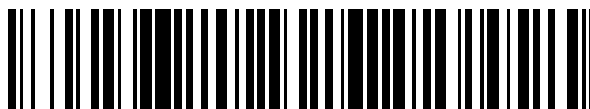


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 005**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011** **PCT/US2011/027751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011** **WO11112717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011** **E 11754011 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 2544693**

54 Título: **Una nueva estrategia de vacunación mucosa para el virus del herpes simple tipo-2**

30 Prioridad:

09.03.2010 US 312122 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2018

73 Titular/es:

BIOMEDICAL RESEARCH MODELS, INC. (100.0%)
67 Millbrook Street Suite 422
Worcester, MA 01606, US

72 Inventor/es:

YANG, KEJIAN y
GUBERSKI, DENNIS L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 651 005 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

Una nueva estrategia de vacunación mucosa para el virus del herpes simple tipo-2

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. Nº 61/312.122, presentada el 9 de marzo de 2010, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10 **Declaración de subvención gubernamental**

La presente invención se hizo con el apoyo gubernamental bajo los Números de Subvención R43/AI063820-01, R43/AI063820-02, R44/AI063820-03, R44/AI063820-04 y R44/AI063820-05 adjudicados por NIAID, y los Números de Subvención R31/CCR922413-01, R31/CCR924378-01, y R31/CCR924378-02 adjudicados por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Descripción del archivo de texto remitido electrónicamente

20 Los contenidos del archivo de texto remitido electrónicamente con el presente se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad: Una copia en formato leíble por computadora del Listado de Secuencias (nombre del archivo: BMRI_005_01WO_SeqList_ST25.txt, fecha de registro: 9 de marzo de 2011, tamaño del archivo 22 kilobytes).

Campo de la invención

25 La invención se refiere a los campos de la inmunología, virología, y desarrollo de vacunas. En particular, la invención se refiere a un protocolo de inmunización heteróloga que comprende una dosis de sensibilización intramuscular de una vacuna de ADN que codifica un antígeno y una dosis de refuerzo intranasal que comprende la forma de proteína del antígeno encapsulada en liposomas. Este protocolo es particularmente eficaz para inducir respuestas inmunitarias tanto profilácticas como terapéuticas contra el virus del herpes simple.

Antecedentes de la invención

35 El virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) es endémico en la población humana y prevalente en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estimó en 2003 que más de 300 millones de mujeres y más de 200 millones de hombres estaban infectados con el HSV-2 (Cohen (2010) Science, Vol. 330: 304). De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) aproximadamente el 20 % de la población adulta en los EE. UU. está infectada con HSV-2 (1), que puede dar como resultado una morbilidad significativa y un sufrimiento psicológico. Después de la replicación inicial en las células epiteliales, los virus entran en las neuronas que inervan el sitio de la infección y entra en latencia. Periódicamente, el HSV-2 se reactivará, replicará y formará nuevas partículas víricas y viajará a lo largo del axón hacia el sitio infectado originalmente en el que someterá a otra ronda de replicación lítica en el epitelio mucoso. Las recurrencias de las úlceras genitales se producen normalmente 4 veces al año (2). La propagación asintomática de virus en ausencia de formación de vesículas también es común que ocurra. Se ha informado de que hasta un 70 % de los nuevos casos de HSV-2 se adquieren a partir de parejas con propagación asintomática (3) y se estima que las mujeres infectadas con HSV-2 eliminan virus desde el tracto genital un total del 15-20 % de días (4). Aunque el HSV-2 da como resultado lesiones mucosas, las infecciones por HSV-2 implican otros órganos y superficies no son infrecuentes (5). Por ejemplo, la infección por HSV-2 puede implicar al sistema nervioso central en el que induce la aparición abrupta de fiebre y síntomas neurológicos focales. Además, la transmisión vertical del virus de la madre al bebé y las infecciones en individuos inmunocomprometidos pueden dar lugar a encefalitis vírica y/o la diseminación del virus por todo el cuerpo (6). En ausencia de tratamiento con análogos de nucleósidos, la tasa de mortalidad para estos bebés es del 50 % (6). Además de producir una enfermedad primaria por sí mismo, el HSV-2 también es un co-factor positivo para la transmisión del VIH-1 y se ha asociado con un riesgo de adquirir el VIH-1 de 2 a 4 veces (7).

55 Aunque debería ser factible desarrollar una inmunidad protectora contra el HSV-2, sigue siendo esquivada una vacuna de HSV-2 satisfactoria. Esto se debe en primer lugar a las distintas formas en las que el HSV-2 interactúa con el sistema inmunitario del huésped a lo largo de su complicado ciclo de replicación. Se han desarrollado muchas estrategias de inmunización para el HSV-2 incluyendo el uso de virus completo inactivado, virus vivo atenuado, virus vivo deficiente en replicación, vacunas de subunidades y vacunas de ADN (Bernstein y Stanberry (1999) Vaccine, Vol. 17(13-14): 1681-1689; Krause y Straus (1999) Infect Dis Clin North Am., Vol. 13(1):61-81; McKenzie y Straus (1996) Rev Med Virol., Vol. 6:85-96). Hasta la fecha, la única candidata vacunal que demostró alguna eficacia en seres humanos proporcionaba solo una protección limitada para el HSV-2 y solamente en pacientes femeninas que eran seronegativas al virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (8). Los resultados publicados recientemente de un ensayo de seguimiento informaba que esta vacuna de subunidades era bastante ineficaz, contradiciendo los resultados del ensayo anterior (Cohen (2010) Science, Vol. 330: 304). Por lo tanto, aún se carece de una vacuna segura y eficaz para el HSV-2.

Los ensayos clínicos y los estudios con animales han indicado que cualquier candidata a vacuna de HSV-2 satisfactoria debe iniciar la protección en múltiples formas. La inmunidad humoral es importante para la protección a partir de partículas de viriones extracelulares durante la exposición inicial, durante la transmisión vertical del virus de madre a hijo y durante la reactivación del virus cuando se transmiten partículas extracelulares desde la neurona a la célula epitelial (9,10). Las infecciones en ratones deficientes en células B indican que aunque los anticuerpos específicos de HSV limitan la invención, son necesarias otras armas del sistema inmunitario para evitar la infección (11). La inmunidad celular es necesaria para el aclaramiento de las células epiteliales infectadas con el virus durante las infecciones primarias y recurrentes, la resolución de las infecciones líticas en los ganglios sensoriales y posiblemente en la prevención de la reactivación (12-18). Los estudios de agotamiento han demostrado que la protección contra la re-infección por HSV-2 se controla en primer lugar por células T CD4⁺ más que por células T CD8⁺ o anticuerpos (19-21). Además, parece que la inmunidad a largo plazo es dependiente de la inmunización mucosa más que la sistémica, resaltando la importancia de respuestas inmunitarias mucosas locales (22).

Es bien conocido que una candidata a vacuna de HSV-2 capaz de proteger contra enfermedades no puede contener completamente la infección y replicación del virus. Por lo tanto, un desafío real para una vacuna de HSV-2 satisfactoria es proporcionar una protección tanto contra las enfermedades agudas producidas por la infección primaria del HSV-2 como para el desarrollo posterior de la latencia y recurrencia. En estudios con animales, algunas candidatas a vacuna de HSV-2 previas tenían una reducción sustancial de la replicación vírica en el tracto genital y evitaban significativamente los síntomas de la enfermedad resultantes de la infección primaria. Sin embargo, la inmunidad que daban lugar estas vacunas solo pueden proteger parcialmente contra la infección latente y la enfermedad recurrente (3-10). Las respuestas inmunitarias del huésped inducidas por la vacuna pueden actuar en una o más etapas clave para prevenir o limitar la infección genital por el HSV. Para evitar tanto la enfermedad aguda como el establecimiento de la latencia, las respuestas inmunitarias que idealmente provocaría una vacuna de HSV-2 serían capaces de contener eficazmente la replicación del virus HSV-2 en la mucosa genital y evitarían satisfactoriamente la transmisión del virus a las terminaciones nerviosas sensoriales. Con el fin de obtener la máxima protección contra la replicación vírica inicial, lo más probable es que una vacuna necesite inducir una inmunidad protectora amplia y potente, especialmente respuestas inmunitarias mucosas en los sitios genitales. Una vacuna terapéutica para tratar los ya infectados con el HSV-2 idealmente provocaría respuestas inmunitarias capaces de contener la liberación vírica y controlar las recurrencias clínicas. Como mínimo, la vacuna terapéutica debería reducir la frecuencia, duración y gravedad de las recurrencias clínicas y la propagación vírica.

