);
E305K, 5'-GTGCGACCCCT <u>I</u> CCGGTAGCCGT-3'	(SEQ ID NO: 39);
G306A, 5'-GTGTGCGAC <u>G</u> CCTCCCGGT-3'	(SEQ ID NO: 40);
G306V, 5'-GTGTGCGAC <u>A</u> CCTCCCGGT-3'	(SEQ ID NO: 41);
S307A, 5'-CGGTGTGCG <u>C</u> CCCCCTCCCG-3'	(SEQ ID NO: 42).

Después de la elongación y la ligadura del cebador para formar moléculas circulares cerradas covalentemente y completamente híbridas, el ADN del heterohíbrido se transformó en BMH 71-18 mutS de *E. coli* que no puede reparar la falta de coincidencia de nucleótidos. Los plásmidos resultantes de los clones resistentes a la ampicilina se usaron para la transformación de JM109 de *E. coli* (recA). La identidad de las mutaciones en los plásmidos pAlter-IgB resultantes se confirmó mediante secuenciación del ADN de gB. Después de la mutagénesis, la inserción mutada se clonó de nuevo en el vector de expresión pMT₂gB resultante en las construcciones respectivas de pMT₂gBmut. Para analizar la reactividad del MAb 2c frente a gB con mutaciones de un solo aminoácido, las células COS-1, cultivadas en cubreobjetos (10 x 30 mm), se transfectaron con las construcciones pMT₂gBmut con el método de Lipofectamina™/OPTI-MEM™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se fijaron después de 44 horas de cultivo con metanol/acetona. La expresión de gBmut se verificó mediante un análisis de inmunofluorescencia indirecta usando una IgG de conejo anti-VHS 1 policlonal (Dako, Hamburgo, Alemania).

La glicoproteína B con los intercambios de aminoácidos individuales se insertó en la cepa F de tipo silvestre de VHS-1 mediante recombinación homóloga entre los genomas VHS-1 y el ADN de pMT₂gBmut plásmido. El ADN

genómico de VHS-1 se preparó a partir de reservas de virus por lisis de SDS/proteinasa K durante 1-3 horas a 56 °C seguido de extracción en fenol/cloroformo/alcohol iso-amílico y diálisis durante 65 horas (tampón I, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8; tampón II, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Los plásmidos de pMT₂gBmut se extrajeron con el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen, Hilden, Alemania). Los virus recombinantes se prepararon mediante la transfección de células Vero con ADN precipitado con fosfato de calcio de acuerdo con el método de Graham y Van der Eb [35] modificado por Stow y Wilkie [36] o con el método de Lipofectamina™/OPTI-MEM™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, para la transfección con el método de fosfato de calcio, se precipitaron aproximadamente 100 ng de ADN de VHS-1 F purificado con 500 ng de ADN de plásmido y 5 µg de ADN de timo de ternera en 0,436 ml A. bidest. mediante la adición de 64 µl de CaCl₂ 1 M durante 5 min. Después de la incubación de las células cultivadas en placas de petri (diámetro 25 cm) con el precipitado de ADN durante 45 minutos y EMEM con suero de ternera fetal al 10 % durante 3 horas, las células se sometieron a un shock con DMSO al 25 % en tampón HEBS durante 2 min. A partir de ese momento, el cultivo se continuó con EMEM con suero de ternera fetal al 10 % y MAb 2c. Para la transfección con Lipofectamina se usó 1 µg de ADN de VHS-1 DNA y 1 µg de ADN de plásmido. Se seleccionaron placas bien separadas y se identificaron sistemáticamente para detectar la mutación respectiva mediante secuenciación de ciclos de los amplicones de PCR. En general, el número de placas obtenidas fue bajo, con experimentos que no lograron producir ninguna placa en presencia de gB codificada por plásmidos (los experimentos de control sin presencia de plásmidos que codifican para gB y MAb 2c dieron como resultado numerosas placas). Para someter a ensayo la reactividad del anticuerpo, se infectaron 3 x 10⁵ células Vero cultivadas en cubreobjetos (8 x 16 mm) con 200 - 300 unidades de virus de formación de placa en 1 ml de EMEM. Después de 1 hora, el medio de cultivo celular se reemplazó por EMEM con de suero de ternera fetal al 10 %. Después de incubación durante 2 días, las células se fijaron con metanol/acetona a -20 °C.

Ensayo de inmunofluorescencia

La unión de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para gB de VHS a células se detectó usando IgG de cabra anti-ratón conjugado con DTAF (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Dianova, Hamburgo, Alemania). Para la detección de la unión de IgG de conejo anti-VHS-1, se usó IgG de cabra anti-conejo conjugada con Rojo Texas o Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Dianova). Para la detección de anticuerpos humanos, se usó IgG de cabra anti-humana conjugada con DTAF (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Dianova).

Síntesis de péptidos unidos a celulosa y barrido (barridos de péptidos, barrido de motivo clave, análisis de sustitución)

Todos los péptidos se generaron mediante una síntesis semiautomática de SPOT™ en membranas de celulosa Whatman 50 como se ha descrito anteriormente [37, 38]. Después de la síntesis, las membranas se bloquearon durante una noche en un tampón de bloqueo que contenía un reactivo de bloqueo (IX, Cambridge Research Biochemicals, Northwich, Reino Unido) en solución salina tamponada con Tris (Tris 50 mM, NaCl 125 mM, KCl 4 mM, pH 8,0), Tween 20 al 0,05 % (v/v) y sacarosa al 5 % (p/v) (TBST). Después de lavar una vez en TBST, las láminas se incubaron simultáneamente con MAb 2c (0,5-1,0 µg/ml) y fragmentos Fab de IgG anti-ratón conjugados con POD (exceso de cinco veces; Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y tampón de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar la dosis dos veces en TBST, la unión del anticuerpo se detectó mediante el kit de Transferencia de Western de Quimioluminiscencia (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los barridos de péptidos superpuestos (exploraciones de péptidos) [39] se sintetizaron como 15-meros con una superposición de 12 aminoácidos (es decir, desplazamiento a lo largo de la secuencia de gB en 3 aminoácidos), correspondiente a los restos de gB del aminoácido 31 a 505 (cepa 17⁺ del VHS-1 [33] GenBank X14112), y como 13-meros con una superposición de 12 aminoácidos (es decir, desplazamiento a lo largo de la secuencia de gB en un aminoácido) que corresponde a los restos 296 a 315 de gB.

Para identificar el motivo de unión mínima dentro del sitio de unión B del MAb 2c, se realizó un barrido del motivo clave usando 14-meros, formados por un hexámero central derivado de gB abarcado por cuatro restos aleatorios en cada extremo N- y C-terminales (X₁X₂X₃X₄B₁B₂B₃B₄B₅B₆X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄; X, posición aleatorizada, B, posición derivada de gB fija [40]. Con cada péptido, la secuencia hexamérica se desplazó en un aminoácido comenzando en la posición V295 de gB y abarcando la secuencia hasta la posición A315 de gB.

La relevancia de los aminoácidos individuales para la unión de MAb 2c dentro del sitio de unión A de gB se analizó mediante un análisis sustitutivo del péptido ₁₇₈RYSQFMGIFEDRAPV₁₉₂, (SEQ ID NO: 43) realizado mediante el intercambio sucesivo de cada aminoácido por todos los otros 19 aminoácidos naturales como se al escrito anteriormente [40 -42].

Experimentos de protección de ratones y ratón

Los ratones hembra C57BL/6J (H-2^b) se obtuvieron en Charles River Wiga (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Alemania) y se usaron cuando tenían entre 33 y 37 días de edad. Los experimentos se realizaron tal como se ha

descrito anteriormente [1, 2]. En resumen, los ratones se inocularon por vía intravaginal con 2×10^6 TCID₅₀ de VHS-1 en 0,1 ml de EMEM con suero de ternera fetal al 10 %. Veinticuatro horas antes de la inoculación viral, a los ratones se les administró, mediante una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de MAb 2c, suero inmunitario policlonal o medio de cultivo precipitado. La preparación de suero inmune estándar humana usada (Beriglobin S™, CSL Behring, Alemania) tenía una titulación de neutralización independiente del complemento de 1:1280 con respecto a VHS-1 en 0,025 ml y se diluyó para la aplicación cuádruple en medio de Iscove. La preparación de reserva de MAb 2c tenía una titulación de neutralización independiente del complemento de 1:640 y se diluyó dos veces para contener la misma actividad neutralizante que el suero inmune policlonal. La titulación de ELISA de las diluciones de anticuerpos aplicadas fue entre $10^{4,5}$ y $10^{5,5}$ cuando se determinó el acuerdo con el método de Kahlon y Whitley [43] usando IgG de conejo para ratón y ser humano conjugada con peroxidasa. Para controles, volúmenes equivalentes del medio de Iscove se trataron de la misma manera. Los ratones de control a los que se administró el medio de cultivo fueron equivalentes a los controles que recibieron un MAb no específico para VHS [1]. Los frotis vaginales se tomaron cada dos días después de la inoculación viral y se analizaron en busca de virus en monocapas de células Vero. Las titulaciones de virus se determinaron en placas de microtitulación con TCID₅₀ por 0,05 ml de acuerdo con el método de Reed y Muench [44].

Resultados

Los primeros 487 aminoácidos de gB son necesarios para la unión de MAb 2c

Para obtener una primera visión general de la región de la glicoproteína B necesaria para el plegamiento correcto del epítipo de MAb 2c, se expresaron una construcción de gB de VHS-1 de longitud completa y un conjunto de construcciones de gB truncada en el extremo carboxi-terminal en células COS-1 como se indica en la sección Métodos. La expresión de gB se verificó mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta usando una mezcla de los MAb específicos para VHS de murino H1396 y H1781. La unión de MAb 2c también se visualizó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Como se muestra en la Tabla 7, la proteína de longitud completa y los derivados truncados gB(1-720), gB(1-630), gB(1-505), gB(1-503) y gB(1-487) fueron reconocidos por MAb 2c. Por el contrario, el MAb 2c no logró unirse a gB(1-470), gB(1-223) y gB(1-30). Además, no se observó reacción con dos construcciones con ambos truncamientos N- y C-terminales (gB(183-488), gB(436-642)). Estos resultados indicaron que el epítipo de MAb 2c está localizado dentro de los primeros 487 residuos amino terminales.

Tabla 7 Unión de MAb 2c a glicoproteína B (gB) de VHS-1 truncada expresada en células COS-1.

construcciones de gB*	Reactividad**
gB(1-904) (gB de longitud completa)	+
gB(1-720)	+
gB(1-630)	+
gB(1-505)	+
gB(1-503)	+
gB(1-487)	+
gB(1-470)	-
gB(1-223)	-
gB(1-130)	-
gB(183-488)	-
gB(436-642)	-
pSVL***	-

* La expresión de todas las construcciones de gB se confirmó mediante inmunofluorescencia directa con los anticuerpos monoclonales H1396 y H1781 [30-32] específicos de gB de VHS.

** La unión de MAb 2c se detectó mediante inmunofluorescencia directa.

+, indica unión a MAb 2c, -, indica fallo en la unión a MAb 2c.

*** pSVL, vector de expresión, usado como control negativo.

MAb 2c reconoce secuencias de dos regiones de gB diferentes

Dado que el mapeo fino del epítipo reconocido por el MAb 2c no fue posible usando construcciones de delección de gB expresadas en células COS-1, se realizó un barrido derivado de gB de péptidos superpuestos (barrido de péptidos) sintetizado en soportes de membrana de celulosa continuos por síntesis SPOTTM. Los péptidos, que abarcan la región gB del aminoácido 31 a 505, se sintetizan como 15-meros, con un solapamiento de 12 aminoácidos (es decir, que se desplazan a lo largo de la secuencia gB en 3 aminoácidos), dando como resultado un total de 155 péptidos. La unión de MAb 2c se mostró mediante la incubación simultánea con anticuerpos primarios (MAb 2c) y secundarios (Fab de IgG anti-ratón conjugado con POD) y la detección por quimioluminiscencia. Como se muestra en la Fig. 22, se encontró que el MAb 2c se une a cinco péptidos dentro de dos regiones gB distintas, denominados sitios A y B. El sitio A comprende tres péptidos consecutivos correspondientes a los restos de gB, ¹⁷⁵FGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE₁₉₅ (SEQ ID NO: 44) (secuencia común ¹⁸¹QFMGIFEDR₁₈₉ (SEQ ID NO: 45), y en el sitio B dos péptidos consecutivos que abarcan los restos ²⁹⁸SPFYGYREGSHTSHTSYA₃₁₅ (SEQ ID NO: 46) (secuencia común ³⁰¹YGYREGSHTSHT₃₁₂ (SEQ ID NO: 47).

Identificación de la longitud mínima del sitio de unión B para MAb 2c

Dado que el péptido 90 (Fig. 22; ²⁹⁸SPFYGYREGSHTSHT₃₀₂ (SEQ ID NO: 48) presentaba la intensidad de señal más fuerte, los investigadores realizaron la hipótesis de que el sitio de unión B es el determinante dominante para la unión de MAb 2c. Por lo tanto, los investigadores identificaron la longitud mínima de el sitio B que se requiere para la unión de MAb 2c usando un barrido de péptido unido a celulosa de mayor resolución. Con los péptidos de 13 meros que abarcan los restos derivados de gB 296 a 315 con un solapamiento de 12 aminoácidos (es decir, el desplazamiento a lo largo de la secuencia de gB en un solo aminoácido) los investigadores hicieron síntesis por duplicado. La reactividad de MAb 2c con cinco péptidos consecutivos se observó después de un procedimiento de incubación y detección como se ha descrito anteriormente. En la Fig. 23 se muestra un alineamiento de las secuencias de los cinco péptidos reactivos. La secuencia común para los cinco los péptidos fue ³⁰⁰FYGYREGSH₃₀₈ (SEC ID NO: 49).

En un segundo enfoque, se aplicó un método de escaneo de motivos clave, usando 14-meros cada uno consistiendo en seis aminoácidos derivados de gB flanqueados en ambos extremos por cuatro posiciones aleatorias. En este ensayo, las cuatro posiciones terminales de cada molécula peptídica representaron una secuencia aleatoria en la que los aminoácidos se incorporaron estadísticamente. Cada aplicación puntual contenía de ese modo una amplia mezcla de péptidos con una multitud de secuencias en las posiciones peptídicas externas, pero todas con la misma secuencia derivada de gB en las posiciones peptídicas de cinco a diez. Los hexámeros centrales derivados de gB abarcaban la región gB desde el resto V295 a A315 y se desplazaban a lo largo de un aminoácido. Se eligió una secuencia de gB hexamérica porque se sabe que más de un 75 % de los epítipos no lineales comprenden un tramo secuencial de una longitud máxima de 4 a 7 residuos [45]. La reactividad de MAb 2c se observó con los dos péptidos consecutivos xxxx³⁰⁰FYGYRE₃₀₅xxxx (SEQ ID NO: 21) y xxxx³⁰⁰YGYREG₃₀₆xxxx (SEQ ID NO: 50) (Fig. 24). Por lo tanto se consideró que la secuencia ³⁰⁰FYGYREG₃₀₆ (SEQ ID NO: 51) era el motivo de unión mínima de los péptidos del sitio B requerido para la interacción con MAb 2c.

Identificación de restos individuales fundamentales para la unión de MAb 2c en el sitio B por gB mutada

Para confirmar el sitio de unión B para el MAb 2c en el contexto de la proteína plegada de forma nativa y completa, los investigadores alteraron la secuencia de aminoácidos de la gB de longitud completa, clonada en pMT₂gB, por intercambios de aminoácidos individuales dentro del sitio de unión B. Usando un sistema basado en fagémidos para mutagénesis dirigida al sitio, se generaron varias construcciones de gB con intercambios de aminoácidos individuales. Después de la expresión de las células gB en COS-1 mutadas, la unión de MAb 2c se analizó mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Como se muestra en la Tabla 8, se identificó una serie de restos de gB que resultaron ser fundamentales para la unión de MAb 2c. En detalle, la sustitución del resto P en la posición 29 de gB por S, F300 por Y e I, respectivamente, Y301 por N, G302 por R y V, respectivamente, Y303 por N, R304 por G y L, respectivamente, y E305 por K, dio como resultado una pérdida completa de la unión de MAb 2c, lo que indica que cada uno de los restos en las posiciones 299 a 305 tienen una participación fundamental en la formación de epítipos, ya sea representando restos clave que interactúan a través de sus cadenas laterales con el anticuerpo o influyendo en la adecuada general o local plegamiento de la proteína gB necesario para formar la conformación del epítipo reconocido por el anticuerpo. La expresión de las células gB en COS-1 mutadas se verificó mediante la incubación conjunta de las células con el MAb 2c murino y un suero inmune de IgG de conejo anti-VHS policlonal seguido de identificación mediante coincubación con la IgG anti-ratón conjugada con DTAF (fluorescencia de color verde si el MAb 2c estaba unido) y anticuerpos anti-conejo conjugados con Rojo Texas o Cy3 (fluorescencia de color rojo de las mismas células). Por el contrario, el intercambio del único resto de gB Y296 para N y F, respectivamente, M297 para L, T y V, respectivamente, y S298 para A, así como G306 para A y V, respectivamente, y S307 para A no influyó en la unión de MAb 2c.

Tabla 8 Unión de MAb 2c a variantes de glicoproteína B (gB) de longitud completa de VHS-1 que contienen intercambios de un solo aminoácido, expresados en células COS-1.

Variantes de gB	Reactividad**
Y296N*	+
Y296F	+
M297L	+
M297T	+
M297V	+
S298A	+
P299S	***
F300Y	-
F300I	-
Y301N	-
G302R	-
G302V	-
Y303N	-
R304G	-
R304L	-
E305K	-
G306A	+
G306V	+
S307A	+

* El aminoácido de tipo silvestre se proporciona antes del número de posición de gB mientras que el resto introducido se proporciona detrás del número de posición. La expresión de todas las variantes de gB se confirmó mediante inmunofluorescencia obtenida por co-incubación de las células con un suero de IgG de conejo anti-VHS-1 policlonal.

** La unión de MAb 2c se sometió ensayo mediante inmunofluorescencia indirecta.

+, indica unión a MAb 2c, -, indica fallo en la unión a MAb 2c.