Por lo tanto, sigue habiendo una clara necesidad en la técnica del desarrollo de una vacuna para HSV-2 segura y eficaz terapéutica y profilácticamente debido a la magnitud del problema de salud pública y el fallo de fármacos antivíricos para evitar su diseminación.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de un régimen de inmunización heteróloga que comprende una dosis de sensibilización que comprende una vacuna de ADN que codifica un antígeno del HSV-2 seguida por una dosis de refuerzo que comprende la forma proteica del antígeno encapsulada en liposomas. Este protocolo de inmunización induce altos títulos de anticuerpos séricos, una respuesta inmunitaria tendente a Th1 y una potente inmunidad mucosa, que protege contra la infección inicial por el virus HSV-2 y evita la recurrencia de la enfermedad por los sujetos infectados. En consecuencia, la presente invención proporciona una preparación de sensibilización y una preparación de refuerzo para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el HSV-2 en un mamífero, comprendiendo el método la administración al mamífero de una preparación de sensibilización que comprende un vector que codifica un antígeno HSV-2 bajo el control de un promotor, en el que el antígeno es una glicoproteína HSV-2-gD de longitud completa, y en el que la secuencia que codifica la glucoproteína gD tiene codones optimizados para su expresión en células de mamífero; y una preparación de refuerzo que comprende el dominio extracelular de la glicoproteína gD encapsulado en liposomas, provocando de esta manera la respuesta inmunitaria protectora en el mamífero en el que en el método la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía mucosa. En una realización el mamífero es un ser humano.

En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria protectora contra el HSV-2 provocada por los métodos de la invención tiene tendencia a una respuesta inmunitaria tipo Th1. En otra realización, la respuesta inmunitaria protectora comprende anticuerpos neutralizantes en el suero y secreciones vaginales. En algunas realizaciones, las respuestas inmunitarias protectoras comprenden una respuesta de IgA mucosa y/o una respuesta de IgG mucosa. En otras realizaciones, las respuestas inmunitarias protectoras comprenden un aumento del nivel sérico de IgG e IgA específicas de antígeno en comparación con el nivel sérico de IgG e IgA específicas de antígeno antes de la administración de la preparación de refuerzo. En otras realizaciones más, la respuesta inmunitaria protectora comprende un aumento del aclaramiento vírico (por ejemplo, mayor del 50 %, mayor del 75 %, mayor del 85 %, mayor del 90 %, mayor del 95 % de aclaramiento vírico) y/o da lugar a un aclaramiento vírico completo (por ejemplo, del 100 %).

También se describe un método para tratar la infección por HSV-2 en un animal. En la invención, la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía mucosa (por

ejemplo, intranasal, oral, o intravaginal). En una realización particular, la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal. Se pueden mejorar uno o más síntomas de la infección por HSV-2 en el mamífero a continuación de la administración de la preparación de refuerzo. Por ejemplo, en una realización, la recurrencia de las lesiones herpéticas se reduce y/o evita en el mamífero en comparación con un animal no tratado. En una realización particular, el mamífero es un ser humano.

En la invención, el vector de la preparación de sensibilización es un vector que codifica el antígeno de HSV-2 bajo el control de un promotor, tal como un promotor de citomegalovirus. En la invención, la secuencia que codifica el antígeno HSV-2 (por ejemplo, la glicoproteína gD) tiene codones optimizados para la expresión en células de mamífero, particularmente células humanas.

En otro aspecto de la invención, el antígeno de HSV-2 en la preparación de refuerzo está encapsulado en liposomas aniónicos. Los liposomas pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 0,5 a 5 μm . En ciertas realizaciones, el antígeno de HSV-2 encapsulado en liposomas de la preparación de refuerzo es una glicoproteína gD, que puede ser la proteína de longitud completa o un fragmento inmunogénico de la misma. En una realización particular, el antígeno de HSV-2 es un dominio extracelular de una glicoproteína gD (por ejemplo, los aminoácidos 1-314 de la glicoproteína gD). En una realización, los liposomas utilizados en las preparaciones de refuerzo consisten en lípidos, es decir, los liposomas no contienen proteínas, ligandos o adyuvantes adicionales. En otra realización, los liposomas son liposomas no fusogénicos (es decir, no contienen ninguna proteína vírica incorporada en la membrana liposómica).

También se describen kits para provocar una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra HSV-2 en un animal (por ejemplo, un ser humano). En un caso, el kit comprende un primer componente inmunizante que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de HSV-2 (por ejemplo, la glicoproteína gD) y un segundo componente inmunizante que comprende el antígeno encapsulado en liposomas. En algunos casos, el primer componente inmunizante se formula para la administración intramuscular, y el segundo componente inmunizante se formula para la administración intranasal. En ciertos casos, el kit comprende adicionalmente las instrucciones para administrar al animal el primer componente inmunizante seguido por la administración del segundo componente inmunizante para provocar la respuesta inmunitaria protectora o terapéutica en el animal. En algunos casos, el animal es un ser humano. En un caso particular, el ser humano está infectado por el HSV-2. En otro caso, el ser humano está en riesgo de infección por HSV-2.

También se describe un método para proporcionar una inmunidad protectora pasiva contra HSV-2 en un mamífero que necesita la misma. En un caso, el método comprende el aislamiento de un mamífero donante inmunizado con los métodos de inmunización heteróloga descrito en el presente documento y la administración del suero inmune aislado a un mamífero receptor, en el que el mamífero receptor se protege de esta manera de la infección por HSV-2. En algunos casos, el suero inmune aislado comprende anticuerpos IgG e IgA específicos del antígeno de HSV-2 y/o anticuerpos neutralizantes de HSV-2. En un caso, el método comprende adicionalmente el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ del mamífero donante y la administración de los linfocitos T CD4⁺ aislados al mamífero receptor. Los mamíferos donante y receptor pueden ser ambos seres humanos. El mamífero receptor, en algunos casos, tiene un riesgo de infección por HSV-2.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Respuestas de anticuerpo y curvas de supervivencia después de la inmunización con ADN. Se inmunizaron ratones Balb/c hembras i.m. con el vector de control o con 0,05, 0,25, 0,5, 5 o 50 μg de vacuna de ADN de gD. Tres semanas después de la inmunización, se midieron los niveles de IgG en el suero de las muestras agrupadas (A). 6 semanas después de la inmunización se inyectaron los ratones con medroxiprogesterona y se infectado con 5 DL50 (B) o 100 DL50 de HSV-2 (C). Los ratones se observaron a diario para las valoraciones clínicas y la mortalidad (n = 8 para intactos y 0,5 μg de ADN; n = 4 para 0,05, 0,25, 5 o 50 μg de ADN).

Figura 2. Respuestas de anticuerpos séricos y vaginales contra la inmunización heteróloga. Los ratones Balb/c hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 0,5 μg de vacuna de ADN de gD i.m. los días 0 y 2 (gD ADN), 15 μg de proteína gD encapsulada en liposomas (gD LIP) o 0,5 μg o 5 μg de gD ADN los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. a las 3 semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Se midieron las respuestas de anticuerpos séricos y vaginales 2 semanas después de la inmunización con liposomas. Se muestran las respuestas medias de IgG sérica específica de gD (A) y anticuerpo vaginal (B) $\pm$ STEM. n = 2, 5, 5 y 8 para los grupos de intactos, gD ADN, gD LIP y gD ADN + gD LIP, respectivamente.

Figura 3. Relaciones IgG1:IgG2a en ratones inmunizados. Se inmunizaron ratones Balb/c hembras con 0,5 μg o 5 μg de vacuna gD ADN sola i.m. los días 0 y 2 (gD ADN), 15 μg de proteína gD encapsulada en liposomas sola (gD LIP) o 0,5 μg o 5 μg de gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Se midieron las respuestas de IgG1 e IgG2a específicas de gD en el suero 2 semanas después de la inmunización con liposomas. Se muestran las respuestas medias de IgG específicas de gD $\pm$ SEM. A. Respuestas medias después de la vacunación con los componentes individuales. B. Respuestas medias después de la inmunización heteróloga. n = 8 para 0,5 μg de gD ADN sola, 0,5 μg de gD ADN + gD LIP y 5 μg de gD ADN + gD LIP; n = 7 para gD LIP solo; n = 6 para 5 % molar de gD ADN solo. C.

relación IgG1:IgG2a.