*** Para evaluación de este resultado particular, véase la sección de Discusión.

Identificación de restos individuales fundamentales para unión de MAb 2c al sitio B con virus mutantes

- 5 Para aproximarse más a las situaciones *in vivo*, el impacto de los aminoácidos individuales del sitio B se analizó aún más usando cinco variantes de VHS-1 bien caracterizadas (R126, R1375, B4.1, R1435, R233), cada una de las cuales contiene una mutación de aminoácido en gB [27-29] y por virus mutantes (VY301N [Y en la posición 301 sustituido por N], vG302R, vG302V) generados en el presente estudio, tal como se indica en la sección Métodos. Se infectaron células Vero en portaobjetos con 200 - 300 unidades formadoras de placa de estos mutantes o de los
- 10 virus de tipo silvestre precursores VHS-1 F y KOS 321. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta demostraron que el MAb 2c no se unió a las células infectadas por los virus vY301N, vG302R, vG302V, R126 (Y303 sustituido por N), R1375 (R304Q) y B4.1 (E305K) mientras que MAb 2c reaccionó con las células infectadas con los mutantes R1435 (H308Y), R233 (R328H), así como con los virus de tipo silvestre (Tabla 9).

Tabla 9 Sensibilidad virus de tipo silvestre de VHS-1 y mutantes de gB viral a la unión y neutralización con MAb 2c.

Virus [Ref]	Unión*	Neutralización**
Cepa F de tipo silvestre [25]	+	+
Cepa KOS 321 de tipo silvestre [26]	+	+
Mutante F vY301N*** [este estudio]	-	-
Mutante F vG302R [este estudio]	-	-
Mutante F vG302V [este estudio]	-	-
Mutante F R126 (Y303N) [27, 28]	-	-
Mutante F R1375 (R304Q) [27, 28]	-	-
Mutante KOS B4.1 (E305K) [29]	-	-
Mutante F R1435 (H308Y) [27, 28]	+	+
Mutante F R233 (R328H) [27, 28]	+	+

La expresión de gB se confirmó para todos los virus mediante inmunofluorescencia obtenida con un suero de IgG de conejo anti-VHS-1 policlonal, +, indica MAb 2c que se une a células Vero infectadas detectado mediante inmunofluorescencia indirecta, -, indica fallo en la unión a MAb 2c.

** +, indica neutralización de virus con MAb 2c, -, indica fallo en de neutralización de virus.

*** El aminoácido de tipo silvestre se proporciona antes del número de posición de gB mientras que el resto introducido se proporciona detrás del número de posición.

Para determinar si los restos identificados como fundamentales para la unión de MAb 2c a gB también eran fundamentales para la actividad neutralizante del anticuerpo, se realizaron ensayos de neutralización usando 250 unidades formadoras de placas de los mutantes virales o virus de tipo silvestre. Como se muestra en la Tabla 9, las cepas F y KOS 321 de tipo silvestre, así como los mutantes R1435 (H308Y) y R233 (R328H) se neutralizaron completamente con MAb 2c. Por el contrario, el MAb 2c falló completamente en la neutralización de los virus mutantes vY301N, vG302R, vG302V, R126 (Y303N), R1375 (R304Q) y B4.1 (E305K), lo que indica que cada uno de estos restos es una diana esencial para formar el epítipo requerido para la capacidad de neutralización de MAb 2c. Tomados en conjunto, los resultados obtenidos por análisis de péptidos y proteínas mutadas mostraron que los restos 299 a 305 son importantes para la formación de epítopos, así como para la bioactividad *in vitro* de MAb 2c.

Formación de mapas de epítopos mediante experimentos de protección en ratón

Para analizar si el efecto protector de MAb 2c *in vivo* también depende de los aminoácidos particulares en el sitio B, se inocularon un total de 168 ratones C57BL/6 por vía intravaginal con los virus mutantes o las cepas precursoras de tipo silvestre 24 horas después de la inyección intraperitoneal de MAb 2c. Para comparación, se administró un suero inmune policlonal ajustado a la misma potencia neutralizante. Los experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente [1, 2]. Como se muestra en la Fig. 25, el MAb 2c fue ineficaz en ratones inoculados con mutantes R126 (Y303N), R1375 (R304Q) y B4.1 (E305K) mientras que fue eficaz en ratones inoculados con los mutantes R1435 (H308Y) o R233 (R328H) o virus de tipo silvestre. Sin embargo, los experimentos con los mutantes virales R126, B4.1 y R233 se vieron ligeramente obstaculizados por el hecho de que la replicación viral de estos mutantes en las membranas mucosas de los ratones no fue eficaz. En particular, el mutante R126 presentó una capacidad de replicación muy baja. Por lo tanto, el curso de la infección no se diferenció entre los ratones infectados con R126 tratados con MAb 2c, suero inmune policlonal o el fluido de control. En conjunto, los resultados de los experimentos de protección con ratones demostraron claramente que los restos Y303, R304 y E305 de gB son esenciales para que el MAb 2c muestre su efecto protector *in vivo*.

Caracterización del sitio A para la unión de MAb 2c

Los resultados de la formación de mapas de epítopos de MAb 2c con el enfoque de barrido de péptidos (Fig. 22) inicialmente sugirieron que el sitio de unión A con la secuencia común ₁₈₁QFMGIFEDR₁₈₉ es un componente de un epítipo discontinuo formado junto con el sitio B y potencialmente otras regiones que podrían no ser detectables con péptidos segmentados, sino que forma parte del epítipo funcional en la proteína plegada de forma nativa. Sin embargo, el sitio A sorprendentemente no estaba situado en la superficie de la estructura tridimensional del trómero

de gB [21]. Además, los sitios A y B no están muy cerca en la superficie de gB y no se podían cubrir de forma simultánea por el área promedio de un parátipo de anticuerpo.

Para investigar la relevancia del sitio A, los investigadores comenzaron a generar construcciones de gB y mutantes virales con intercambios de aminoácidos individuales. Sin embargo, los esfuerzos para demostrar la importancia de estos aminoácidos en el sistema biológico no fueron recompensados debido a que la sustitución de cualquiera de estos restos en construcciones de gB y en mutantes virales no fue seguida por la pérdida de unión del anticuerpo, probablemente debido a la presencia del motivo del sitio B en la molécula (los datos y los cebadores de mutagénesis no se muestran).

Con el fin de estudiar la importancia relativa de cada aminoácido del péptido 50, ¹⁷⁰RYSQFMGIFEDRAPV₁₉₂ (SEQ ID NO: 43), identificado por el enfoque de barrido de péptidos, los investigadores realizaron un análisis sustitutivo completo. Por lo tanto, todos los posibles análogos de sustitución de un solo sitio (es decir, cada posición sustituida por todos los otros 19 aminoácidos proteínogénicos) se sintetizan mediante la síntesis de SPOT™ y se somete a ensayo para unión de MAb 2c. La mayoría de las posiciones del péptido se podrían intercambiar por varios aminoácidos fisicoquímicamente diferentes sin pérdida de unión. El motivo ¹⁸⁶FED₁₈₈, sin embargo, se conservó, es decir, la alteración de estos aminoácidos se asoció con la pérdida de la unión del anticuerpo (los datos no se muestran). Por lo tanto, los investigadores plantearon la hipótesis de que el sitio A o predominantemente el motivo ¹⁸⁶FED₁₈₈ imita una parte del epítipo de MAb 2c discontinuo.

Para someter a ensayo este supuesto, los investigadores diseñaron por vía informática un péptido de 12 meros, PFYGYRE-G-FEDF (SEQ ID NO: 52), formado por los restos situados en el sitio de unión B de MAb 2c (²⁹⁹PFYGYRE₃₀₅ (SEQ ID NO: 53)) que los investigadores encontraron que eran biológicamente importantes (Tabla 8), un conector de glicina y un motivo C-terminal FEDF derivado de la secuencia más crítica del sitio A. La unión de MAb 2c a este péptido se midió en comparación con el péptido ²⁹⁸SPFYGYREGSHEHT₃₀₂ (SEQ ID NO: 48) que presentaba la reactividad más fuerte en el barrido de péptidos de 15 unidades (Fig. 22). Ambos péptidos se sintetizaron en una membrana celulosa y se sometieron a ensayo con MAb 2c como se describe en Métodos. Como se muestra en la Fig. 26, la señal del péptido de combinación PFYGYRE-G-FEDF (SEQ ID NO: 52) fue mucho más intensa en comparación con el péptido del sitio B solo, pero el tiempo de exposición de la película de rayos X fue solo uno cuarto de la de la exploración de péptidos 5-mer. Este hallazgo apoya firmemente la suposición de que el MAb 2c reconoce un epítipo discontinuo que comprende i) el sitio B del resto 299 al resto 305 (PFYGYRE) (SEQ ID NO: 53), y ii) una o más regiones discontinuas adicionales que pueden ser imitadas por la secuencia FEDF (SEQ ID NO: 54).

Discusión

El objeto del trabajo actual fue hacer mapas del sitio de unión para el MAb 2c en la glicoproteína B del virus del herpes simple e identificar los restos fundamentales del epítipo. Con un conjunto de versiones truncadas en el extremo C-terminal de la proteína gB expresada de forma recombinante, se encontró que los 487 restos N-terminales son necesarios para la unión de MAb2c. La eliminación adicional de 17 o más aminoácidos del extremo C-terminal dio lugar a una pérdida de la unión del anticuerpo, aunque la síntesis de células transfectadas de forma transitoria de todas las versiones eliminadas de gB se podría determinar fácilmente. Para reducir la ubicación del epítipo, se construyeron dos mutantes de delección adicionales, gB(183-488) y gB (436-642), cada uno fusionado con la secuencia del péptido señal (aminoácidos 1-30). Como MAb2c no se unió a ninguna de estas últimas proteínas gB truncadas, lo que contradice la suposición inicial de los investigadores de que el epítipo de MAb 2c podría estar localizado entre los restos 470 y 487, decidieron cambiar a una estrategia alternativa de formación de mapas de epítipos usando péptidos sintéticos.

Muchos epítipos de linfocitos B son de naturaleza discontinua [46]. La formación de mapas de estos epítipos discontinuos usando fragmentos de proteínas, es decir, péptidos, generados química o biológicamente, adolece del inconveniente de que los péptidos obtenidos a partir de regiones de unión única generalmente tienen afinidades muy bajas para la pareja de unión que generalmente no se pueden medir en ELISA o ensayos de resonancia de plasmones de superficie. En las últimas dos décadas, se han descrito varios ejemplos de investigaciones en estudios de formación de mapas de epítipos discontinuos con péptidos sintetizados en superficies continuas [47-50]. En términos de sensibilidad, el método SPOT™ es especialmente adecuado [37] debido a la alta densidad de péptidos en las membranas de la celulosa (aprox. 50 nmol/cm²). Esto conduce a efectos de avidéz y de nueva unión y, por lo tanto, permite la identificación incluso de las interacciones péptido-anticuerpo de baja afinidad. Una revisión exhaustiva que cubre más de 600 citas hasta 2006 resume ampliamente los estudios sobre la formación de mapas de epítipos lineales y discontinuos usando la tecnología SPOT™ para síntesis de péptidos [51].

Después de la localización del epítipo de MAb 2c dentro de los 487 restos de gB del extremo N-terminal, se consiguió un mapeo fino de los aminoácidos fundamentales para la unión del anticuerpo mediante el enfoque de barrido de péptidos combinado con el método de síntesis SPOT™. Como se muestra en la Fig. 20, el MAb 2c reaccionó con más fuerza al péptido de 15-meros, ²⁹⁸SPFYGYREGSHEHT₃₁₂ (SEQ ID NO: 48), localizado en el sitio B de unión, lo que lleva a la suposición de que esta secuencia está predominantemente involucrada en el reconocimiento del MAb 2c. Posteriormente, la secuencia de reconocimiento en el sitio B se pudo refinar mediante

una exploración de péptidos de mayor resolución a los aminoácidos 300 a 308. La confirmación final de los restos fundamentales del epítipo se logró mediante un enfoque biológico que estudia la unión de MAb 2c a las células transfectadas con longitud completa. Las construcciones de gB que llevan mutaciones de un solo punto, dan como resultado la secuencia ³⁰⁰FYGYRE³⁰⁵ (SEQ ID NO: 21). Además se encontró que el residuo de prolina 299 era importante *in vivo* a pesar de su exposición superficial muy limitada en la estructura gB tridimensional [21]. Sin embargo, debido a las restricciones de conformación de la cadena lateral de prolina, como resultado de su naturaleza cíclica, la prolina a menudo estabiliza una secuencia de proteínas en una estructura fija. También se supone que este resto es esencial para el plegamiento local de gB en el sitio de unión del anticuerpo. El impacto de los restos fundamentales identificados se corroboró mediante experimentos de protección con ratones que demostraron que el efecto protector del MAb 2c *in vivo* se elimina cuando los restos fundamentales se mutan. En conjunto, estos datos demuestran que los aminoácidos 300 a 305 forman la parte esencial del epítipo de MAb 2c energético.

Como se esperaba, los mutantes de VHS con mutaciones de un solo punto de los restos clave dentro del sitio B eran resistentes a la unión y neutralización de MAb 2c. Sin embargo, la mayoría de los mutantes virales se encontraron muy discapacitados, presentando un crecimiento deficiente en el cultivo celular o las membranas mucosas. Especialmente el resto de fenilalanina en la posición 300 parece ser fundamental para la función biológica de gB, ya que los intentos de generar mutantes de virus viables con un intercambio de aminoácidos en esa posición no han tenido éxito hasta el momento. Este hecho puede indicar un papel importante de este motivo gB en el ciclo lítico del virus. Por lo tanto, es interesante especular que el epítipo de MAb2c puede representar en cierto modo el talón de Aquiles de gB.

La formación de mapas de epítipos inicial mediante barrido de péptidos indicó que el MAb 2c reconoce una región de gB adicional, denominada sitio A. La determinación de los restos fundamentales en ese sitio se realizó mediante un análisis de sustitución en el péptido ¹⁷⁸RYSQFMGIFEDRAPV¹⁹² que demuestra que los restos F186, E187 y D188 eran altamente sensibles a la sustitución. La relevancia de estos aminoácidos en el sistema biológico no se pudo demostrar porque la sustitución de estos restos en construcciones de gB y en mutantes virales no afectaba a la unión del anticuerpo, debido probablemente a la presencia del motivo del sitio B en la molécula.

Basándose en la estructura cristalina recientemente determinada del dominio de gB externo [21], el monómero de gB se dividió en seis dominios estructurales distintos. El dominio I comprende **los aminoácidos** 154 a 363. De acuerdo con los resultados presentados en el presente documento, los restos del epítipo energético más importante del MAb 2c (sitio B) residen en el dominio estructural I. Al superponer los restos fundamentales del sitio B en la estructura cristalina de gB es evidente que estos restos están situados en la superficie de gB dentro de un tramo en forma de bucle de 22 aminoácidos entre dos cadenas β (β 13, β 14) en el tercio superior del dominio estructural I. Los restos del sitio A ¹⁸⁶FED¹⁸⁸ también se localizan en el dominio estructural I pero en la base del dominio I de gB en una pequeña cavidad apenas expuesta, lo que implica que los dos sitios no están en una proximidad espacial. Sin embargo, debido a las similitudes estructurales de gB con otras glicoproteínas virales y de acuerdo con resultados de mutagénesis de inserción de conector, se sugiere que la estructura cristalina represente una forma de gB posterior a la fusión [52-54]. Sin embargo, el virión contiene la forma de fusión previa de gB y se sugiere que los anticuerpos neutralizantes deberían reconocer la conformación de fusión previa de gB [21]. Sin embargo, estudios recientes han indicado el reconocimiento de gB tanto antes como después de la fusión por todos los MAb específicos de gB sometidos a ensayo [55].

Una explicación alternativa más atractiva, basada en los datos experimentales en combinación con la localización del sitio A dentro de la estructura tridimensional de gB [21] y en relación con el sitio B, podría ser que el sitio A no es un componente del epítipo discontinuo de MAb 2c. Los resultados del barrido de péptidos y el análisis de sustitución sugieren que la imitación de una o más regiones del epítipo discontinuo que son obviamente indetectables por las metodologías aplicadas. Todo el epítipo funcionales decir, todos los aminoácidos que están en contacto con MAb 2c, a diferencia del epítipo energético que reside principalmente en los restos 300 a 305 del sitio B, solo se pueden detectar mediante rayos X o técnicas RMN del complejo antígeno-anticuerpo [56, 57].

La hipótesis de que el sitio A y especialmente el motivo FED imita otra parte del epítipo discontinuo fue claramente respaldada por el intento de combinar los restos fundamentales del sitio B con la secuencia FEDF obtenida a partir del sitio A a través de un resto de glicina como un elemento espaciador flexible dentro de una molécula unida con enlace covalente (Fig. 26). Este péptido diseñado por ingeniería dio como resultado un inmenso aumento de la intensidad de la señal cuando se comparó con el péptido 90 del sitio B (véase la Fig. 22) que se correlaciona con un aumento de la afinidad. La imitación de los sitios de unión discontinua por péptidos que abarcan regiones de unión única reunidas en una molécula sintética se ha descrito en varias publicaciones, por ejemplo, un imitador de interleuquina-10 para un anticuerpo que reconoce un epítipo discontinuo [49].

Varios investigadores han usado durante años los anticuerpos monoclonales para identificar los dominios funcionales de gB de VHS [30, 32, 58-60]. Un estudio reciente sugirió la existencia de al menos cuatro regiones funcionales, dispersas en toda la estructura de gB tal como se define mediante el patrón de unión de MAb neutralizantes a gB [55]. De acuerdo con estos resultados, el epítipo de MAb 2c se localiza dentro de la región funcional (FR) 1 que está formada por el dominio estructural I y la secuencia del resto 697 a 725 del dominio

estructural V, este último se extiende desde los restos 670 a 727. De forma interesante, tres de los MAb neutralizadores más potentes generados por Bender *et al.* [55] también se han hecho mapas del dominio estructural I dentro de FR1 tal como se determina mediante la reactividad con un fragmento de escisión proteolítica de gB que incluye los restos 98 a 472.