Figura 4. Producción de IFN- γ en ratones vacunados e infectados. Los ratones Balb/c hembras se dejaron sin tratar, se inmunizaron con 0,5 μ g o 5 μ g de la vacuna gD ADN i.m., 15 μ g de proteína gD encapsulada en liposomas o 0,5 μ g o 5 μ g de gD ADN i.m. seguida por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN. Dos semanas después de la última inmunización, se inyectaron los animales con progesterona y se inocularon con 100 DL50 de HSV-2. **A.** El día 10 tras la infección, se aislaron los bazo de un animal intacto, 3 animales inmunizados con 0,5 μ g de ADN, 5 animales inmunizados con gD LIP o 4 animales inmunizados con 0,5 μ g de ADN + gD LIP y se utilizaron para producir suspensiones celulares completas. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de proteína gD durante 48 horas antes de recolectar los sobrenadantes celulares. Se midieron los niveles de IFN- γ de los sobrenadantes utilizando el kit de ELISA citocina "Ready-Set-Go" de eBioscience. **B y C.** Se recolectaron las muestras vaginales los días 3 (**B**) y 5 (**C**) después de la infección de los ratones intactos (n = 6) y los ratones inmunizados con 0,5 μ g o 5 μ g de gD ADN (n = 6), gD LIP (n = 6) o 0,5 μ g o 5 μ g de gD ADN + gD LIP (n = 5). Los niveles de IFN- γ en las muestras se midieron utilizando el kit ELISA de citocinas "Ready-Set-Go" de eBioscience.

Figura 5. Curvas de supervivencia de animales inmunizados. Los ratones Balb/c hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 0,5 μ g de una vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 (gD ADN), 15 μ g de proteína gD encapsulada en liposomas (gD LIP) o 0,5 μ g de gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Dos semanas después de la última inmunización, los animales se inyectaron con progesterona y se inocularon con 100 DL50 de HSV-2. Los animales se examinaron a diario durante 3 semanas en cuenta a signos clínicos de enfermedad. Los animales con una valoración clínica de 4 se sacrificaron. n = 5 para ratones intactos; n = 10 para gD ADN, gD LIP y gD ADN + gD LIP.

Figura 6. Titulación de virus aislados de la vagina de animales vacunados infectados 2 semanas después de la inmunización. Los ratones Balb/c hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 0,5 μ g o 5 μ g de gD ADN i.m. los días 0 y 2, 15 μ g de proteína gD encapsulada en liposomas (gD LIP) o 0,5 μ g o 5 μ g de gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Dos semanas después de la última inmunización los animales se inyectaron con progesterona y se inocularon con 100 DL50 de HSV-2. Se recolectaron los lavados vaginales los días 1, 3, 5 y 7 después de la infección y se titularon en células Vero. **A.** títulos víricos después de la vacunación con los componentes individuales. **B.** Títulos víricos después de la inmunización heteróloga. Se muestran los títulos obtenidos de los ratones sin vacunar en ambos paneles para la comparación. n = 5 para ratones intactos, 0,5 μ g gD ADN, 5 μ g de gD ADN, gD LIP y 0,5 μ g de gD ADN + gD LIP; n = 6 para 5 μ g de gD ADN y n = 4 para 5 μ g de gD ADN + gD LIP.

Figura 7. Inmunidad protectora de larga duración a las 10 y 20 semanas después de la inmunización. Los ratones Balb/c hembras se inmunizaron como se describe en la descripción de la Figura 5. A las 10 y 20 semanas después de la última inmunización, los animales se inyectaron con progesterona y se infectaron por vía intravaginal con 100 DL50 de HSV-2. n = 5 para intactos; n = 10 para gD ADN la semana 2 y 20; n = 9 para gD ADN la semana 10; n = 10 para todos los grupos gD ADN + gD LIP.

Figura 8. Transferencia pasiva de suero inmune y células T CD4⁺ que protegen ratones del desafío con HSV-2. Los ratones se inmunizaron con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN ("vacuna"). Los ratones no inmunizados ("intactos") se utilizaron como control. El receptor, ratones intactos recibieron suero de los vacunados ("suero inmune") o ratones intactos ("suero intacto"), células T CD4⁺ aisladas de ratones vacunados ("inmunes CD4") o intactos ("intactos CD4") o una combinación de los dos. Los receptores se desafiaron posteriormente con 2×10^4 UFP de HSV-2. La DL50 aproximada de esta reserva de virus HSV-2 en ratones Balb/c tratados con progesterona era de $1,3 \times 10^3$ UFP. Se controlaron el peso corporal (**A**), valoración clínica (**B**), supervivencia (**C**), y carga vírica (**D**) hasta 14 días tras la infección.

Figura 9. Comparación de estrategias de refuerzo i.m. e i.n después de la sensibilización con gD ADN. **A.** Los ratones Balb/c se sensibilizaron con la vacuna gD ADN (i.m.) primero y luego se reforzaron con gD LIP i.n. o i.m. tres semanas más tarde. Dos semanas después del refuerzo con gD LIP, los ratones se desafiaron con una o dos dosis de HSV-2 (2×10^4 UFP u 8×10^4 UFP). Después del desafío con HSV-2, se registraron diariamente el peso corporal (**B**) y la valoración clínica (**C**). Se recolectaron las muestras de lavado vaginal y se examinaron por un ensayo de placas para titular los títulos de virus (**D**).

Figura 10. Comparación del papel de diferentes vías de refuerzo (i.n. vs i.m.) sobre la protección inmunitaria. **A.** los ratones Balb/c se sensibilizaron con la vacuna gD ADN (i.m.) primero y después se reforzaron con gD LIP i.n. o i.m. tres semanas más tarde. Diecisiete semanas después del refuerzo con gD LIP, se desafiaron todos los animales con 2×10^4 u 8×10^4 UFP de HSV-2. Se registraron diariamente el peso corporal (**B**) y la valoración clínica (**C**) después de la infección. Las muestras del lavado vaginal se recolectaron y examinaron por el ensayo de placas para titular los títulos de virus (**D**).

Figura 11. La alta expresión de proteína gD de HSV-2 por la vacuna gD ADN se detectó por Transferencia de Western. Vector S, sobrenadante celular de células 293T transfectadas con el vector de ADN plasmídico. Vector L, lisado celular de células 293T transfectadas con el vector de ADN plasmídico. gD ADN S, sobrenadante de células 293T transfectadas con la vacuna gD ADN. gD ADN L, lisado celular de células 293T transfectadas con la vacuna gD ADN. Proteína rgD, proteína gD recombinante (dominio extracelular de la proteína gD de HSV-2) producida en *Pichia pastoris*. Lisado vírico, lisado celular de Vero infectadas con el virus HSV-2. Lisado celular, lisado de células Vero. Se utilizó un suero de referencia de ratón anti gD de HSV-2 como el anticuerpo de detección en la transferencia de Western con una dilución de 1:250.

Figura 12. Programa de vacunación y desafío con HSV-2. Para ensayar la capacidad de la vacuna (gD ADN, de

sensibilización + gD LIP de refuerzo) para inducir respuestas inmunitarias sinérgicas y protección, se inmunizaron 10 hembras de cobayas Dunkin Hartley de manera heteróloga mediante sensibilización con una inyección i.m. con 100 µg de gD ADN (administradas los días 0 y 2) seguido por un refuerzo i.n. con 30 µg de gD LIP administrados 3 semanas más tarde. Para evaluar la contribución de cada uno de los componentes de la vacuna solo y juntos, se inmunizaron grupos de 10 cobayas con gD ADN seguido por liposomas vacíos o un vector de ADN seguido por gD LIP. Los cobayas intactos servían como control negativo. Se recolectaron las muestras vaginales y de suero como se indicaba. Después de la infección, los animales se observaron durante 90 días.

Figura 13. Respuestas de anticuerpos séricos y vaginales a la inmunización heteróloga. Los cobayas Hartley hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 100 µg de vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 (gD ADN), 30 µg de proteína gD encapsulada en liposomas cargados negativamente (gD LIP), o con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Las respuestas de anticuerpos del suero y vaginales se midieron 2 semanas después de la inmunización con liposomas: se muestran la IgG específica de gD total (**A y B**) e IgA (**C y D**) de las muestras agrupadas y la media de respuestas de IgG para los grupos seleccionados $\pm$ SEM (**E y F**). La diferencia de los niveles de IgG después de la inmunización con gD ADN sola versus ambos componentes en combinación (gD ADN + gD LIP) era altamente significativa ($p < 0,0001$) para el suero; $p < 0,001$ para IVAG, $n = 10$ por grupo).