El MAb 2c, provocado por el tipo o 1 del VHS, tiene reactividad cruzada con el tipo o 2 del VHS [1, 2]. Por lo tanto, los investigadores compararon las secuencias de aminoácidos de los sitios A y B de gB de VHS-1 con las de VHS-2. En las 53 gB del VHS-2 de longitud completa encontradas en la base de datos de proteínas de NCBI (estado 30 de julio de 2010), las secuencias de gB de VHS-1 ¹⁷⁸RYSQFMGIFEDRAPV¹⁹² (SEQ ID NO: 43) y ²⁹⁸SPFYGYREGSHTTEHT³¹² (SEQ ID NO: 48) estaban presentes.

Dado que el objeto principal de la terapia anti-VHS es eliminar rápidamente la replicación viral, el MAb 2c podría proporcionar una herramienta potencial para tratar las infecciones por VHS de tipos 1 y 2. En principio, se pueden perseguir dos estrategias. En primer lugar, si se pudiera demostrar que los anticuerpos de la especificidad y la bioactividad del MAb 2c se pueden inducir mediante péptidos obtenidos a partir del sitio B o el epítipo imitado PFYGYRE-G-FEDF (SEQ ID NO: 52), la inmunización activa se podría concebir. Un enfoque alternativo para explotar el potencial profiláctico y terapéutico del MAb 2c podría ser convertir el anticuerpo de ratón en una molécula humanizada para inmunización pasiva, además de quimioterapia antiviral bien establecida.

Referencias para el ejemplo 4

1. Eis-Hübinger AM, Mohr K, Schneweis KE (1992) Different mechanisms of protection by monoclonal and policlonal antibodies during the course of herpes simplex virus infection. *Intervirology* 32: 351-360
2. Eis-Hübinger AM, Schmidt DS, Schneweis KE (1993) Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes. *J Gen Virol.* 74: 379-385
3. Whitley RJ, Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357: 1513-1518
4. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ (2007) Herpes simplex viruses. En: Knipe DM, Howley (eds) *Fields Virology*, 5th edition Lippincott, pp 2501-2601
5. Gupta R, Warren T, Wald A (2007) Genital herpes. *Lancet* 370: 2127-2137
6. Corey L, Wald A (2009) Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* 361 : 1376-1385
7. Pass RF, Whitley RJ, Whelchel JD, Diethelm AG, Reynolds DW, Alford CA (1979) Identification of patients with increased risk of infection with herpes simplex virus after renal transplantation. *J Infect Dis* 140: 487-492
8. Siegal FC, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, Parham DM, Siegal M, Cunningham-Rundles S, Armstrong D (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* 305: 1439-1444
9. Bartlett JG (2004) Recent developments in the management of herpes simplex virus infection in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 39 Suppl 5: S237-239
10. Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW (2006) The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* 194:S11-18
11. Cernik C, Gallina K, Brodell RT (2008) The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. *Arch Intern Med* 168: 1137-1144
12. Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC (2009) Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 559-568
13. Dasgupta G, Chentoufi AA, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L (2009) New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev Vaccines*. 8: 1023-1035
14. Pellett PE, Kousoulas KG, Pereira L, Roizman B (1985) Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants. *J Virol* 53: 243-253
15. Pereira L (1994) Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infect Agents Dis* 3: 9-28
16. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17: 205-215
17. Bzik DJ, Fox BA, DeLuca NA, Person S (1984) Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* 137: 185-190
18. Cai WH, Gu B, Person S (1988) Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol* 62: 2596-2604
19. Butcher M, Raviprakash K, Ghosh HP (1990) Acid pH-induced fusion of cells by herpes simplex virus glycoproteins gB and gD. *J Biol Chem* 265: 5862-5868
20. Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH (2003) Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol.* 77: 9542-9552
21. Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313: 217-220
22. Hannah BP, Cairns TM, Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH (2009) Herpes simplex

- virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J Virol.* 83: 6825-6836
23. Wright CC, Wisner TW, Hannah BP, Eisenberg RJ, Cohen GH, Johnson DC (2009) Fusion between perinuclear virions and the outer nuclear membrane requires the fusogenic activity of herpes simplex virus gB. *J Virol* 83: 11847-11856
- 5 24. Atanasiu D, Whitbeck JC, de Leon MP, Lou H, Hannah BP, Cohen GH, Eisenberg RJ (2010) Bimolecular complementation defines functional regions of herpes simplex virus gB that are involved with gH/gL as a necessary step leading to cell fusion. *J Virol* 84:3825-3834
25. Ejercito PM, Kieff ED, Roizman B (1968) Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* 2: 357-364
- 10 26. Holland TC, Marlin SD, Levine M, Glorioso J (1983) Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J Virol* 45: 672-682
27. Kousoulas KG, Pellett PE, Pereira L, Roizman B (1984) Mutations affecting conformation or sequence of neutralizing epitopes identified by reactivity of viable plaques segregate from syn and ts domains of HSV-1(F) gB gene. *Virology* 135: 379-394
- 15 28. Kousoulas KG, Huo B, Pereira L (1988) Antibody-resistant mutations in cross-reactive and type-specific epitopes of herpes simplex virus 1 glycoprotein B map in separate domains. *Virology* 166: 423-431
29. Highlander SL, Dorney DJ, Gage PJ, Holland TC, Cai W, Person S, Levine M, Glorioso JC (1989) Identification of mar mutations in herpes simplex virus type 1 glycoprotein B which alter antigenic structure and function in virus penetration. *J Virol* 63: 730-738
- 20 30. Pereira L, Ali M, Kousoulas K, Huo B, Banks T (1989) Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: neutralizing epitopes map in regions of continuous y discontinuous residues. *Virology* 172: 11-24
31. Qadri I, Gimeno C, Navarro D, Pereira L (1991) Mutations in conformation-dependent domains of herpes simplex virus 1 glycoprotein B affect the antigenic properties, dimerization, and transport of the molecule. *Virology* 180: 135-152
- 25 32. Navarro D, Paz P, Pereira L (1992) Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* 186: 99-112
33. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69: 1531-1574
- 30 34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
35. Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467
36. Stow ND, Wilkie NM (1976) An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type 1 DNA. *J Gen Virol* 33: 447-458
- 35 37. Frank R (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48: 9217-9232.
38. Kramer A y Schneider-Mergener J (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods Mol Biol* 87: 25-39
- 40 39. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schofs PG (1987) Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 102: 259-274
40. Reineke U (2009) Antibody epitope mapping using de novo generated synthetic peptide libraries. *Methods Mol Biol* 524: 203-211
41. Pinilla C, Appel JR, Houghten RA (1993) Functional importance of amino acid residues making up peptide antigenic determinants. *Mol Immunol* 30: 577-585
- 45 42. Reineke U, Ivascu C, Schlieff M, Landgraf C, Gericke S, Zahn G, Herzel H, Voikmer-Engert R, Schneider-Mergener J (2002) Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences. *J Immunol Methods* 267: 37-51
43. Kahlon J, Whitley RJ (1988) Antibody response of the newborn after herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 158: 925-933
- 50 44. Reed, LJ, Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497
45. Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O (2006) Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15: 2558-2567
46. Van Regenmortel MHV (2009) What is a B-cell epitope? *Methods Mol Biol* 524 9: 3-20
- 55 47. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B (1997) Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390: 74-77
48. Prodinger WM, Schwendinger MG, Schoch J, Kochle M, Larcher C, Dierich MP (1998) Characterization of C3dg binding to a recess formed between short consensus repeats 1 and 2 of complement receptor type 2 (CR2; CD21). *J Immunol* 161 : 4604-4610
- 60 49. Reineke U, Sabat R, Misselwitz R, Welfle H, Volk HD, Schneider-Mergener J (1999) A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nat Biotechnol* 3: 271-275
50. Bian C, Zhang X, Cai X, Zhang L, Chen Z, Zha Y, Xu Y, Xu K, Lu W, Yan L, Yuan J, Feng J, Hao P, Wang Q, Zhao G, Liu G, Zhu X, Shen H, Zheng B, Shen B, Sun B (2009) Conserved amino acids W423 y N424 in receptor-binding domain of SARS-CoV are potential targets for therapeutic monoclonal antibody. *Virology* 383: 39-46
- 65 51. Reineke U, Schneider-Mergener J, Schutkowski M (2006) Peptide arrays in proteomics and drug discovery.

En: Ozkan M y Heller MJ (eds) BioMEMS and biomedical nanotechnology, volumen II. micro/nano technology for genomics and proteomics, Springer, Berlin, pp 161-282

52. Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin (2006) Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313: 187-191

53. Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S (2007) Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 315: 843-848

54. Lin E, Spear PG (2007) Random linker-insertion mutagenesis to identify functional domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13140-13145

55. Bender FC, Samanta M, Heldwein EE, de Leon MP, Bilman E, Lou H, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH (2007) Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions. *J Virol* 81: 3827-3841

56. Sundberg EJ (2009) Structural basis of antibody-antigen interactions. *Methods Mol Biol* 524:23-36

57. Rosen O, Anglister J (2009) Epitope mapping of antibody-antigen complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Mol Biol*: 524: 37-57

58. Highlander SL, Cai WH, Person S, Levine M, Glorioso JC (1988) Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *J Virol* 62: 1881-1888

59. Sanchez-Pescador L, Pereira L, Charlebois ED, Kohl S (1993) Antibodies to epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B (gB) in human sera: analysis of functional gB epitopes defined by inhibition of murine monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 168: 844-853

60. Li W, Minova-Foster TJ, Norton DD, Muggeridge MI (2006) Identification of functional domains in herpes simplex virus 2 glycoprotein B. *J Virol* 80: 3792-3800

Referencias

Documento DK 187286

Documento JP6135854

Documento US 4.950.595

Documento US 6.180.370

Documento WO 2003/105782

Documento WO 1997/26329

Eis-Hübinger, A.M., K. Mohr, y K.E. Schneweis, *Different mechanisms of protección by monoclonal and policlonal antibodies during the course of herpes simplex virus infection*. *Intervirology*, 1991. **32** (6): p. 351-360.

Eis-Hübinger, A.M., D.S. Schmidt, y K.E. Schneweis, *Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes*. *J.Gen.Virol.*, 1993. **74** (Pt 3): p. 379-385.

Highlander, S.L., et al., *Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration*. *J Virol*, 1988. **62** (6): p. 1881-8.

Queen, C , et al., *A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989. **86** (24): p. 10029-33.

Krauss, J., et al., *Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment*. *Protein Eng*, 2003. **16** (10): p. 753-9.

Koga, J., S. Chatterjee, y R.J. Whitley, *Studies on herpes simplex virus type 1 glycoproteins using monoclonal antibodies*. *Virology*, 1986. **151** (2): p. 385-9.

Co, M.S., et al., *Humanized antibodies for antiviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88** (7): p. 2869-73.

Zeitlin, L., et al., *A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for inmunoprotección of the vagina against genital herpes*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16** (13): p. 1361-4.

Navarro, D., P. Paz, y L. Pereira, *Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion*. *Virology*, 1992. **186** (1): p. 99-112.

Kabat, EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K, Foeller C. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (ed 5). Bethesda: NIH Publication No. 91-3242; 1991.

Roller *et al.*, *Structure-function analysis of herpes simplex virus glycoprotein B with fusion-from-without activity*. Virology, 2008. **382** (2): p. 207-216.

Listado de secuencias

5 <110> Rheinische Friedrich-wilhelms-universität Bonn
Universität Duisburg-Essen

<120> Anticuerpo anti-VHS

10 <130> P66201PC

<160> 54

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> CDR1 de 2c VH

25 <400> 1

Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
1 5

<210> 2
30 <211> 16
<212> PRT
<213> artificial

<220>
35 <223> CDR2 de 2c VH

<400> 2

His Ile Trp Trp Asn Asn Asp Lys Tyr Tyr Lys Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

40 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> CDR3 de 2c VH

<400> 3

50

Ile Tyr Tyr Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
55 <211> 16
<212> PRT
<213> artificial

<220>
 <223> CDRI de 2c VL

<400> 4

5
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> CDR2 de 2c VL

15
 <400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

25
 <220>
 <223> CDR3 de 2c VL

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Ser
 1 5

30

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> almacén de VH de línea germinal humana

40
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (100)..(107)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45
 <400> 7

ES 2 715 787 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Arg Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> armazón de VL de línea germinal humana
 <400> 8

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

Lys Arg

<210> 9
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> VH de anticuerpo 2c

<400> 9

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

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> VL de anticuerpo 2c

<400> 10

10

```

    Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
    1          5          10          15

    Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
    20          25          30

    Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
    35          40          45

    Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50          55          60

    Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
    65          70          75          80

    Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
    85          90          95

    Ser His Val Pro Trp Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    100         105         110

    Arg
    
```

<210> 11
 <211> 903
 <212> PRT
 <213> cepa F de VSH1

15

<400> 11

ES 2 715 787 T3

Met Arg Gln Gly Ala Ala Arg Gly Cys Arg Trp Phe Val Val Trp Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Val Ala Ser Ala Ala Pro Ser
 20 25 30
 Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn Gly
 35 40 45
 Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Pro Gly Pro Ala Pro Thr Gly
 50 55 60
 Asp Thr Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Pro Pro Pro
 65 70 75 80
 Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu
 85 90 95
 Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe
 100 105 110
 Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln
 115 120 125
 Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly
 130 135 140
 Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala
 145 150 155 160
 Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His
 165 170 175
 Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro
 180 185 190
 Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser
 195 200 205
 Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg
 210 215 220
 Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser
 245 250 255
 Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val
 260 265 270

Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu
 275 280 285
 Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu
 290 295 300
 Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln
 305 310 315 320
 Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr
 325 330 335
 Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala
 340 345 350
 Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp
 355 360 365
 Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg
 370 375 380
 Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu
 385 390 395 400
 Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp Ala
 405 410 415
 Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr His
 420 425 430
 Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly Phe Leu
 435 440 445
 Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr Val
 450 455 460
 Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Pro Thr Pro
 465 470 475 480
 Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr
 485 490 495
 Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile
 500 505 510
 Gln Arg His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys
 515 520 525
 Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu
 530 535 540

ES 2 715 787 T3

Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala
 545 550 555 560
 Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala
 565 570 575
 Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser Arg Pro
 580 585 590
 Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln
 595 600 605
 Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu
 610 615 620
 Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe
 625 630 635 640
 Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His
 645 650 655
 Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu
 660 665 670
 Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr
 675 680 685
 Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val
 690 695 700
 Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr
 705 710 715 720
 Val Ile His Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Gly Ala
 725 730 735
 Phe Phe Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val
 740 745 750
 Met Gly Ile Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser Ser
 755 760 765
 Phe Met Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu
 770 775 780
 Ala Gly Leu Ala Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Met Arg Leu
 785 790 795 800
 Gln Ser Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu
 805 810 815
 Lys Asn Pro Thr Asn Pro Asp Ala Ser Gly Glu Gly Glu Glu Gly Gly

ES 2 715 787 T3

820 825 — 830
 Asp Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg Tyr
 835 840 845
 Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Lys Lys
 850 855 860
 Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ala Lys Val Thr Asp Met Val Met
 865 870 875
 Arg Lys Arg Arg Asn Thr Asn Tyr Thr Gln Val Pro Asn Lys Asp Gly
 885 890 895
 Asp Ala Asp Glu Asp Asp Leu
 900

<210> 12
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> cepa KOS DE VHS1
 <400> 12

Met His Gln Gly Ala Pro Ser Trp Gly Arg Arg Trp Phe Val Val Trp
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Val Ala Ser Ala Ala Pro
 20 25 30
 Thr Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn
 35 40 45
 Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ala Pro Thr
 50 55 60
 Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr
 85 90 95
 Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn
 100 105 110
 Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu
 115 120 125
 Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu
 130 135 140
 Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys
 145 150 155 160

Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly
165 170 175

His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val
180 185 190

Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg
195 200 205

Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His
210 215 220

Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala
225 230 235 240

Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro
245 250 255

Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile
260 265 270

Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val
275 280 285

Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg
290 295 300

Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Thr Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys
305 310 315 320

Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala
325 330 335

Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val
340 345 350

Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys
355 360 365

Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe
370 375 380

Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr
385 390 395 400

Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp
405 410 415

Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr
420 425 430

His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Gln Ala Asn Gly Gly Phe
 435 440 445
 Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr
 450 455 460
 Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Pro Thr
 465 470 475 480
 Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys
 485 490 495
 Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His
 500 505 510
 Ile Gln Arg His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp
 515 520 525
 Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys
 530 535 540
 Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Val Thr Val Gly Arg Arg Val Ser
 545 550 555 560
 Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val
 565 570 575
 Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser Arg
 580 585 590
 Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp
 595 600 605
 Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg
 610 615 620
 Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr
 625 630 635 640
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser
 645 650 655
 His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp
 660 665 670
 Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val
 675 680 685
 Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu
 690 695 700
 Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp

ES 2 715 787 T3

705		710		715		720									
Thr	Val	Ile	His	Ala ₇₂₅	Asp	Ala	Asn	Ala	Ala ₇₃₀	Met	Phe	Ala	Gly	Leu ₇₃₅	Gly
Ala	Phe	Phe	Glu ₇₄₀	Gly	Met	Gly	Asp	Leu ₇₄₅	Gly	Arg	Ala	Val	Gly ₇₅₀	Lys	Val
Val	Met	Gly ₇₅₅	Ile	Val	Gly	Gly	Val ₇₆₀	Val	Ser	Ala	Val	Ser ₇₆₅	Gly	Val	Ser
Ser	Phe ₇₇₀	Met	Ser	Asn	Pro	Phe ₇₇₅	Gly	Ala	Leu	Ala	Val ₇₈₀	Gly	Leu	Leu	Val
Leu ₇₈₅	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala ₇₉₀	Ala	Phe	Phe	Ala	Phe ₇₉₅	Arg	Tyr	Val	Met	Arg ₈₀₀
Leu	Gln	Ser	Asn	Pro ₈₀₅	Met	Lys	Ala	Leu	Tyr ₈₁₀	Pro	Leu	Thr	Thr	Lys ₈₁₅	Glu
Leu	Lys	Asn	Pro ₈₂₀	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala ₈₂₅	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu ₈₃₀	Glu	Gly
Gly	Asp	Phe ₈₃₅	Asp	Glu	Ala	Lys	Leu ₈₄₀	Ala	Glu	Ala	Arg	Glu ₈₄₅	Met	Ile	Arg
Tyr	Met ₈₅₀	Ala	Leu	Val	Ser	Ala ₈₅₅	Met	Glu	Arg	Thr	Glu ₈₆₀	His	Lys	Ala	Lys
Lys ₈₆₅	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala ₈₇₀	Leu	Leu	Ser	Ala	Lys ₈₇₅	Val	Thr	Asp	Met	Val ₈₈₀
Met	Arg	Lys	Arg	Arg ₈₈₅	Asn	Thr	Asn	Tyr	Thr ₈₉₀	Gln	Val	Pro	Asn	Lys ₈₉₅	Asp
Gly	Asp	Ala	Asp ₉₀₀	Glu	Asp	Asp	Leu								

<210> 13
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> cepa Gc-39-R6 de VHS1
 <400> 13

Met	His	Gln	Gly	Ala ₅	Pro	Ser	Trp	Gly	Arg ₁₀	Arg	Trp	Phe	Val	Val ₁₅	Trp
Ala	Leu	Leu	Gly ₂₀	Leu	Thr	Leu	Gly	Val ₂₅	Leu	Val	Ala	Ser	Ala ₃₀	Ala	Pro
Ser	Ser	Pro ₃₅	Gly	Thr	Pro	Gly	Val ₄₀	Ala	Ala	Ala	Thr	Gln ₄₅	Ala	Ala	Asn

ES 2 715 787 T3

Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr
 50 55 60
 Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr
 85 90 95
 Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn
 100 105 110
 Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu
 115 120 125
 Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu
 130 135 140
 Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys
 145 150 155 160
 Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly
 165 170 175
 His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val
 180 185 190
 Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg
 195 200 205
 Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His
 210 215 220
 Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala
 225 230 235 240
 Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro
 245 250 255
 Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile
 260 265 270
 Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val
 275 280 285
 Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg
 290 295 300
 Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys
 305 310 315 320

Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala
 325 330 335
 Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val
 340 345 350
 Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys
 355 360 365
 Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe
 370 375 380
 Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr
 385 390 395 400
 Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp
 405 410 415
 Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr
 420 425 430
 His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly Phe
 435 440 445
 Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr
 450 455 460
 Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Pro Thr
 465 470 475 480
 Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys
 485 490 495
 Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His
 500 505 510
 Ile Gln His His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp
 515 520 525
 Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys
 530 535 540
 Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Val Thr Val Gly Arg Arg Val Ser
 545 550 555 560
 Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val
 565 570 575
 Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser Arg
 580 585 590
 Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp

ES 2 715 787 T3

595					600					605					
Gln	Gly	Pro	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Leu	Gly	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu	Arg
	610					615					620				
Leu	Thr	Arg	Asp	Ala	Ile	Glu	Pro	Cys	Thr	Val	Gly	His	Arg	Arg	Tyr
625					630					635					640
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Tyr	Val	Tyr	Phe	Glu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ser
			645						650					655	
His	Gln	Leu	Ser	Arg	Ala	Asp	Ile	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Phe	Ile	Asp
			660					665					670		
Leu	Asn	Ile	Thr	Met	Leu	Glu	Asp	His	Glu	Phe	Val	Pro	Leu	Glu	Val
		675					680					685			
Tyr	Thr	Arg	His	Glu	Ile	Lys	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Asp	Tyr	Thr	Glu
	690					695					700				
Val	Gln	Arg	Arg	Asn	Gln	Leu	His	Asp	Leu	Arg	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp
705					710					715					720
Thr	Val	Ile	His	Ala	Asp	Ala	Asn	Ala	Ala	Met	Phe	Ala	Gly	Leu	Gly
				725					730					735	
Ala	Phe	Phe	Glu	Gly	Met	Gly	Asp	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Gly	Lys	Val
			740					745					750		
Val	Met	Gly	Ile	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Val	Ser
		755					760					765			
Ser	Phe	Met	Ser	Asn	Pro	Phe	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Val
	770					775					780				
Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Phe	Phe	Ala	Phe	Arg	Tyr	Val	Met	Arg	
785				790					795					800	
Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Met	Lys	Ala	Leu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Thr	Lys	Glu
				805					810					815	
Leu	Lys	Asn	Pro	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly
			820					825					830		
Gly	Asp	Phe	Asp	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Glu	Ala	Arg	Glu	Met	Ile	Arg
		835					840					845			
Tyr	Met	Ala	Leu	Val	Ser	Ala	Met	Glu	Arg	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Lys
	850					855					860				
Lys	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Ala	Lys	Val	Thr	Asp	Met	Val
865						870					875				880

Met Arg Lys Arg Arg Asn Thr Asn Tyr Thr Gln Val Pro Asn Lys Asp
885 890 895

Gly Asp Ala Asp Glu Asp Asp Leu
900

<210> 14
<211> 904
<212> PRT
<213> cepa HG52 de VHS2

<400> 14

Met Arg Gly Gly Gly Leu Ile Cys Ala Leu Val Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Ala
20 25 30

Ser Gly Gly Val Ala Ala Thr Val Ala Ala Asn Gly Gly Pro Ala Ser
35 40 45

Arg Pro Pro Pro Val Pro Ser Pro Ala Thr Thr Lys Ala Arg Lys Arg
50 55 60

Lys Thr Lys Lys Pro Pro Lys Arg Pro Glu Ala Thr Pro Pro Pro Asp
65 70 75 80

Ala Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Ala His Leu
85 90 95

Arg Glu Ile Lys Val Glu Asn Ala Asp Ala Gln Phe Tyr Val Cys Pro
100 105 110

Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys
115 120 125

Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val
130 135 140

Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr
145 150 155 160

Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln
165 170 175

Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val
180 185 190

Ile Asp Lys Ile Asn Thr Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr
195 200 205

5

10

Val Arg Asn Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu
 210 215 220
 Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Lys Val Ala Thr Arg Thr Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala
 245 250 255
 Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp
 260 265 270
 Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp
 275 280 285
 Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr
 290 295 300
 Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ser Pro Thr Thr
 325 330 335
 Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val
 340 345 350
 Pro Lys Arg Pro Ala Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp
 355 360 365
 Glu Met Leu Arg Ala Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp
 370 375 380
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Arg Asp Ala Arg Glu Ala Ile
 405 410 415
 Asp Arg Met Phe Ala Arg Lys Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly
 420 425 430
 Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Thr Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln
 435 440 445
 Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr Val Arg Glu Tyr Met
 450 455 460
 Arg Glu Gln Asp Arg Lys Pro Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Arg
 465 470 475 480
 Glu Ala Pro Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser

ES 2 715 787 T3

485								490				495			
Ser	Ile	Glu	Phe 500	Ala	Arg	Leu	Gln	Phe 505	Thr	Tyr	Asn	His	Ile 510	Gln	Arg
His	Val	Asn 515	Asp	Met	Leu	Gly	Arg 520	Ile	Ala	Val	Ala	Trp 525	Cys	Glu	Leu
Gln	Asn 530	His	Glu	Leu	Thr	Leu 535	Trp	Asn	Glu	Ala	Arg 540	Lys	Leu	Asn	Pro
Asn 545	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala 550	Thr	Val	Gly	Arg	Arg 555	Val	Ser	Ala	Arg	Met 560
Leu	Gly	Asp	Val	Met 565	Ala	Val	Ser	Thr	Cys 570	Val	Pro	Val	Ala	Pro 575	Asp
Asn	Val	Ile	Val 580	Gln	Asn	Ser	Met	Arg 585	Val	Ser	Ser	Arg	Pro 590	Gly	Thr
Cys	Tyr	Ser 595	Arg	Pro	Leu	Val	Ser 600	Phe	Arg	Tyr	Glu	Asp 605	Gln	Gly	Pro
Leu	Ile 610	Glu	Gly	Gln	Leu	Gly 615	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu 620	Arg	Leu	Thr	Arg
Asp 625	Ala	Leu	Glu	Pro	Cys 630	Thr	Val	Gly	His	Arg 635	Arg	Tyr	Phe	Ile	Phe 640
Gly	Gly	Gly	Tyr	Val 645	Tyr	Phe	Glu	Glu	Tyr 650	Ala	Tyr	Ser	His	Gln 655	Leu
Ser	Arg	Ala	Asp 660	Val	Thr	Thr	Val	Ser 665	Thr	Phe	Ile	Asp	Leu 670	Asn	Ile
Thr	Met	Leu 675	Glu	Asp	His	Glu	Phe 680	Val	Pro	Leu	Glu	Val 685	Tyr	Thr	Arg
His	Glu 690	Ile	Lys	Asp	Ser	Gly 695	Leu	Leu	Asp	Tyr	Thr 700	Glu	Val	Gln	Arg
Arg 705	Asn	Gln	Leu	His	Asp 710	Leu	Arg	Phe	Ala	Asp 715	Ile	Asp	Thr	Val	Ile 720
Arg	Ala	Asp	Ala	Asn 725	Ala	Ala	Met	Phe	Ala 730	Gly	Leu	Cys	Ala	Phe 735	Phe
Glu	Gly	Met	Gly 740	Asp	Leu	Gly	Arg	Ala 745	Val	Gly	Lys	Val	Val 750	Met	Gly
Val	Val	Gly 755	Gly	Val	Val	Ser	Ala 760	Val	Ser	Gly	Val	Ser 765	Ser	Phe	Met

Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly
770 775 780

Leu Val Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Leu Gln Leu Gln Arg
785 790 795 800

Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu Lys Thr
805 810 815

Ser Asp Pro Gly Gly Val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly
820 825 830

Gly Gly Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg
835 840 845

Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Arg
850 855 860

Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ser Lys Val Thr Asn Met Val
865 870 875 880

Leu Arg Lys Arg Asn Lys Ala Arg Tyr Ser Pro Leu His Asn Glu Asp
885 890 895

Glu Ala Gly Asp Glu Asp Glu Leu
900

<210> 15
<211> 904
<212> PRT
<213> cepa 333 de VHS2
<400> 15

Met Arg Gly Gly Gly Leu Ile Cys Ala Leu Val Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Ala
20 25 30

Ser Gly Gly Val Ala Ala Thr Val Ala Ala Asn Gly Gly Pro Ala Ser
35 40 45

Arg Pro Pro Pro Val Pro Ser Pro Ala Thr Thr Lys Ala Arg Lys Arg
50 55 60

Lys Thr Lys Lys Pro Pro Lys Arg Pro Glu Ala Thr Pro Pro Pro Asp
65 70 75 80

Ala Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Ala His Leu
85 90 95

Arg Glu Ile Lys Val Glu Asn Ala Asp Ala Gln Phe Tyr Val Cys Pro
 100 105 110
 Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys
 115 120 125
 Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val
 130 135 140
 Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln
 165 170 175
 Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val
 180 185 190
 Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr
 195 200 205
 Val Arg Asn Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu
 210 215 220
 Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Lys Val Ala Thr Arg Thr Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala
 245 250 255
 Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Thr Cys Ile Val Glu Glu Val Asp
 260 265 270
 Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp
 275 280 285
 Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr
 290 295 300
 Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ser Pro Thr Thr
 325 330 335
 Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val
 340 345 350
 Pro Lys Arg Pro Ala Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp
 355 360 365
 Glu Met Leu Arg Ala Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp

ES 2 715 787 T3

370	375	380
Ala 385	Ile Ser Thr Thr Phe 390	Thr Thr Asn Leu Thr 395
Gln Tyr Ser Leu Ser 400		
Arg Val Asp Leu Gly 405	Asp Cys Ile Gly Arg 410	Asp Ala Arg Glu Ala 415
Ile		
Asp Arg Met Phe 420	Ala Arg Lys Tyr Asn 425	Ala Thr His Ile Lys 430
Val Gly		
Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Thr 440	Gly Gly Phe Leu Ile 445	Ala Tyr Gln
Pro Leu 450	Leu Ser Asn Thr Leu 455	Ala Glu Leu Tyr Val 460
Arg Glu Gln Asp Arg Lys 470	Pro Arg Asn Ala Thr 475	Pro Ala Pro Leu Arg 480
Glu Ala Pro Ser Ala 485	Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr 490	Thr Ser 495
Ser Ile Glu Phe 500	Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His 505	Ile Gln Arg 510
His Val Asn 515	Asp Met Leu Gly Arg 520	Ile Ala Val Ala Trp 525
Cys Glu Leu		
Gln Asn His Glu Leu Thr 530	Leu Trp Asn Glu Ala Arg 540	Lys Leu Asn Pro
Asn Ala Ile Ala Ser Ala 550	Thr Val Gly Arg Arg 555	Val Ser Ala Arg Met 560
Leu Gly Asp Val Met 565	Ala Val Ser Thr Cys 570	Val Pro Val Ala Pro Asp 575
Asn Val Ile Val 580	Gln Asn Ser Met Arg 585	Val Ser Ser Arg Pro 590
Gly Thr		
Cys Tyr Ser 595	Arg Pro Leu Val Ser 600	Phe Arg Tyr Glu Asp 605
Leu Ile Glu Gly Gln Leu 610	Gly Glu Asn Asn Glu Leu 620	Arg Leu Thr Arg
Asp Ala Leu Glu Pro Cys 630	Thr Val Gly His Arg 635	Arg Tyr Phe Ile Phe 640
Gly Gly Gly Tyr Val 645	Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His 650	Gln Leu 655

Ser Arg Ala Asp Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile
 660 665 670
 Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Gly Val Tyr Thr Arg
 675 680 685
 His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg
 690 695 700
 Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile
 705 710 715 720
 Arg Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Cys Ala Phe Phe
 725 730 735
 Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val Met Gly
 740 745 750
 Val Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser Ser Phe Met
 755 760 765
 Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly
 770 775 780
 Leu Val Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Leu Gln Leu Gln Arg
 785 790 795 800
 Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu Lys Thr
 805 810 815
 Ser Asp Pro Gly Gly Val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly
 820 825 830
 Gly Gly Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg
 835 840 845
 Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Arg
 850 855 860
 Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ser Lys Val Thr Asn Met Val
 865 870 875 880
 Leu Arg Lys Arg Asn Lys Ala Arg Tyr Ser Pro Leu His Asn Glu Asp
 885 890 895
 Glu Ala Gly Asp Glu Asp Glu Leu
 900

<210> 16

<211> 901

<212> PRT

<213> cepa MMA de VHS2

<400> 16

Met Arg Gly Gly Gly Leu Ile Cys Ala Leu Val Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Ala Ser Gly Gly
20 25 30

Val Ala Ala Thr Val Ala Ala Asn Gly Gly Pro Ala Ser Arg Pro Pro
35 40 45

Pro Val Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Ala Arg Lys Arg Lys Thr Lys
50 55 60

Lys Pro Pro Glu Arg Pro Glu Ala Thr Pro Pro Pro Asp Ala Asn Ala
65 70 75 80

Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Ala His Leu Arg Glu Ile
85 90 95

Lys Val Glu Asn Ala Asp Ala Gln Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr
100 105 110

Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg
115 120 125

Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu
130 135 140

Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly
165 170 175

Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys
180 185 190

Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn
195 200 205

Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met
210 215 220

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

Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg
245 250 255

Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser

ES 2 715 787 T3

260										265					270						
Val	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Glu	Phe	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Asp	Phe	Val	Tyr						
		275					280					285									
Met	Ser	Pro	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ser	His	Thr	Glu	His	Thr						
	290					295					300										
Ser	Tyr	Ala	Ala	Asp	Arg	Phe	Lys	Gln	Val	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Arg						
305					310					315					320						
Asp	Leu	Thr	Thr	Lys	Ala	Gln	Ala	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Arg	Asn	Leu						
				325					330					335							
Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Thr	Val	Ala	Trp	Asp	Trp	Val	Pro	Lys	Arg						
			340					345					350								
Pro	Ala	Val	Cys	Thr	Met	Thr	Lys	Trp	Gln	Glu	Val	Asp	Glu	Met	Leu						
		355					360					365									
Arg	Ala	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Phe	Ser	Ser	Asp	Ala	Ile	Ser						
	370					375					380										
Thr	Thr	Phe	Thr	Thr	Asn	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Arg	Val	Asp						
385					390					395					400						
Leu	Gly	Asp	Cys	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Arg	Glu	Ala	Ile	Asp	Arg	Met						
				405					410					415							
Phe	Ala	Arg	Lys	Tyr	Asn	Ala	Thr	His	Ile	Lys	Val	Gly	Gln	Pro	Gln						
			420					425					430								
Tyr	Tyr	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Phe	Leu	Ile	Ala	Tyr	Gln	Pro	Leu	Leu						
		435					440					445									
Ser	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Arg	Glu	Tyr	Met	Arg	Glu	Gln						
	450					455					460										
Asp	Arg	Lys	Pro	Arg	Asn	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg	Glu	Ala	Pro						
465					470					475					480						
Ser	Ala	Asn	Ala	Ser	Val	Glu	Arg	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu						
				485					490					495							
Phe	Ala	Arg	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asn	His	Ile	Gln	Arg	His	Val	Asn						
			500					505					510								
Asp	Met	Leu	Gly	Arg	Ile	Ala	Val	Ala	Trp	Cys	Glu	Leu	Gln	Asn	His						
		515					520					525									
Glu	Leu	Thr	Leu	Trp	Asn	Glu	Ala	Arg	Lys	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Ile						
	530					535					540										

ES 2 715 787 T3

Ala Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp
545 550 555 560

Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Pro Asp Asn Val Ile
565 570 575

Val Gln Asn Ser Met Arg Val Ser Ser Arg Pro Gly Thr Cys Tyr Ser
580 585 590

Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln Gly Pro Leu Ile Glu
595 600 605

Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg Asp Ala Leu
610 615 620

Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Ile Phe Gly Gly Gly
625 630 635 640

Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His Gln Leu Ser Arg Ala
645 650 655

Asp Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu
660 665 670

Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg His Glu Ile
675 680 685

Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln
690 695 700

Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile Arg Ala Asp
705 710 715 720

Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Cys Ala Phe Phe Glu Gly Met
725 730 735

Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val Met Gly Val Val Gly
740 745 750

Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser Ser Phe Met Ser Asn Pro
755 760 765

Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Val Ala
770 775 780

Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Leu Gln Leu Gln Arg Asn Pro Met
785 790 795 800

Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu Lys Thr Ser Asp Pro
805 810 815

Gly Gly val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly Gly Gly Phe
820 825 830
Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg Tyr Met Ala
835 840 845
Leu val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Arg Lys Lys Gly
850 855 860
Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ser Lys Val Thr Asn Met Val Leu Arg Lys
865 870 875 880
Arg Asn Lys Ala Arg Tyr Ser Pro Leu His Asn Glu Asp Glu Ala Gly
885 890 895
Asp Glu Asp Glu Leu
900