Figura 14. Neutralización de la formación de placas de HSV-2 por el suero y secreciones vaginales. Los cobayas hembra Hartley se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 100 µg de vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por liposomas vacíos i.n. (gD ADN + LIP vacíos), con vector ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por 30 µg de proteína gD encapsulada en liposomas i.n. (vector ADN + gD LIP), o con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. 3 semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). El porcentaje de neutralización de placas de HSV-2 es relativo al virus solo sin ninguna muestra añadida. **A.** Se ensayaron diluciones de 2 veces de suero utilizando muestras agrupadas. **B.** Se ensayaron diluciones de 3 veces utilizando muestras vaginales agrupadas. **C.** Se utilizó una dilución de 1:2 veces para muestras vaginales individuales. $n = 10$ para cada grupo. Los valores de P eran los siguientes: virus solo de control frente a gD ADN: 0,3; virus solo de control frente a gD ADN + gD LIP: 0,001; gD ADN frente a gD ADN + gD LIP: 0,001.

Figura 15. Curvas de valoraciones clínicas de supervivencia de animales inmunizados. Los cobayas Hartley hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 100 µg de vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por liposomas vacíos i.n. (gD ADN + LIP vacíos), con vector ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por 30 µg de proteína gD encapsulada en liposomas i.n. (vector ADN + gD LIP), o con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. tres semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Dos semanas después de la última inmunización, los animales se inocularon con 2×10^6 ufp de HSV-2. Los animales se examinaron diariamente durante 3 semanas por signos clínicos de enfermedad. El Panel A muestra valoraciones clínicas medias y el Panel B muestra la media de % de supervivencia por grupo ($n = 9$).

Figura 16. Titulación de virus aislados de la vagina de animales vacunados infectados 2 semanas después de la inmunización. Los cobayas Hartley hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 100 µg de vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por liposomas vacíos i.n. (gD ADN + LIP vacíos), con vector ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por 30 µg de proteína gD encapsulada en liposomas i.n. (vector ADN + gD LIP), o con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. tres semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Dos semanas después de la última inmunización, los animales se inocularon con 2×10^6 ufp de HSV-2. $n = 9$ para cada grupo. El límite de detección era de 1,7 log ufp/ml. En comparación con los animales sin vacunar, los títulos víricos en los animales vacunados con ambos gD ADN + gD LIP el día 3 y el día 7 eran significativamente más bajo ($P < 0,01$). Los títulos vaginales de animales el día 3 y 7 vacunados con gD ADN solo eran menores que los cobayas no vacunados en ambos días ($P = 0,001$). No se observó una diferencia significativa entre animales vacunados con gD LIP y los animales no vacunados.

Figura 17. Recaídas acumuladas de enfermedad por HSV-2 en cada cobaya para cada grupo de inmunización, ajustado para el número de días de observación. Los cobayas Hartley hembras se dejaron sin tratar (intactos), se inmunizaron con 100 µg de vacuna gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por liposomas vacíos i.n. (gD ADN + LIP vacíos), con vector ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por 30 µg de proteína gD encapsulada en liposomas i.n. (vector ADN + gD LIP), o con gD ADN i.m. los días 0 y 2 seguido por gD LIP i.n. tres semanas después de la última inmunización con ADN (gD ADN + gD LIP). Dos semanas después de la última inmunización, los animales se inocularon con 2×10^6 ufp de HSV-2. Después de la fase aguda inicial de 15 días, los animales se examinaron diariamente unos 75 días adicionales (hasta el día 90) en cuanto a signos clínicos de recaída en la enfermedad. Se muestra el número medio total de días que los animales presentaban signos de enfermedad recurrente para cada grupo. $n = 4$ para cobayas intactos, $n = 9$ para gD ADN, $n = 2$ para gD LIP y $n = 9$ para gD ADN + gD LIP. No se observó recaída en el grupo gD ADN + gD LIP.

Figura 18. Media del número de copias del genoma vírico latente de los cobayas supervivientes detectados por qPCR. Los animales que no se infectaron como se determinó por la ausencia de virus en los frotis vaginales desde el día 1-7 después de la infección no se incluyeron en el análisis. Los animales se inmunizaron e infectaron como se ha descrito en la descripción de la Figura 17. Se recolectaron muestras del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de los animales supervivientes infectados satisfactoriamente el día 90 después de la infección. $n = 4$ para cobayas intactos (media 128 ± 31); $n = 9$ para gD ADN (media: 28 ± 10); $n = 2$ para gD LIP (media: 155 ± 123) y $n = 9$ para gD ADN + gD LIP (media $3 \pm 0,6$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. El grupo gD ADN + gD LIP, estaba significativamente protegido del establecimiento de latencia de HSV-2.

Figura 19. Protección inmunitaria a largo plazo se consiguió en cobayas hembra 15 semanas después de la

inmunización final. Se inmunizaron de manera heteróloga cobayas Dunkin Hartley hembras por sensibilización con una inyección i.m. con 100 µg de gD ADN los días 0 y 2 seguido por un refuerzo i.n. con la cantidad indicada (6 o 30 µg) de gD LIP administrada 3 semanas más tarde. Quince semanas después del refuerzo con gD LIP, todos los animales se desafiaron con 2×10^6 UFP de HSV-2. Los animales inmunizados satisfactoriamente e infectados se observaron clínicamente durante 35 días después de la infección. SE muestran los porcentajes de supervivencia de cada grupo de animales. La fórmula de refuerzo intranasal eran: antiguo gD LIP 30 µg en 100 µl, n = 8; nuevo gD LIP 30 µg en 100 µl, n = 7; nuevo gD LIP 6 µg en 100 µl, n = 6; nuevo gD LIP 30 µg en 300 µl, n = 7; Intacto, n = 6. *, p<0,05; **, p<0,01.

Figura 20. A. Esquema que muestra el régimen de vacunación terapéutica en cobayas infectados con HSV-2. Cuatro semanas después de la infección intravaginal con HSV-2, la sensibilización con ADN se inyectó por vía intramuscular durante dos días. Dos semanas más tarde se administró el refuerzo con liposomas intranasal. Los cobayas se controlaron diariamente durante 60 días adicionales en cuanto a signos de recaída de la enfermedad. Las muestras de suero se recolectaron los días 21 y 57; las muestras de frotis vaginales se recolectaron los días 2, 4, 21 y 57; se recolectaron los ganglios de la raíz central al final del estudio para determinar el número de copias de ADN de HSV-2 latente. **B y C.** Los cobayas Hartley hembras se trataron con la vacuna de gD ADN + gD liposomas o con el vector ADN + el vehículo de liposomas vacíos cuatro semanas después de la infección con HSV-2. Se midieron las respuestas de anticuerpo IgG anti-gD de HSV-2 en el suero una semana antes de la sensibilización con ADN (día 21) y 2 semanas después del refuerzo con liposomas (día 57). Se muestran las respuestas de IgG específica anti-gD de las muestras agrupadas (**B**) y las respuestas medias de IgG de los individuos el día 57 +/- SEM (**C**). n = 15 para los grupos tanto de vacuna como de vehículo.

Figura 21. El tratamiento con la vacuna induce respuestas de anticuerpos neutralizantes mayores en cobayas expuestas a la infección con HSV-2. Los animales se infectaron con HSV-2 y después se trataron con la vacuna (gD ADN + gD LIP) o el vehículo de control (vector ADN + liposomas vacíos). Dos semanas después de la última inmunización (el día 57 del estudio), se recolectaron muestras de suero y frotis vaginales de todos los animales y se ensayaron en un ensayo de neutralización de virus. Se muestra la actividad de neutralización del anticuerpo de la muestra agrupada de sueros (**A**) y las muestras vaginales agrupadas (**B**).

Figura 22. Recaída acumulada por animal por grupo en los cobayas tratados con la vacuna y tratados con el vector después de la infección aguda por HSV-2. Después de la inmunización de los cobayas infectados, los animales se observaron durante 60 días en cuanto a evidencias de lesiones herpéticas espontáneas. Los episodios recurrentes se enumeraron como recaídas acumuladas (aparición de lesiones) por cobaya para cada grupo, ajustado al número de días en que se observaron las recurrencias. El gris claro es para el periodo de pre-tratamiento (días 15-28 después de la infección), y el gris oscuros para el periodo de tratamiento con la vacuna (días 29-42 después de la infección). La tabla enumera las diferencias estadísticas en la pendiente de regresión lineal durante periodos seleccionados de días después de la infección.