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> epítipo de unión a Mab 2c

<400> 17

Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr
1 5 10 15

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> VHS

<400> 18

Gln val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> VHS

<400> 19

val Trp Phe Gly His Arg Tyr
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> VHS

<400> 20

Tyr Ser Gln Phe Met Gly

1

5

5 <210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> VHS

10 <400> 21

Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu
1 5

15 <210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> VHS

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)

25 <400> 22

Tyr Ser Gln Phe Met Gly Asx Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu
1 5 10

30 <210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> VHS

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(5)

<400> 23

Phe Glu Asp Asx Asx Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu
1 5 10

40 <210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

45 <220>
<223> Y296N

<400> 24

50 **gggacatggtt cacaaagtc**

19

55 <210> 25
<211> 19
<212> ADN

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> M296F	
5	<400> 25	
	gggacatgaa cacaaagtc	19
10	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> M297L	
	<400> 26	
20	acggggacag gtacacaaa	19
	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> M297T	
30	<400> 27	
	aacggggacg tgtacacaa	19
	<210> 28	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
40	<223> M297v	
	<400> 28	
	acggggacac gtacacaaa	19
45	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> S268A	
	<400> 29	
55	aaaacggggc catgtacac	19
	<210> 30	
	<211> 19	

	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> P299S	
	<400> 30	
10	cgtaaaacga ggacatgta	19
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> F300Y	
	<400> 31	
20	tagccgtaat acggggaca	19
	<210> 32	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> F300I	
30	<400> 32	
	tagccgtaaa tcggggaca	19
35	<210> 33	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Y30IN	
	<400> 33	
45	gtagccgtta aacgggg	17
	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> G302R	
55	<400> 34	
	cccggtagcg gtaaaacgg	19
	<210> 35	

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> G302V	
	<400> 35	
10	tcccggtaga cgtaaaacg	19
	<210> 36	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Y303N	
20	<400> 36	
	acccctcccg gttgccgtaa aacg	24
	<210> 37	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> R304G	
	<400> 37	
	acccctcccc gtagccgta	19
35	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> artificial	
	<220>	
	<223> R304L	
	<400> 38	
45	gaccctcca gtagccgt	19
	<210> 39	
	<211> 23	
50	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> E305K	
55	<400> 39	
	gtgcgacccc ttccggtagc cgt	23

<210> 40
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> G306A
 <400> 40
 10
 gtgtgcgacg cctcccggg 19
 <210> 41
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> G306V
 20
 <400> 41
 gtgtgcgaca cctcccggg 19
 25
 <210> 42
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> S307A
 <400> 42
 35
 cgggtgtgcgc cccctcccg 19
 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> VHS
 40
 <400> 43
 45
 Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> VHS
 50
 <400> 44
 Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala
 1 5 10 15
 Pro Val Pro Phe Glu
 20

ES 2 715 787 T3

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> VHS
 5 <400> 45

 Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg
 1 5
 10 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> VHS
 15 <400> 46

 Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Ala
 20 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> VHS
 <400> 47
 25 Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr
 1 5 10
 30 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> VHS
 <400> 48
 35 Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr
 1 5 10 15
 40 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> VHS
 <400> 49
 45 Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His
 1 5
 50 <210> 50
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> VHS
 <400> 50

		Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly 1 5
5	<210> 51 <211> 7 <212> PRT <213> VHS	
10	<400> 51	
		Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly 1 5
15	<210> 52 <211> 12 <212> PRT <213> artificial	
20	<220> <223> péptido de unión diseñado por vía informática	
	<400> 52	
25		Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Phe Glu Asp Phe 1 5 10
30	<210> 53 <211> 7 <212> PRT <213> VHS	
	<400> 53	
35		Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu 1 5
40	<210> 54 <211> 4 <212> PRT <213> VHS	
	<400> 54	
		Phe Glu Asp Phe 1

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a la glicoproteína gB de VHS1 y VHS2 que comprende las regiones determinantes de la complementariedad que se muestran en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, en las que el anticuerpo tiene una constante de disociación K_D como máximo de 40 nM, preferentemente como máximo de 30 nM, más preferentemente como máximo de 20 nM, incluso más preferentemente como máximo de 15 nM, como máximo de 13 nM y como máximo de 10 nM.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo en una concentración como máximo de 20 nM, preferentemente como máximo de 16 nM, más preferentemente como máximo de 12 nM, como máximo de 10 nM, y lo más preferentemente como máximo de 8 nM, es capaz de neutralizar una cantidad definida de VHS de 100 TCID₅₀ a un 100 %.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en las que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 70 % con respecto a los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 de SEQ ID NO: 9 y en las posiciones 1 a 23, 40 a 54, 62 a 93, y 103 a 113 de SEQ ID NO: 10.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos un 80 %, preferentemente un 100 % con respecto a los restos de aminoácido que se muestran en las posiciones 1 a 30, 38 a 51, 68 a 99, y 112 a 122 de SEQ ID NO: 7 y en las posiciones 1 a 23, 41 a 55, 63 a 94, y 104 a 114 de SEQ ID NO: 8.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que el anticuerpo es un anticuerpo divalente o multivalente.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en las que el anticuerpo está conjugado con un resto efector, un resto terapéutico, o una etiqueta detectable.
7. Composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Vector de expresión, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Célula hospedadora, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso como un fármaco.
11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en un método para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad asociada con el VHS en un sujeto.
12. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la enfermedad asociada con el VHS está acompañada por una o más de las siguientes características:
 - (a) presencia de una recidiva oral,
 - (b) presencia de una recidiva genital,
 - (c) eccema herpético,
 - (d) herpes neonatal,
 - (e) deficiencia inmunológica, pacientes inmunocomprometidos,
 - (f) resistencia contra un agente virustático,
 - (g) encefalitis,
 - (h) meningitis,
 - (i) meningoencefalitis,
 - (j) infecciones oculares, y/o
 - (k) infecciones por VHS generalizadas.

Fig. 1

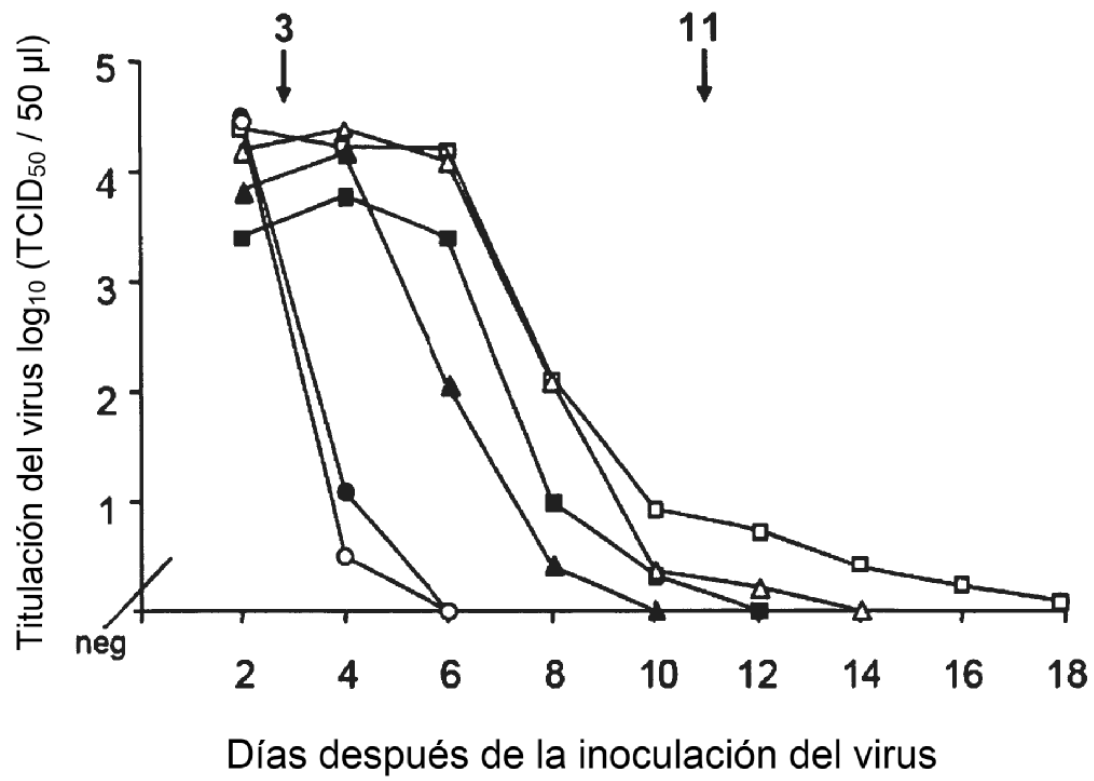


Fig 2A

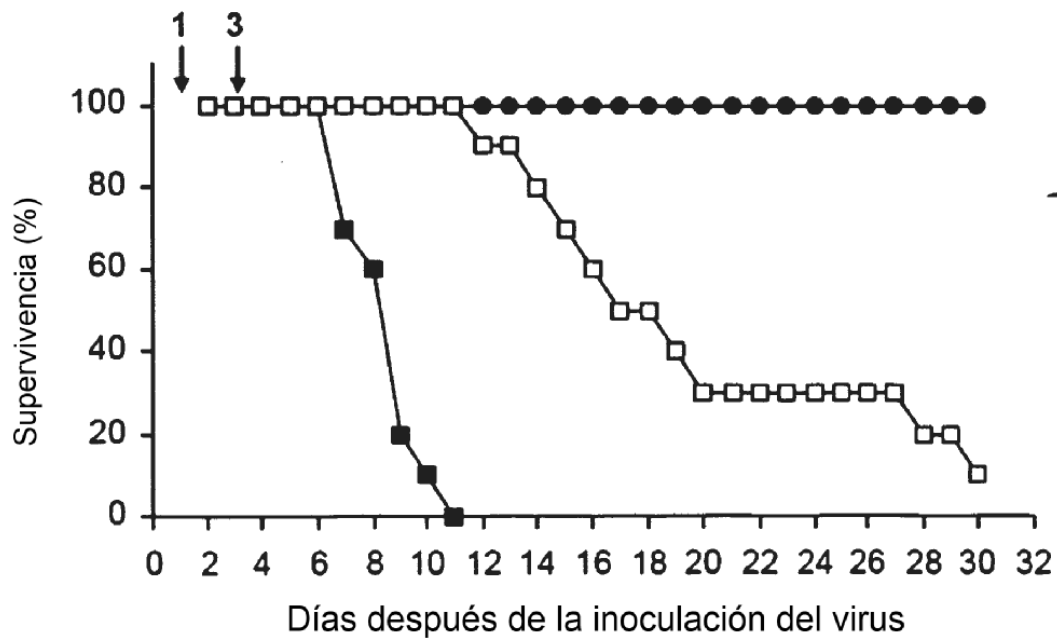


Fig 2B

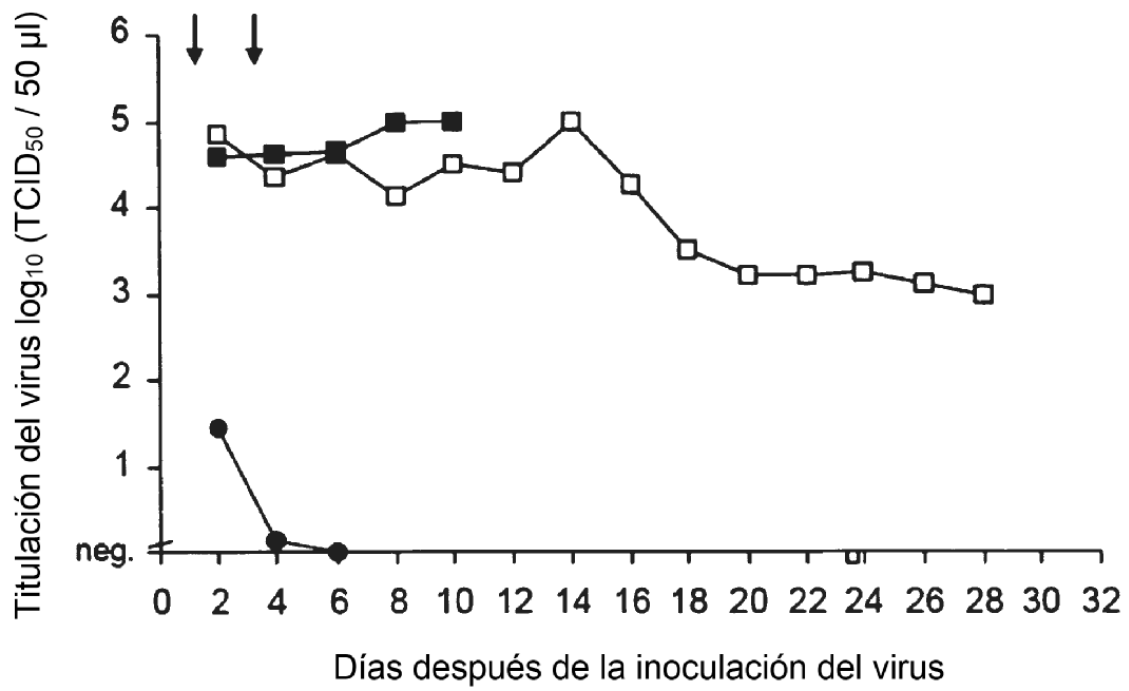


Fig. 3

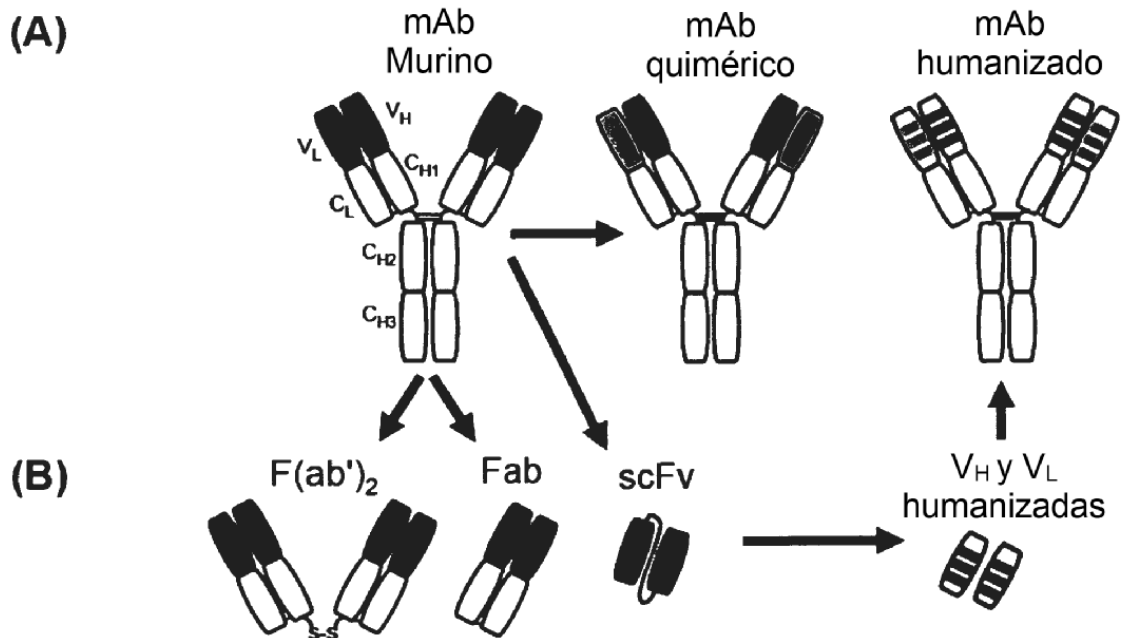


Fig. 5

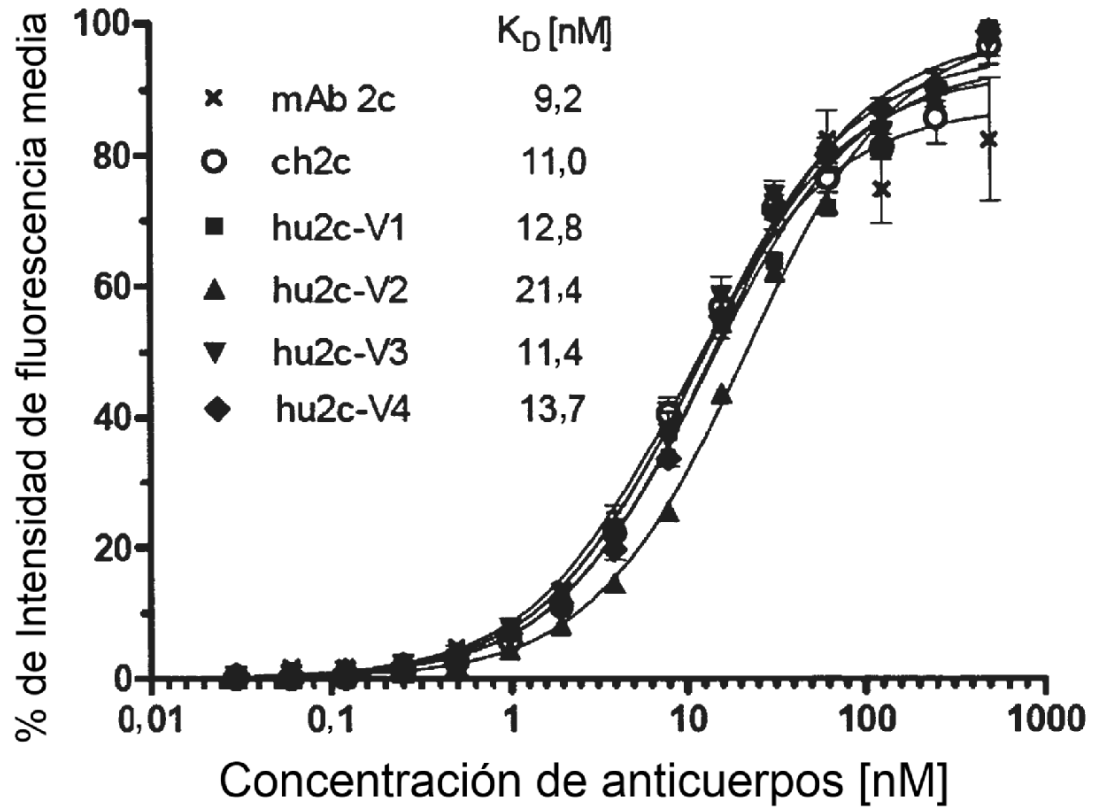


Fig. 6

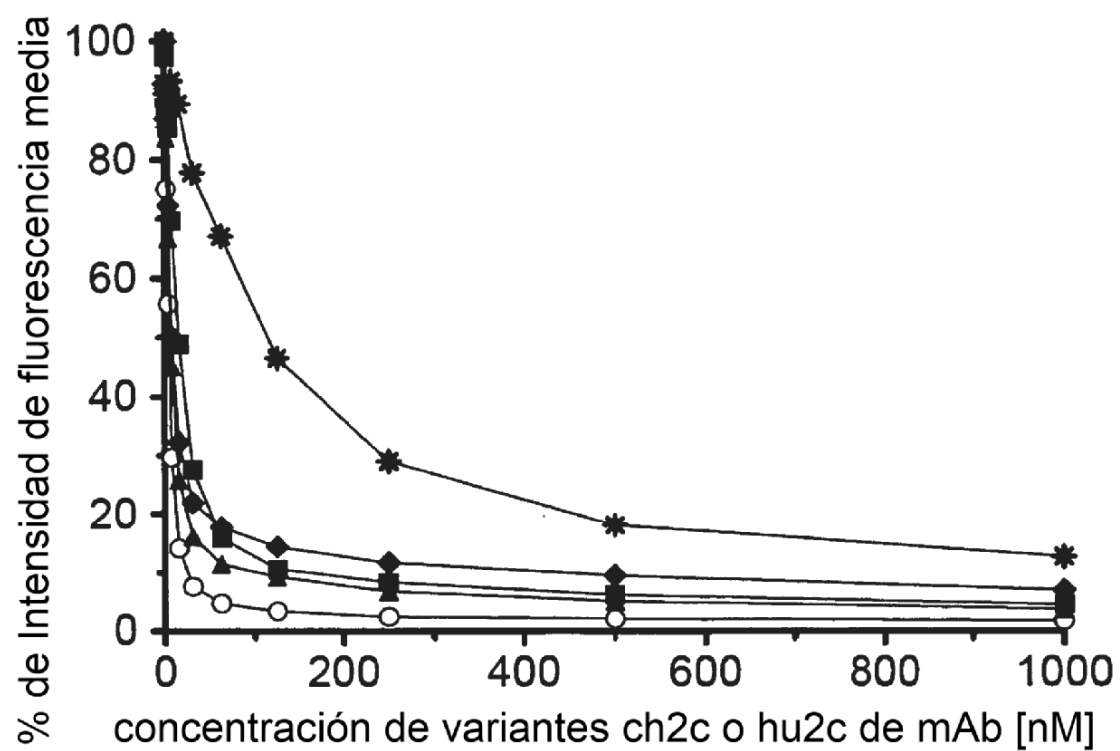


Fig. 7

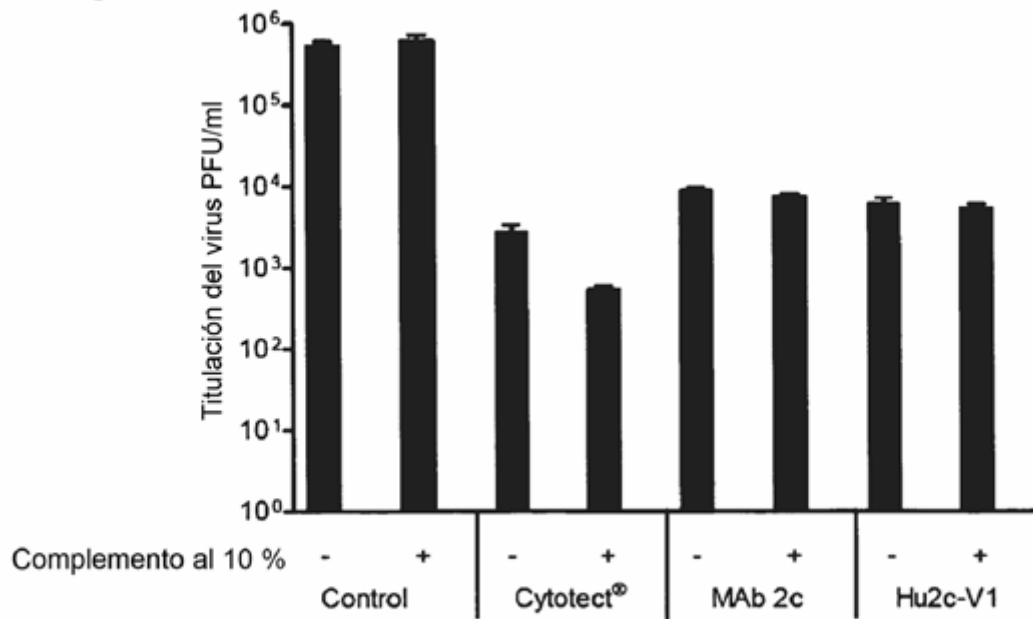


Fig. 8

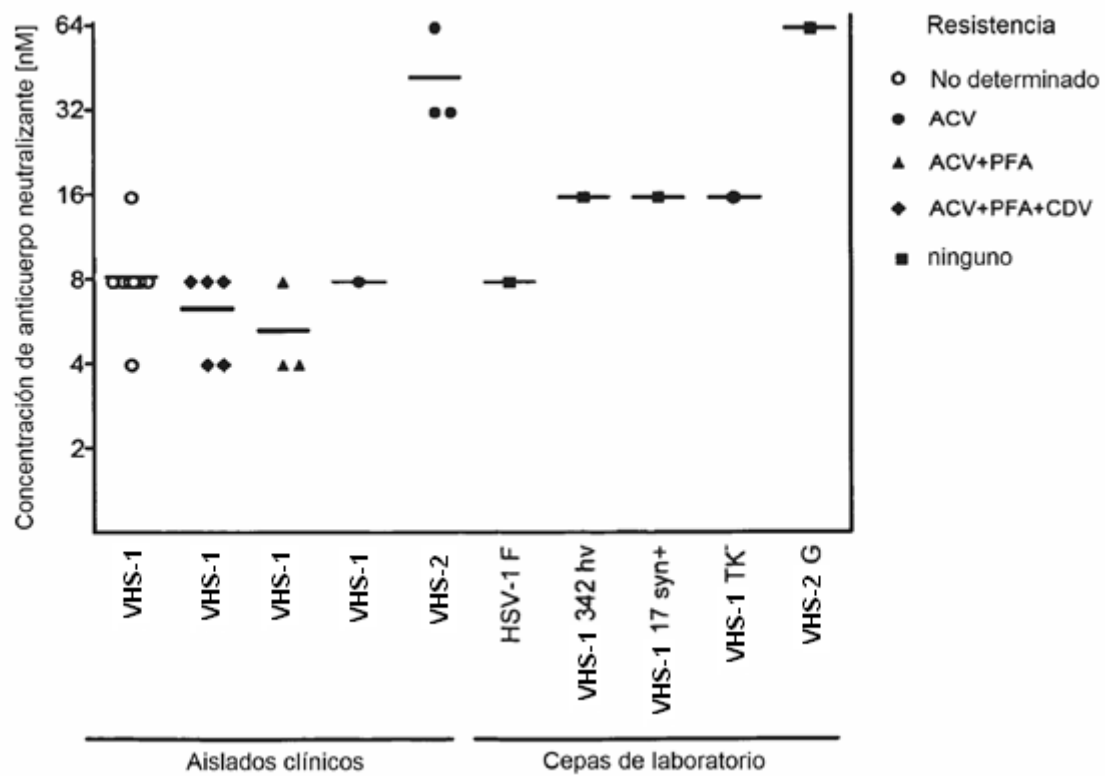


Fig. 9

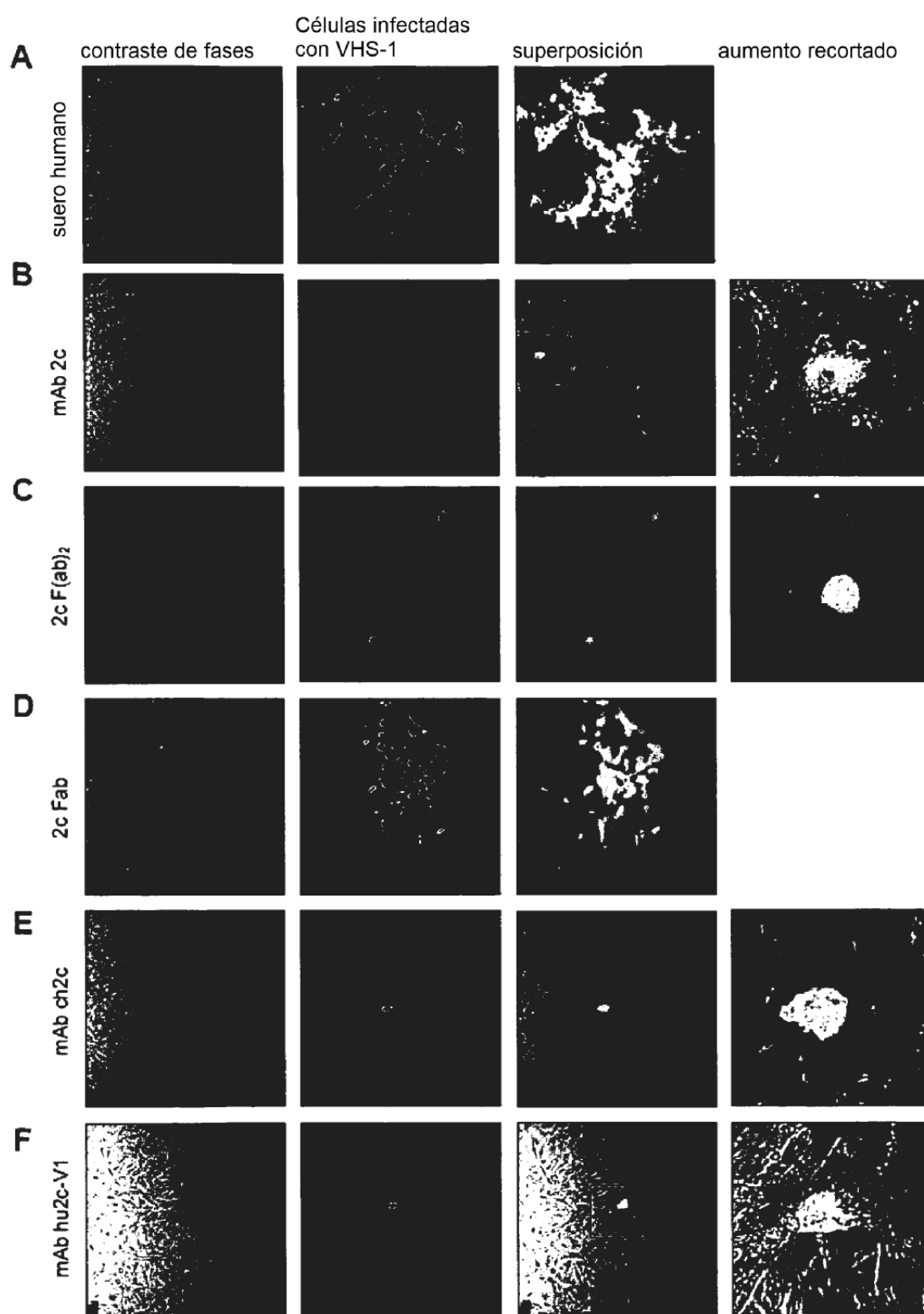


Fig. 10

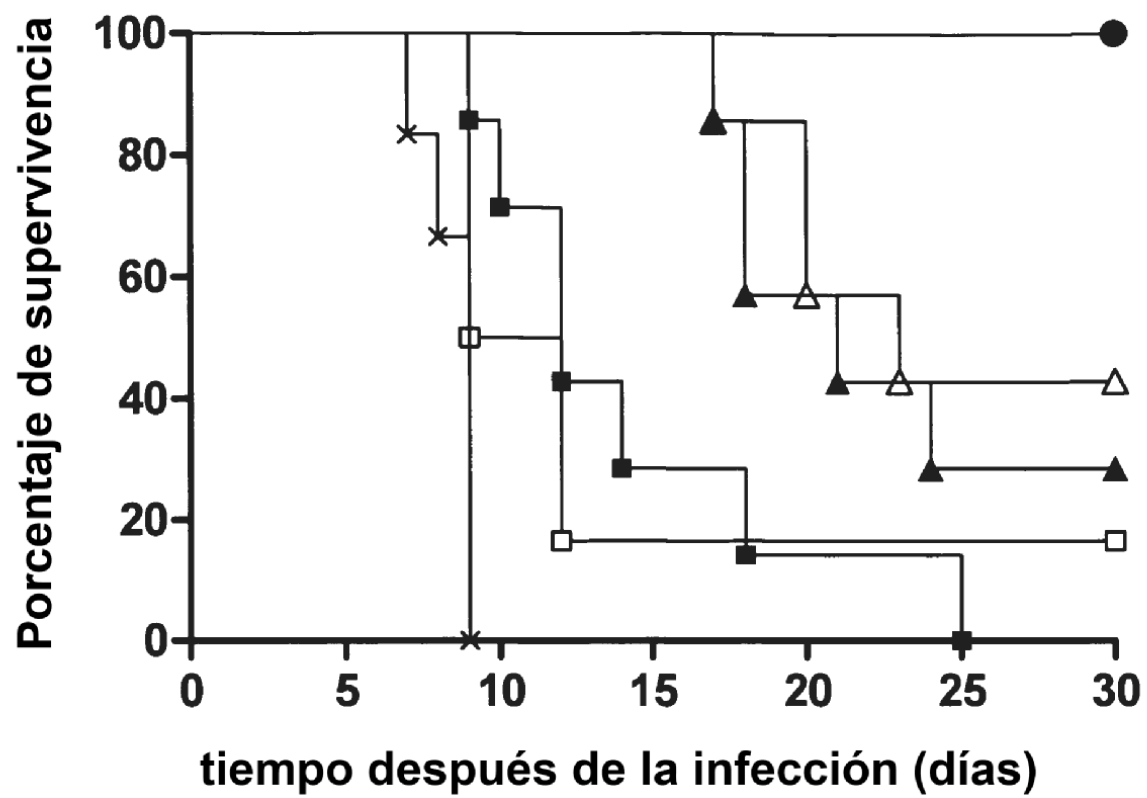


Fig. 11

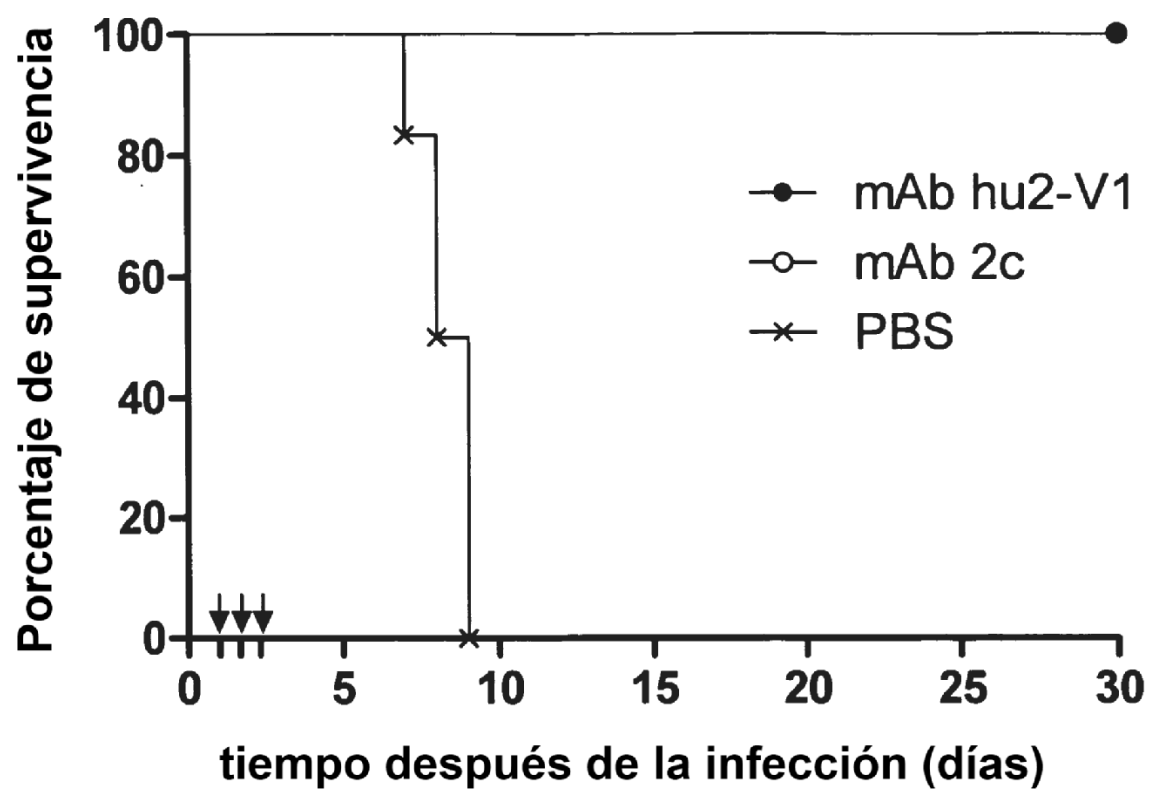
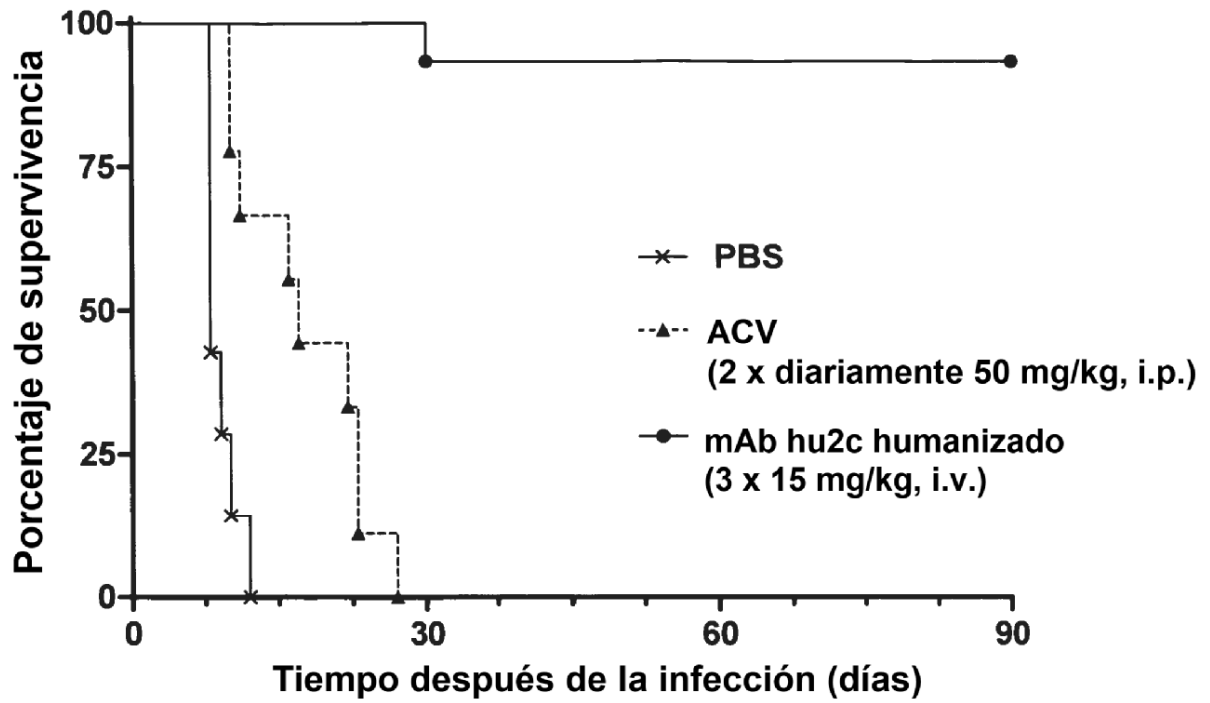