Descripción detallada de la invención

Se han desarrollado y evaluado muchas estrategias de inmunización para el HSV-2, incluyendo el uso de virus completo inactivado, virus vivo atenuado, virus vivo deficiente en replicación, vacunas de subunidades y vacunas de ADN. Sin embargo aún no está disponible una vacuna segura y eficaz para el HSV-2. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una nueva vacuna de HSV-2 que da lugar a una inmunidad protectora y terapéutica contra HSV-2. Como se describe con detalle en el presente documento, los inventores han desarrollado un protocolo de inmunización heteróloga que comprende una sensibilización con ADN administrada intramuscularmente y un refuerzo encapsulado en liposomas suministrado por vía mucosa (por ejemplo, intranasal). La vacuna induce claras respuestas sinérgicas que comprende la inmunidad humoral, de células T y mucosa. Específicamente, la vacuna estimula altos títulos de anticuerpos en el suero, una respuesta inmunitaria que tiende a Th1 y una potente inmunidad mucosa. Las respuestas inmunitarias provocadas por los métodos de la presente invención pueden proteger a los animales inmunizados de los desafíos con virus HSV-2 vivo. Los métodos de la invención también se pueden emplear para inducir respuestas inmunitarias terapéuticas en animales (por ejemplo, seres humanos) con infecciones por HSV-2 para prevenir o reducir las recaídas de la enfermedad de herpes.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una preparación de sensibilización y una preparación de refuerzo para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el HSV-2 en un mamífero en el que el método comprende la administración al animal de una preparación de sensibilización que comprende un vector que codifica un antígeno de HSV-2 bajo el control de un promotor, en el que el antígeno es una glicoproteína gD del HSV-2 de longitud completa, y en el que la secuencia que codifica la glicoproteína gD tiene codones optimizados para la expresión en células de mamífero y una preparación de refuerzo que comprende un dominio extracelular de la glicoproteína gD encapsulado en liposomas en el que en el método, la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía mucosa, tal como intranasal, oral, intravaginal, rectal, sublingual, bucal o mediante inhalación. En una realización particular, la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal. En dichas realizaciones, el método induce altos títulos de anticuerpos en el suero y vaginales con altas actividades neutralizantes, una respuesta tendente al tipo Th1, y una potente inmunidad protectora en la cavidad vaginal, el portal de entrada del virus HSV-2. En otra realización, la sensibilización con la vacuna de ADN del antígeno del HSV-2 por vía intramuscular y el refuerzo con antígeno de HSV-2-liposomas por vía intranasal reduce significativamente la carga vírica vaginal, aumenta el aclaramiento vírico durante la fase aguda, protege completamente a los animales inmunizados del desarrollo de signos clínicos de

enfermedad hasta los 90 días después del desafío vírico con HSV-2, y evita el establecimiento de la latencia vírica de HSV-2 en los ganglios de la raíz dorsal del animal. El suministro del refuerzo por vía intranasal se estableció como un determinante importante para la generación de la inmunidad mucosa local y se asoció con un aclaramiento más rápido del virus en el sitio vaginal y una protección más eficaz contra la enfermedad inducida por el HSV-2.

Como se utiliza en el presente documento, una “respuesta inmunitaria protectora” o “inmunidad protectora” se refiere a la inmunidad o provocación de una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso, que presenta un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o le protege contra la infección. Una respuesta inmunitaria protectora que previene o protege contra la aparición de síntomas de enfermedad reducirá o detendrá la diseminación del HSV-2 en una población reduciendo la liberación vírica. En algunas realizaciones, la inmunidad protectora inducida por la vacuna de la presente invención es una inmunidad esterilizante. “Inmunidad esterilizante” es una respuesta inmunitaria que elimina o previene completamente una infección o se aclara rápidamente, sin dejar un rastro detectable.

También se describe un método para modular las respuestas inmunitarias de manera que se pueda dar lugar a una respuesta inmunitaria deseada tendente hacia una respuesta de T auxiliar tipo 1 (Th1) en el animal. El método comprende la administración por vía intramuscular al animal de una preparación de sensibilización que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno, tal como un antígeno de HSV-2, y posteriormente la administración al animal de una preparación de refuerzo que comprende el antígeno encapsulado en liposomas. “Tendente hacia” se refiere a la situación en la que la respuesta inmunitaria observada está más cercada de una respuesta Th1 o de T auxiliares tipo 2 (Th2) en comparación con antes de la inmunización. En ciertas realizaciones, la inmunización cambiará completamente una respuesta Th2 a una respuesta Th1. En otras realizaciones, la inmunización no puede cambiar completamente una respuesta Th2 a una respuesta Th1, sino que en vez de eso, da como resultado una respuesta mixta o equilibrada o una respuesta de Th2 más débil.

La mayoría de las respuestas inmunitarias están reguladas por los linfocitos T, que inician y dan forma a la naturaleza de la respuesta. Como respuestas inmunitarias maduras, los linfocitos T CD4⁺ pueden convertirse en polarizados hacia respuestas inmunitarias T auxiliares tipo 1 (Th1) o T auxiliares tipo 2 (Th2). El distintivo de las respuestas tipo Th1 y Th2 es el patrón predominante de citocinas que estén presentes. Las respuestas Th1 se caracterizan por altos niveles de IFN- γ y bajos niveles de IL-4 e IL-10, mientras que las respuestas Th2 se caracterizan por bajos niveles de IFN- γ y altos niveles de IL-4 e IL-10. Estas citocinas tienen un importante papel en la determinación de las capacidades funcionales de las células T. Las respuestas tipo Th2 dan lugar a la producción preferida de anticuerpos de la subclase IgG1, con poca o ninguna generación de CTL. Las respuestas tipo Th1 dan lugar a la producción preferida de anticuerpos de la subclase IgG2a y la inducción de CTL que pueden destruir eficazmente células infectadas con virus y otros organismos.

La Tabla 1 posterior resume las características inmunológicas de las respuestas inmunitarias polarizadas hacia Th1 y Th2. Las respuestas polarizadas a Th1 se generan normalmente durante las infecciones por virus o bacterias. Por el contrario, las respuestas polarizadas a Th2 a menudo se observan en infecciones parasitarias, en respuestas alérgicas, y por vacunas proteicas suministradas por vía intramuscular basadas en aluminio convencionales que se utilizan en seres humanos. La genética también puede determinar el tipo de respuestas inmunitarias generadas. Por ejemplo, las respuestas Th1 predominan en la estirpe C57B/6 de ratón, mientras que las respuestas Th2 predominan en la estirpe Balb/c de ratón. Las respuestas inmunitarias también pueden consistir en ambos componentes Th1 y Th2, consiguiendo una protección mediada por ambas armas humoral y celular de la respuesta inmunitaria. La determinación directa de las frecuencias de células productoras de citocinas se consigue por el uso de ELISPOT (ensayos SPOT de inmovinabsorción ligada a enzimas) o por tinción por inmunofluorescencia para revelar la producción de citocinas intracelulares. Las relaciones séricas de IgG1:IgG2a también están ampliamente aceptadas y cumple con los criterios para determinar los tipos de T auxiliares (Tabla 1). Una relación de IgG1 respecto a IgG2a para la respuesta equilibrada de Th1 y Th2 sería entre 0,5 y 2,0.

Tabla 1. Característica de respuestas de células T polarizadas a Th1 y Th2

Respuestas inmunitarias	Respuestas inmunitarias tipo Th1	Respuestas inmunitarias tipo Th2
Inmunidad humoral	IgG1/IgG2a en suero < 0,5	IgG1/IgG2a en suero > 2,0
Secreción de citocinas de células T	$\uparrow$ IFN- γ ; $\uparrow$ IL-10 e IL-4	$\uparrow$ IL-10 e IL-4; $\downarrow$ IFN- γ
CTL	Altos	Bajos o ausentes
Estirpes de ratón prototípicas	C57BL/6	Balb/c

Como se utiliza en el presente documento, “respuesta de T auxiliar tipo 1” y “respuesta Th1” se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a un intervalo de respuestas del animal huésped que incluye una o más, habitualmente todas las características enumeradas en la columna del medio de la Tabla 1 anterior. Estas características incluyen una relación de IgG1:IgG2a no mayor de 0,5; un aumento de secreción de IFN- γ (y otras citocinas de Th1) por las células T auxiliares 1 y una disminución de la secreción de IL-10 e IL-4 (y otras citocinas Th2) por las células T auxiliares 2; y alta actividad de CTL.