Fig. 12



006

006

006

006

Fig. 13B

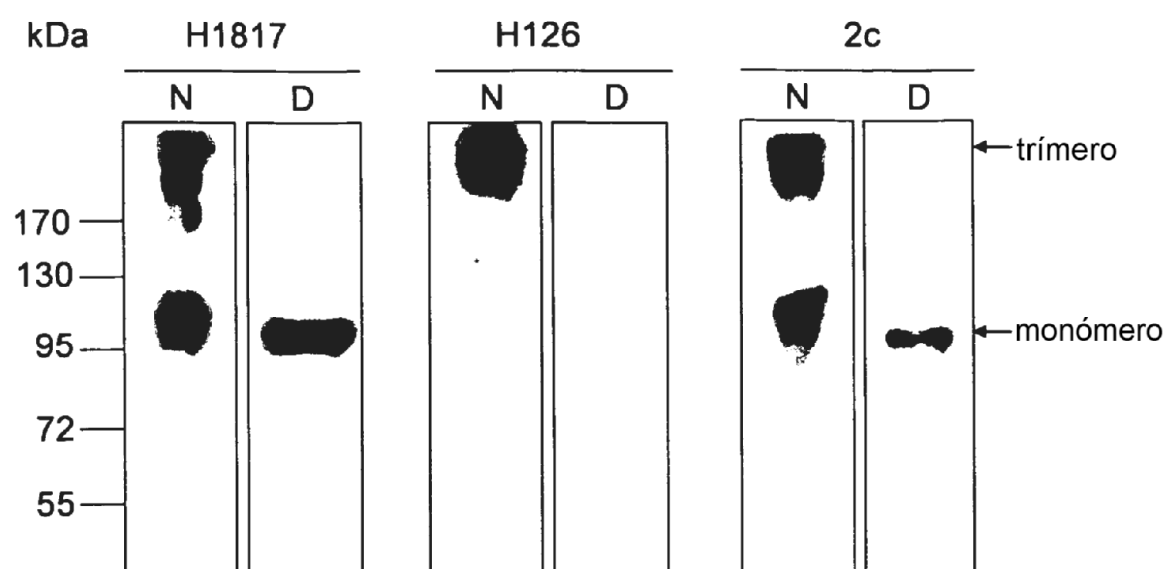


Fig. 14A

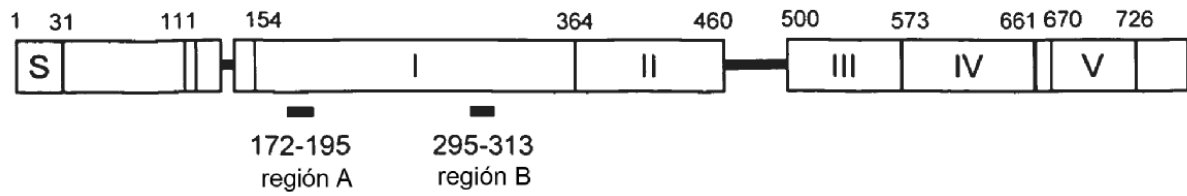


Fig. 14B

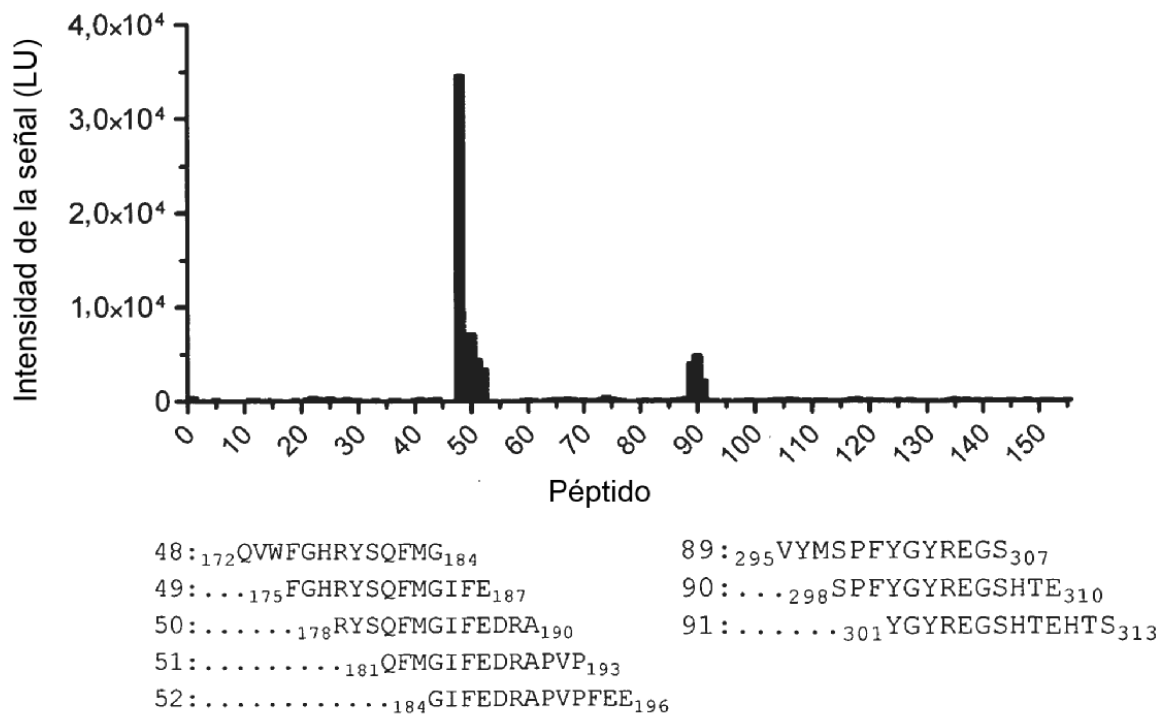


Fig. 15



Fig. 16

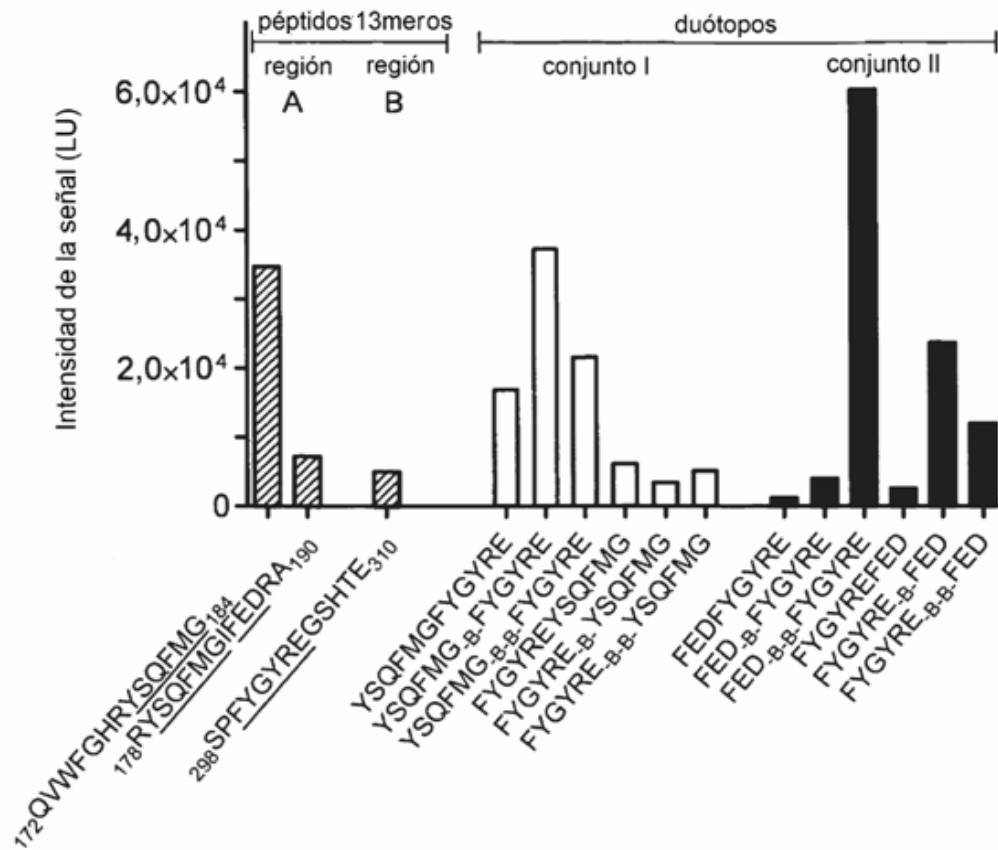


Fig. 17

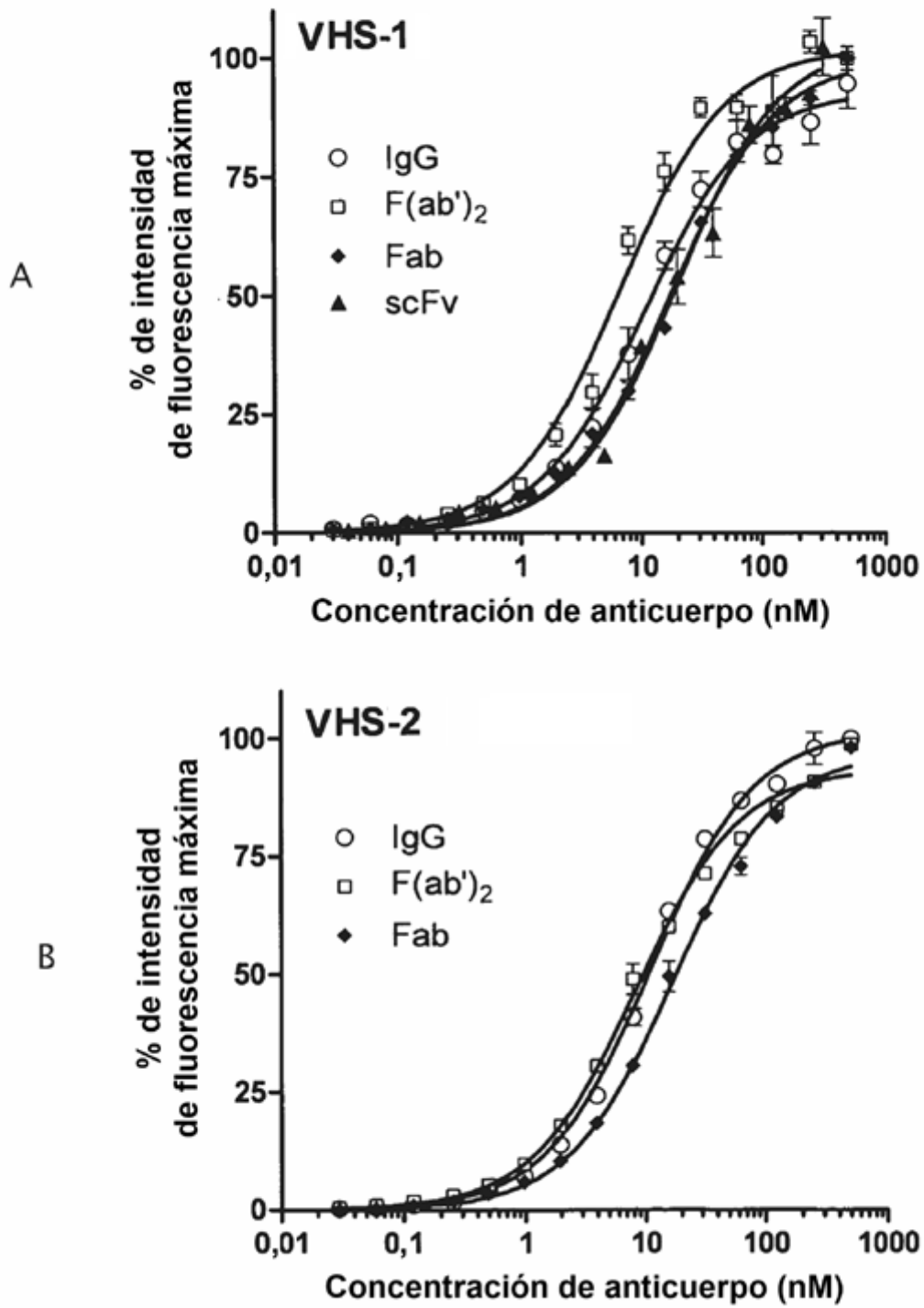


Fig. 18A

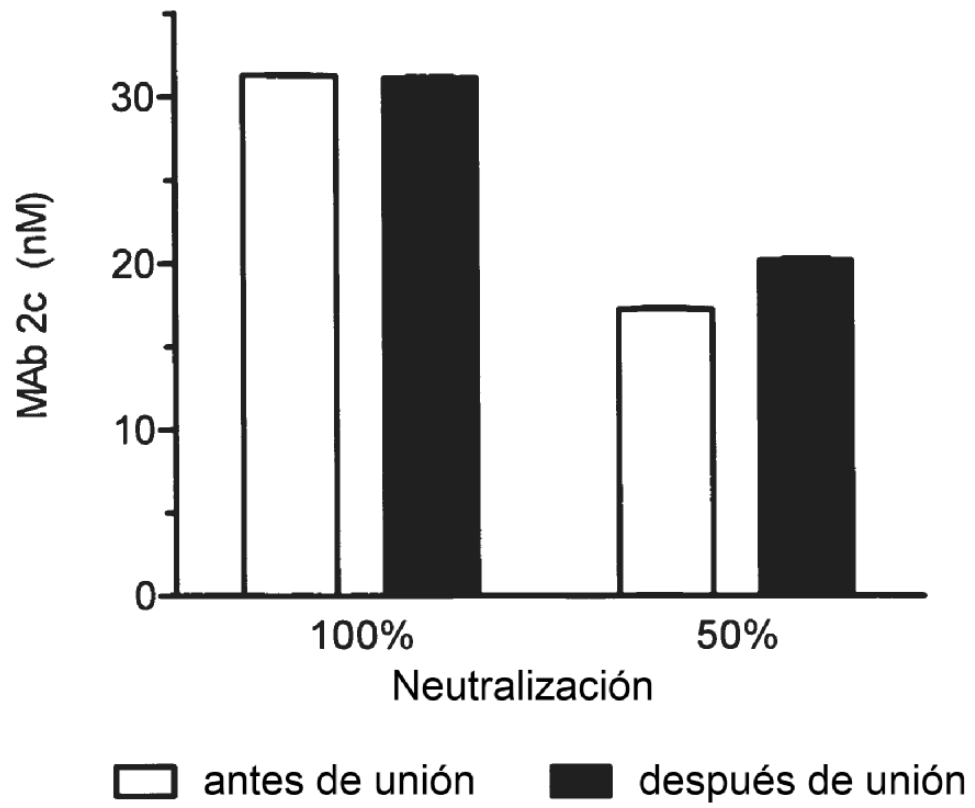


Fig. 18B

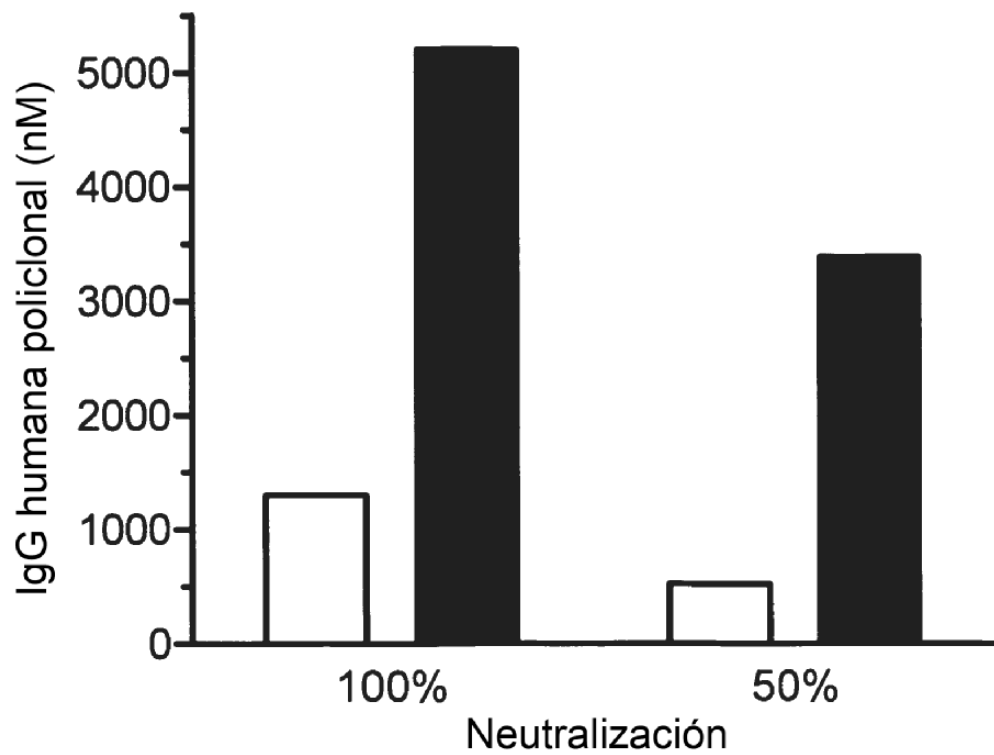


Fig. 19A

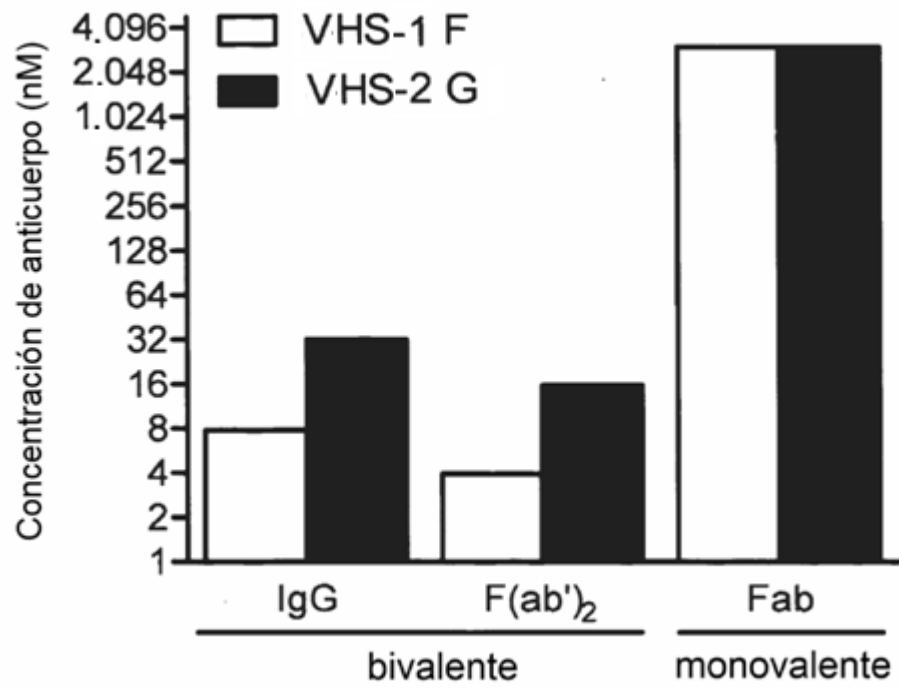


Fig. 19B

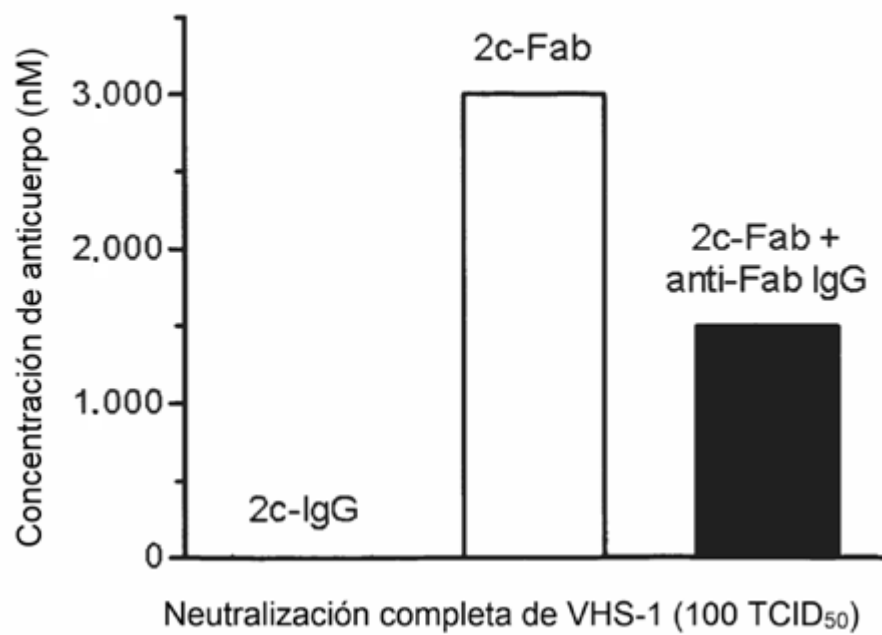


Fig. 20

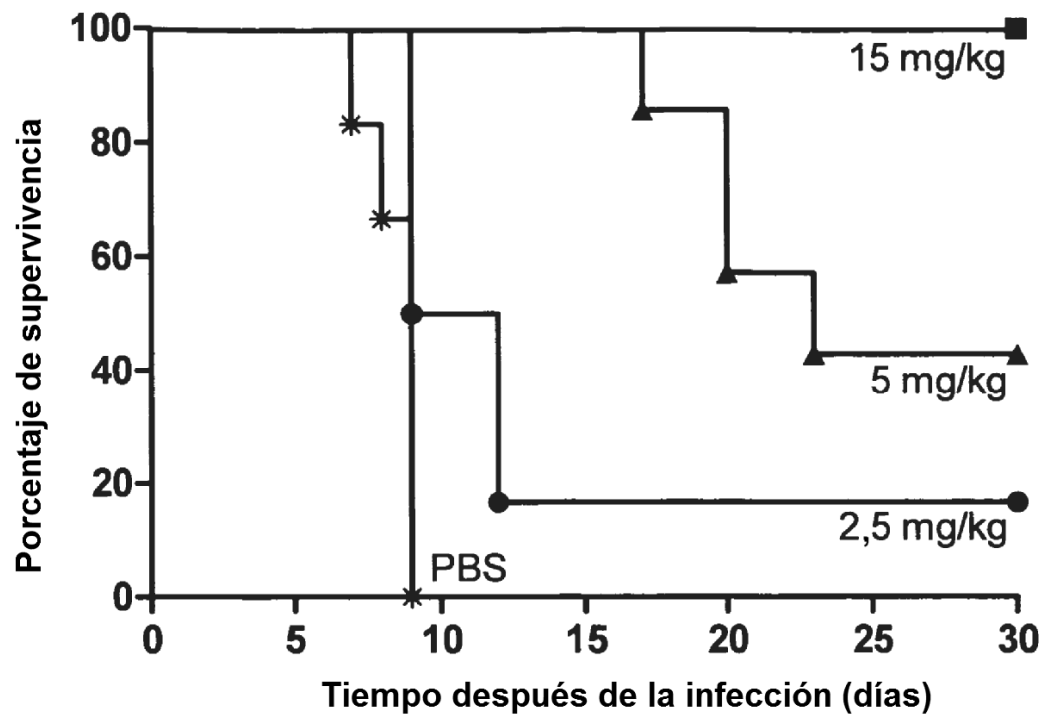


Fig. 21

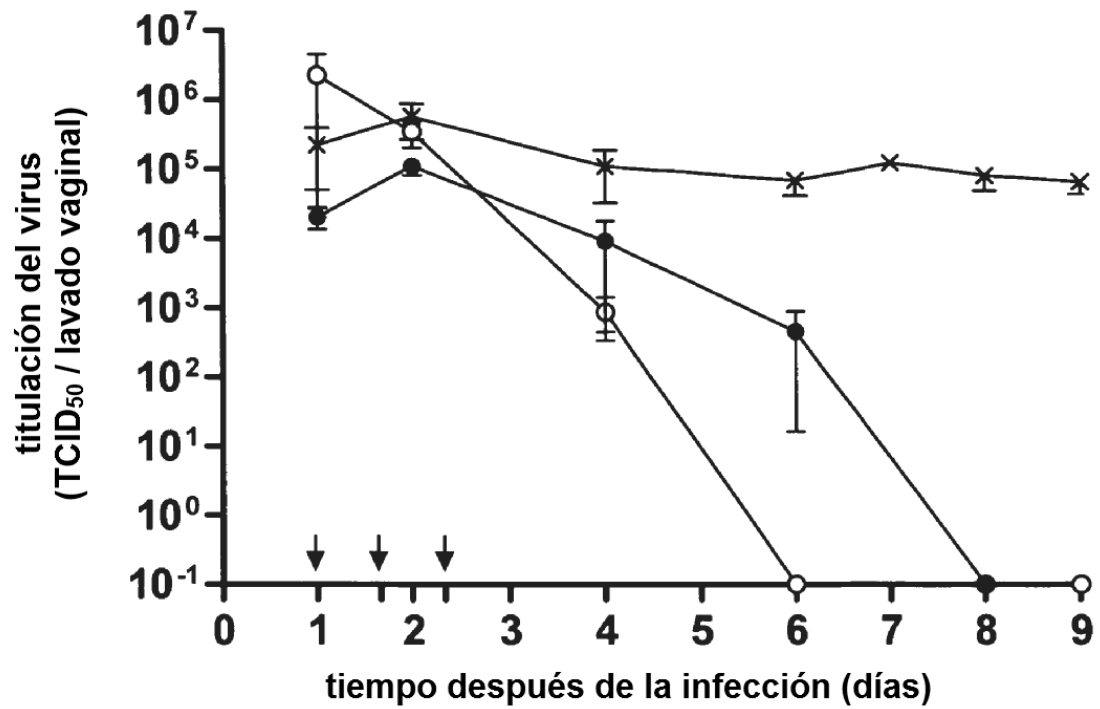
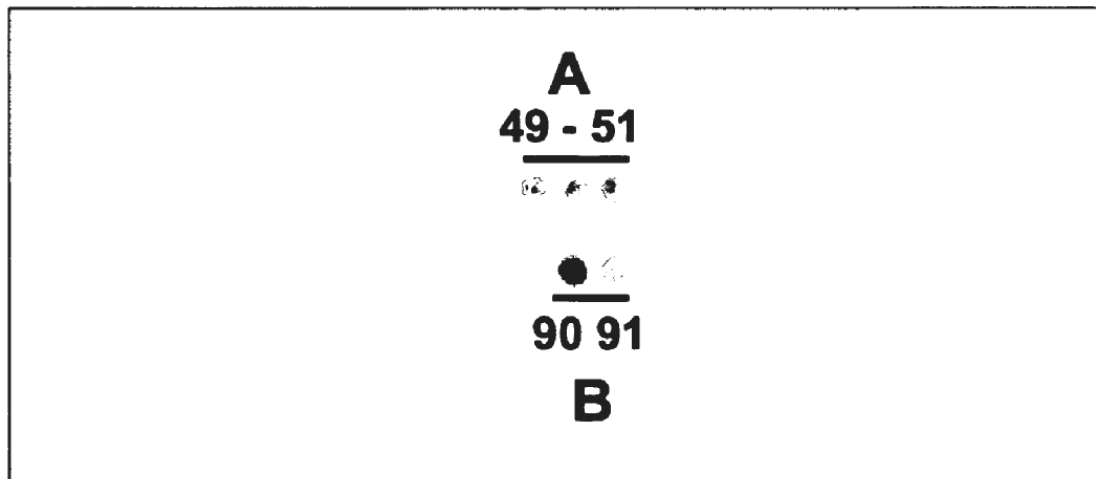