De manera similar, como se utiliza en el presente documento, “respuesta T auxiliar tipo 2” y “respuesta Th2” se utilizan de manera intercambiable para referirse a un intervalo de respuestas del animal huésped que incluyen una o más, habitualmente todas las características enumeradas en la columna derecha de la Tabla 1 anterior. Esas características incluyen una relación de IgG1:IgG2a no menor de 2,0; una disminución de la secreción de IFN- γ (y otras citocinas Th1) por las células T auxiliares 1 y un aumento de la secreción de IL-10 e IL-4 (y otras citocinas de Th2) por las células T auxiliares 2; y baja o ausente actividad de CTL.

La divulgación proporciona adicionalmente de un método para desarrollar vacunas eficaces y protocolos de vacunación para dirigirse específicamente al portal de entrada más común para los microorganismos, las superficies mucosas del cuerpo. La divulgación proporciona que las vacunas se puedan fabricar más eficaces encapsulándolas en liposomas con una composición/tamaño determinado, y suministrándolas directamente en las superficies mucosas. Combinando las vacunas encapsuladas en liposomas con regímenes de inmunización apropiados, se pueden hacer a medida respuestas inmunitarias para proporcionar vacunas más eficaces y específicas. En ciertos casos, la vacuna ideal genera una respuesta inmunitaria equilibrada o tendente a T auxiliar 1 (Th1) que también incluye respuestas robustas de anticuerpo, generación de CTL y producción de citocinas tipo Th1, e inmunidad local en los sitios mucosos. En otros casos, puede ser posible hacer a medida la respuesta inmunitaria para generar una respuesta inmunitaria tendente a T auxiliar 2 (Th2), que puede ser beneficiosa para evitar el rechazo en huéspedes injertados y para proteger contra ciertas infecciones parasitarias.

También se describe un kit para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el HSV-2 en un animal (por ejemplo, un mamífero). En una realización el kit comprende un primer componente inmunizante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de HSV-2, un segundo componente inmunizante que comprende el antígeno de HSV-2 encapsulado en liposomas, y unas instrucciones para el usuario para que administre al animal el primer componente inmunizante seguido por la administración del segundo componente inmunizante para provocar la respuesta inmunitaria en el animal. En algunos casos, el primer componente inmunizante se formula para la administración intramuscular y el segundo componente inmunizante se formula para la administración mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, intravaginal, rectal, sublingual, bucal o mediante inhalación. En ciertos casos, el segundo componente inmunizante se formula para la administración intranasal. En otro caso, los kits comprenden adicionalmente un dispositivo de suministro para la administración del primer componente inmunizante, el segundo componente inmunizante, o ambos. El dispositivo de suministro puede ser cualquiera de los dispositivos de suministro descritos posteriormente, incluyendo cuentagotas, torundas, aerosoles, insufladores, nebulizadores, inhaladores, jeringas equipadas con aguja o autoinyectores.

Los métodos de la invención son útiles para la vacunación terapéutica. El objetivo de la vacunación terapéutica es dirigir las respuestas inmunitarias en un individuo infectado para erradicar las células que ya están infectadas con virus o evitar que se reactiven los virus latentes y el tráfico de vuelta a los sitios de infección originales. Como se utiliza en el presente documento, “inmunidad terapéutica” o una “respuesta inmunitaria terapéutica” se refiere a una inmunidad o la provocación de una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso que mejora o elimina una infección o reduce al menos un síntoma de la misma. Específicamente, la inducción de una respuesta inmunitaria terapéutica con la administración de la vacuna es evidente por la eliminación o reducción de la presencia de uno o más síntomas de la enfermedad inducida por el agente infeccioso o una reducción de la duración o gravedad de dichos síntomas. Por ejemplo, en una realización, la inmunidad terapéutica contra el HSV-2 se refiere a la inmunidad que reduce la gravedad o duración de una infección por HSV-2. La inmunidad terapéutica, en algunas realizaciones, se manifiesta por la eliminación o reducción de la presencia de uno o más síntomas de enfermedad inducida por el HSV-2. Los síntomas clínicos de enfermedad inducida por el HSV-2 incluyen úlceras tipo ampolla o ulceraciones alrededor de las áreas genital y/o rectal, una erupción o pequeños bultos en la piel en las áreas genital y/o rectal, micción dolorosa, descarga de fluido vaginal, y síntomas tipo catarrales (por ejemplo, fiebre, hinchamiento de ganglios linfáticos en la ingle).

También se describe un método para el tratamiento de una infección por HSV-2 en un animal (por ejemplo, un mamífero, un ser humano) que comprende la administración al animal de una preparación de sensibilización que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno del HSV-2, y una preparación de refuerzo que comprende el antígeno encapsulado en liposomas. En la invención, la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía mucosa. Las vías de administración mucosa incluyen, pero no se limitan a, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, bucal, o mediante inhalación a los pulmones. En una realización particular, la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal. Preferentemente, uno o más de los síntomas de la infección por HSV-2 se alivia, mejora, reduce o cura después de la administración de sensibilización y refuerzo de la vacuna heteróloga de HSV-2. Por ejemplo, el número, gravedad o frecuencia de las lisiones genitales está significativamente reducido en un animal inmunizado en comparación con un animal sin tratar. En una realización, la recurrencia de las lesiones herpéticas está reducida en el animal inmunizado en comparación con un animal sin tratar. En otra realización, la propagación vírica por el tracto genital se reduce en el animal inmunizado en comparación con el animal sin tratar.

Otros virus que establecen infecciones a largo plazo, que se pueden tratar con los métodos y kits de la divulgación incluyen el virus del papiloma humano (HPV), los virus de la hepatitis B y C (VHB, VHC), y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El desarrollo de vacunas terapéuticas para virus se ha enfocado en la activación

de CTL para reconocer y destruir las células infectadas y/o controlar la diseminación vírica. Los solicitantes han demostrado que los métodos de la invención son eficaces en el aumento de las respuestas inmunitarias celulares, haciéndolas adecuadas para proporcionar una vacunación terapéutica. La eficacia de los métodos se puede aumentar adicionalmente por la inclusión de citocinas adyuvantes y motivos CpG que has demostrado ser particularmente prometedores en el desarrollo de vacunas anti-cáncer (Belardelli et al., Cancer Res. 64:6827-6830 (2004)).

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos, para dar lugar eficazmente a respuestas inmunitarias tales como las respuestas inmunitarias protectoras y terapéuticas en mamíferos (por ejemplo, seres humanos), contra antígenos del HSV-2. Una característica sobresaliente de la invención se refiere al uso de antígenos proteicos encapsulados en liposomas suministrados por vía mucosa (por ejemplo, por vía intranasal (IN)) o intramuscular (IM) al animal huésped.

Un componente de los métodos de la presente invención es el uso de una inmunización "de sensibilización", que comprende la administración inicial del antígeno a un mamífero, especialmente a un paciente humano, en la preparación para la administración(es) posteriores del mismo antígeno. Específicamente, el término "sensibilización", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una primera inmunización utilizando un antígeno que induce una respuesta inmunitaria contra el antígeno deseado y reproduce un alto nivel de respuesta inmunitaria contra el antígeno deseado en una re-inmunización posterior con el mismo antígeno cuando se administra en el contexto del mismo o un diferente sistema de suministro vacunal.

Otro componente de los métodos de la presente invención es el uso de una "inmunización de refuerzo" o un "refuerzo" lo que significa la administración de una composición que suministra el mismo antígeno que el codificado en la inmunización de sensibilización. A veces se hace referencia a un refuerzo como una respuesta anamnésica, es decir, una respuesta inmunitaria en un animal previamente sensibilizado. Se pueden administrar múltiples refuerzos, utilizando la misma o diferentes cantidades de cada refuerzo. Se hace referencia a un refuerzo que utiliza un sistema de suministro de antígeno diferente de la sensibilización como un "refuerzo heterólogo", mientras que se puede hacer referencia a un refuerzo que utiliza el mismo sistema de suministro de antígeno que la sensibilización como un "refuerzo homólogo".

Como alternativa a la administración secuencial que se ha descrito anteriormente, la preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo se pueden administrar simultáneamente, es decir, sustancialmente al mismo tiempo. Los métodos de la invención dan lugar a potentes efectos sinérgicos entre la inmunización de sensibilización y la inmunización de refuerzo en términos de las respuestas inmunitarias que los métodos son capaces de provocar en un animal. Como resultado, los métodos de la invención hacen posible que se provoque un nivel deseado de respuesta inmunitaria, cuando cada preparación de sensibilización y preparación de refuerzo, al administrarse solas al animal, es insuficiente para conseguir el nivel deseado de respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la inmunización heteróloga con un refuerzo intranasal genera una respuesta inmunitaria protectora caracterizada por un aumento del nivel sérico de IgG e IgA específicas de antígeno en comparación con el nivel sérico de IgG e IgA específicas de antígeno antes de la administración de la preparación de refuerzo. En otras realizaciones, las inmunización heteróloga con un refuerzo intranasal genera una respuesta inmunitaria protectora que comprende una respuesta secretora de IgA y/o una respuesta mucosa de IgG. En ciertas realizaciones, la inmunización heteróloga con un refuerzo intranasal genera linfocitos T citotóxicos (CTL) mucosos, y proporciona una protección completa contra el desafío del agente patógeno vivo, tal como los desafíos por virus HSV-2 vivos como demuestran los solicitantes en los ejemplos ilustrativos. En otras realizaciones, la inmunización heteróloga con refuerzo intranasal induce una respuesta inmunitaria protectora que comprende anticuerpos neutralizantes en el suero y secreciones mucosas, tales como las secreciones vaginales. En otras realizaciones más, la inmunización heteróloga con refuerzo intranasal induce una respuesta inmunitaria protectora que tiene tendencia hacia una respuesta inmunitaria tipo Th1. En ciertas realizaciones, la inmunización heteróloga con refuerzo intranasal la carga vírica en los sitios mucosos (por ejemplo, vagina), aumenta el aclaramiento vírico (por ejemplo, más del 50 %, más del 75 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 % de aclaramiento vírico) y/o eliminan completamente los virus infectantes en comparación con los animales inmunizados solo con el componente de sensibilización o refuerzo solos, y previene el establecimiento de la latencia vírica, tal como la integración de los genomas víricos de HSV-2 en las células de los ganglios de la raíz dorsal de los animales huésped.

Los efectos de la respuesta inmunitaria en el animal huésped, que incluyen las respuestas inmunitarias humores y celulares, pueden evaluarse por distintos ensayos conocidos en la técnica. La respuesta inmunitaria humoral incluye los títulos totales de anticuerpo específico de antígeno (inmunoglobulinas, es decir, Ig) en el suero o en las superficies mucosas; los títulos de anticuerpos específicos de antígeno del HSV-2 en el suero o en superficie mucosa; los títulos de isotipos y/o subtipos de anticuerpo específicos que incluyen Ig G, IgA, IgG1, y IgG2a; relación de IgG1 e IgG2a. Los títulos de anticuerpo específicos de antígeno se pueden medir por métodos de rutina conocidos en la técnica, tales como los ensayos ELISA. La respuesta inmunitaria celular incluye el fenotipo y actividad de células T citotóxicas (CTL). La respuesta inmunitaria celular también incluye la secreción de citocinas características de las respuestas Th1 que incluyen IFN- γ , y la secreción de citocinas características de la respuesta Th2 que incluyen IL-10 e IL-4. Las citocinas se detectan directamente por el ELISPOT de citocinas y/o ensayos ELISA (es decir, IFN- γ , IL-10 y/o IL-4) y que se deducen de la relación IgG1:IgG2a (por ejemplo, respuesta Th1

frente a Th2). La actividad de neutralización de los anticuerpos del suero y mucosa se puede medir por distintos métodos que incluyen los ensayos de neutralización dependiente de complemento como se describe en los Ejemplos. El grado de latencia vírica del HSV-2 en el sistema nervioso se puede evaluar por ejemplo, por análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de las células de los ganglios de la raíz dorsal. El número de copias víricas que se detectan se correlaciona con la integración vírica de HSV-2 en la célula neural huésped.

Cada una de la preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo se puede administrar por una cualquiera de las siguientes vías: subcutánea, intramuscular, intradérmica y mucosa, incluyendo el uso de dispositivos electrónicos/mecánicos y/o todos tales como electroporación. Las vías a modo de ejemplo de administración mucosa incluyen, pero no se limitan a, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, bucal, o mediante inhalación. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo se pueden administrar por la misma vía, o por diferentes vías. En ciertas realizaciones preferidas, la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal, lo que resulta no solo en respuestas inmunitarias sistémicas robustas sino también en la inducción de inmunidad local en los sitios mucosos. En una realización particular la sensibilización con la vacuna de ADN de antígeno de HSV-2 vía intramuscular y el refuerzo con antígeno de HSV-2-liposomas por vía intranasal inducen potentes respuestas de anticuerpo neutralizante sinérgicas en el suero y secreciones vaginales, CTL activados y perfiles de citocinas tipo Th1, y una inmunidad protectora potente en la cavidad vaginal, que se caracteriza por reducción de la carga vírica, aumento y/o completo aclaramiento vírico. Se descubrió que el suministro del refuerzo por la vía intranasal era un determinante importante para la generación de inmunidad mucosa local y se asoció con un aclaramiento vírico más rápido del sitio vaginal y una protección más eficaz contra la enfermedad inducida por el HSV-2.

La divulgación también proporciona dispositivos para dispensar las preparaciones de sensibilización y refuerzo que se describen en el presente documento para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, para realizaciones en las que se suministra la preparación de refuerzo por vía intranasal, los suministros de dispensación de formulaciones intranasal pueden tener la forma, por ejemplo, de un sistema de suministro en aerosol, y se pueden disponer para dispensar solo una única dosis, o una multiplicidad de dosis. Dicho dispositivo suministraría una dosis medida de la preparación de refuerzo en el conducto nasal. Otros ejemplos de dispositivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cuentagotas, torundas, aerosoles (por ejemplo, VaxiNator™), insufladores (por ejemplo, Dispositivo de Administración Nasal Monopolvo Valois, dispositivo de suministro intranasal de polvo seco Bepak UniDose DP de dosis única), nebulizadores, e inhaladoras. Los dispositivos pueden suministrar la preparación de refuerzo por medios pasivos que necesitan que el sujeto inhale la formulación en la cavidad nasal. De manera alternativa, el dispositivo puede suministrar activamente la preparación de refuerzo bombeando o pulverizando una dosis en la cavidad nasal. La preparación de refuerzo se puede suministrar en una o ambas narinas por uno o más de dichos dispositivos. La administración podría incluir dos dispositivos por sujeto (un dispositivo por narina).

Se pueden utilizar diferentes intervalos entre la preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo. La preparación de refuerzo se puede administrar 2-8 semanas, preferentemente 4-6 semanas, o más preferentemente aproximadamente 2-4 semanas separadas de la administración previa (inicial o un refuerzo previo). Normalmente, un refuerzo que se administra 2-4 semanas después de la administración de sensibilización inicial es suficiente. En una realización, el refuerzo se administra 2 semanas después de la preparación de sensibilización. En otra realización, el refuerzo se administra 3 semanas después de la preparación de sensibilización. La invención contempla que la preparación de sensibilización o la preparación de refuerzo, o ambas, se pueden administrar al animal una o más veces. Por ejemplo, la preparación de sensibilización se puede administrar durante el curso de dos o tres días. En una realización, la sensibilización comprende una o dos administraciones separadas aproximadamente 3-6 semanas, y dicha preparación de refuerzo se administra aproximadamente de 3 a 10 semanas después de la última sensibilización. En otra realización, la sensibilización comprende una o dos administraciones separadas por 3 días, y dicha preparación de refuerzo se administra 3 semanas después de la última sensibilización. En cierta realización, la sensibilización comprende dos administraciones separadas por un día (por ejemplo, preparación se sensibilización administrada el día 1 y día 3) y la preparación de refuerzo se administra 2-3 semanas después de la última sensibilización.

La administración(es) de refuerzo y la administración(es) inicial pueden utilizar la misma o diferentes cantidades de preparaciones de antígeno-liposomas, y la administración(es) de refuerzo e inicial se pueden administrar mediante la misma o diferentes vías. La administración(es) inicial y la administración(es) de refuerzo puede utilizar diferentes cantidades de ADN del antígeno suministrado con diferentes calendarios, y diferentes cantidades de preparaciones de antígeno-liposomas que se suministran.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno", que se utilizan de manera intercambiable, tienen la intención de englobar todas las secuencias peptídicas o proteicas que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en el animal al que concierne. Los términos "antígeno" o "inmunógeno" engloba análogos peptídicos o proteicos de antígenos de tipo silvestre conocidos, cuyos análogos pueden ser más solubles o más estables que el antígeno tipo silvestre, y que también pueden contener mutaciones o modificaciones que hacen que el antígeno sea más activo inmunológicamente o que estén optimizados para la expresión en ciertos tipos celulares (es decir, por el uso de codones humanizados). Un antígeno también puede ser un péptido en el que se han hecho sustituciones particulares de aminoácidos respecto a un antígeno de origen natural que alteran la

estructura proteica, una parte del antígeno de origen natural que incluye epítomos protectores conocidos (es decir, epítomos de CTL), o una tira derivada sintéticamente de epítomos conocidos que pueden estar limitados o no a un agente patógeno (vacuna multivalente).