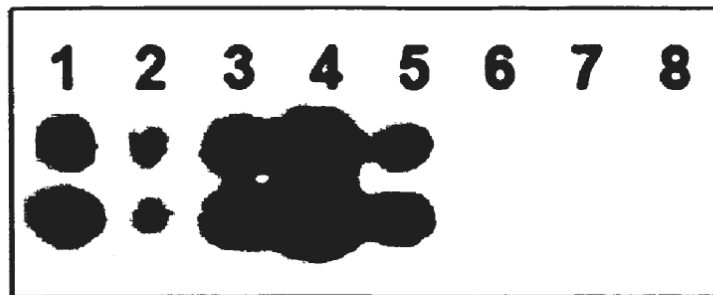
Fig. 22



49: ¹⁷⁵FGHRYSQFMGIFEDR¹⁸⁹
 50: ¹⁷⁸RYSQFMGIFEDRAPV¹⁹²
 51: ¹⁸¹QFMGIFEDRAPVPFE¹⁹⁵

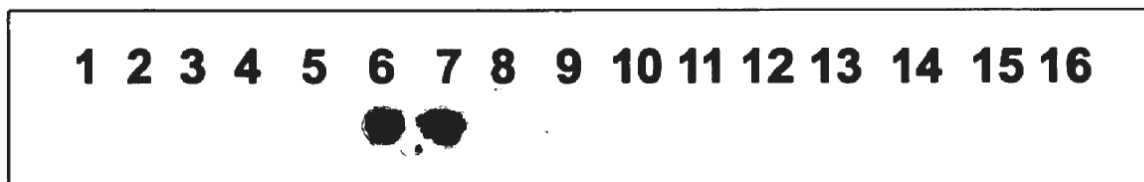
90: ²⁹⁸SPFYGYREGSHTENT³¹²
 91: ³⁰¹YGYREGSHTENTSYA³¹⁵

Fig. 23



1: ²⁹⁵YMSP**FYGY**REGSH
 2: ²⁹⁶MSP**FYGY**REGSHT
 3: SP**FYGY**REGSHTTE
 4: **P**FYGYREGSHTTEH
 5: **FYGY**REGSHTTEHT
 6: YGYREGSHTTEHTS
 7: GYREGSHTTEHTSY
 8: YREGSHTTEHTSYA₃₁₅

Fig. 24



1: ²⁹⁵ VYMSPF	5: ²⁹⁹ P FYGYR	9: ³⁰³ YREGSH	13: ³⁰⁷ SHTTEHT
2: YMSPFY	6: FYGYRE	10: REGSHT	14: HTEHTS
3: MSPFYG	7: YGYREG	11: EGSHTTE	15: TEHTSY
4: SPFYGY	8: GYREGS	12: GSHTTEH	16: EHTSYA ₃₁₅

Fig. 25

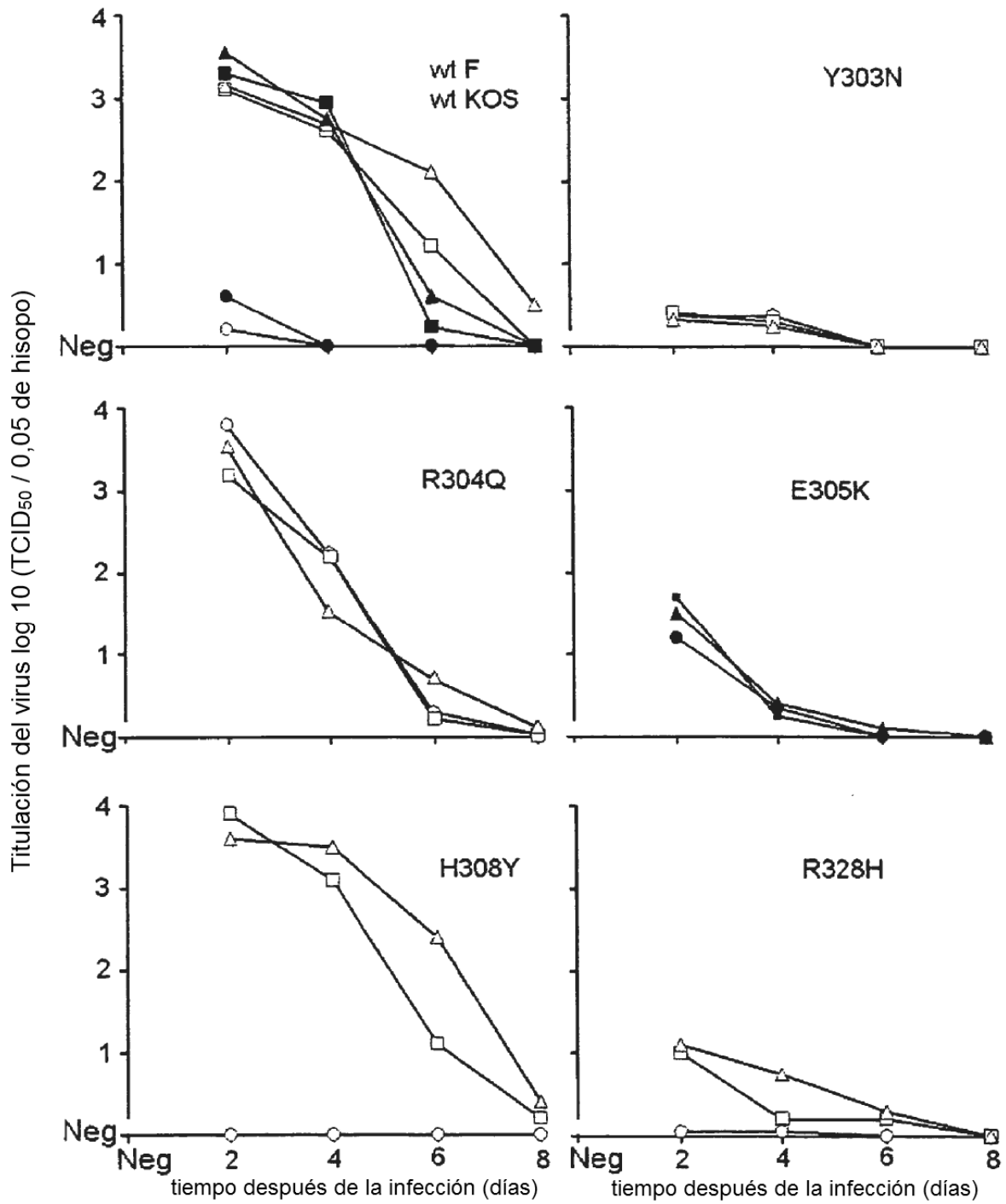


Fig. 26