5 También son útiles péptidos o proteínas adicionales que tienen secuencias homólogas con una secuencia de aminoácidos de un antígeno deseado en los que el antígeno homólogo induce una respuesta inmunitaria contra el agente patógeno respectivo. Los genes que son homólogos de la secuencia codificante del antígeno deseado deberían considerarse que están incluidos en la presente invención a condición de que codifiquen una proteína o polipéptido que tenga una actividad biológica sustancialmente similar a la del antígeno deseado.

10 Los análogos de los antígenos descritos en el presente documento pueden diferenciarse de las proteínas o péptidos de origen natural en aminoácidos conservadores, diferencias de secuencia o mediante modificaciones que no afecten la secuencia, o por ambas. Por ejemplo, se puede hacer cambios de aminoácidos conservadores, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o el péptido, no alteran normalmente su función. Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen la derivatización química *in vitro* o *in vivo* de polipéptidos, por ejemplo acetilación, o carboxilación. También se incluyen como antígenos las proteínas modificadas por glicosilación, por ejemplo, las que se producen por modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo enzimas glicosilantes o desglucosilantes de mamífero. También se incluyen como antígenos de acuerdo con la presente invención las secuencias que tienen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina. También se incluyen como antígenos polipéptidos que se han modificado utilizando técnicas de biología molecular convencionales de manera que mejoren su resistencia a la degradación proteolítica o que optimicen las propiedades de solubilidad. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen los que contienen restos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D- aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los antígenos de la invención no se limitan a productos de cualquiera de los procedimientos a modo de ejemplo específicos enumerados en el presente documento.

30 Un antígeno puede ser un antígeno de longitud completa o truncado, un fragmento inmunogénico del mismo, o un epítipo derivado del antígeno. En ciertas realizaciones, el antígeno específico de un agente patógeno en la preparación de refuerzo puede estar en forma de un agente patógeno atenuado o destruido. Los antígenos eficaces también incluyen antígenos de superficie de estos agentes patógenos.

35 El término "epítipo" como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferentemente aproximadamente 5 a 10 o 15 y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entre ellos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia mayor, se une a un anticuerpo generado en respuesta a dicha secuencia o estimula una respuesta inmunitaria celular. El término "epítipo" engloba secuencias idénticas de la secuencia nativa, así como modificaciones en la secuencia nativa, tal como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza). Los antígenos utilizados en la invención pueden comprender solo un único epítipo, tal como, por ejemplo, un único epítipo CTL.

45 Los antígenos codificados por los ácidos nucleicos en la preparación de sensibilización y los antígenos en la preparación de refuerzo tienen preferentemente epítomos solapados. En ciertas realizaciones, los dos antígenos pueden ser idénticos entre ellos. De manera alternativa, los dos antígenos pueden tener solapamientos pero ser diferentes grupos de epítomos. A modo de ejemplo de ilustración, en un protocolo de vacunación para HSV-2, se puede utilizar un ADN que codifica una glicoproteína de HSV-2 en la preparación de sensibilización, y la preparación de refuerzo puede ser un HSV-2 inactivado. A modo de otro ejemplo ilustrativo, la preparación de sensibilización puede ser un vector que codifica un antígeno de HSV-2, y la preparación de refuerzo puede comprender una forma proteica del antígeno, o viceversa.

50 Los antígenos de HSV-2 adecuados incluyen, pero no se limitan a la glicoproteínas gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de las mismas o proteínas tempranas inmediatas tales como ICP27, ICP 47, ICP4, ICP36. La glicoproteína gD puede ser la forma de longitud completa de la proteína (por ejemplo, la SEQ ID NO: 3) o una forma truncada, tal como el dominio extracelular de gD, o fragmentos inmunogénicos del mismo. Las formas truncadas de las glicoproteínas HSV-2 (por ejemplo, glicoproteína gD) pueden incluir formas truncadas que se secretan por las células que expresan la glicoproteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno es el dominio extracelular de gD que consiste en los aminoácidos 1-314 de la proteína gD. En otras realizaciones, el antígeno es el dominio extracelular de gD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. También se pueden utilizar variantes de las formas truncadas o de longitud completa de gD. Por ejemplo, en una realización, la glicoproteína gD comprende una secuencia de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7. Las formas de longitud completa o truncadas de las glicoproteínas de HSV-2 (por ejemplo, la glicoproteína gD) puede comprender péptidos de señal y/o marcadores de purificación (por ejemplo, histidina o marcadores c-myc). La secuencia que codifica el antígeno está optimizada para la expresión de células de mamífero tal como células humanas. Por ejemplo, para la optimización en células humanas, se eliminan o reducen motivos actuantes *cis*, tales como TATA-boxes internos, sitios chi, sitios de entrada ribosómicos, tramos de secuencias ricas en AT o GC, ARE, INS, elementos de secuencia

CRS, sitios de corte y empalme crípticos donantes y receptores, y puntos ramificados, en una cantidad de la secuencia que codifica el antígeno. En una realización, una secuencia gD con codones optimizados humana adecuada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

- 5 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de antígenos adicionales que se pueden utilizar para inducir una inmunidad protectora contra otros agentes patógenos.

Los antígenos se pueden derivar del VIH-1 (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes simple humano tipo 1 (HSV-1) (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos o de proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP 47, ICP 4, ICP36), citomegalovirus, especialmente humano (tales como gB o derivados del mismo), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados del mismo), Virus de varicela Zoster (tales como gpl, II, III y IE63), o del virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de la Hepatitis B o antígeno central de Hepatitis o pol), antígeno del virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos víricos, tales como paramixovirus: virus sincitial respiratorio (tales como las proteínas F y G o derivados de las mismas), o antígenos del virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo, proteínas HPV6, 11, 16, 18; por ejemplo, L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de encefalitis producida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de gripe tales como HA, NP, NA, o M, o combinaciones de las mismas), o antígenos derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, C5A proteasa), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, que incluyen *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSP10, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD 19 kDa [Rv3763], PPD 38 kDa [Rv0934]), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxico (por ejemplo, factores de colonización, toxina termolábil o derivados de los mismos), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo, toxina tipo toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas y invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. cholerae suis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina tetánica y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridio A o B y derivadas de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis*; *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina diftérica y derivadas de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la Ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivados de parásitos como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levaduras tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

En algunos casos, se pueden utilizar dos o más antígenos en los métodos de inmunización y kits del presente documento. En las preparaciones de sensibilización, los dos o más antígenos pueden ser proteínas de fusión en los que las proteína antigénicas de longitud completa o los fragmentos inmunogénicos se expresan a partir de una única fase de lectura abierta (por ejemplo, se expresa como una única transcripción). En otros casos, los dos o más antígenos se pueden expresar de diferentes fases de lectura abierta (por ejemplo, se expresan como transcripciones separadas) bajo el control de un único promotor o promotores diferentes. En las preparaciones de refuerzo, los dos o más antígenos pueden estar presentes como una mezcla de antígenos o como una o más proteínas de fusión. Los dos o más antígenos pueden estar en forma de un único patógeno o múltiples patógenos.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo, Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c 16 kDa, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTTC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas de *M. tuberculosis* incluyen también proteínas de fusión y variantes de las mismas en las que al menos dos,

preferentemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* están fusionados en una proteína más grande. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSI, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748). Los antígenos más preferidos para Clamidia incluyen por ejemplo la Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412), y supuestas proteínas de membrana (Pmps). Otros antígenos de Clamidia de la formulación vacunal se pueden seleccionar de entre el grupo que se describe en el documento WO 99/28475.

Las vacunas bacterianas preferidas comprende antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno proteico Pneumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados mutantes detoxificados de los mismos (documento WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no tipable, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y finbrina y péptidos derivados de finbrina (Pat. de EE.UU N° 5.843.464) o variantes de copias múltiples o proteínas de fusión de los mismos.

Los antígenos que se pueden utilizar pueden comprender adicionalmente antígenos derivados de parásitos que causan la Malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodium falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. RTS en una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la parte del extremo C de la proteína del circumsporozoito (CS) del *P. falciparum* unido mediante cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno de superficie de la Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se desvela en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/EP92/02591, publicada bajo el Número WO 93/10152 que reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente de RU N° 9124390.7. Cuando se expresa en levaduras el RTS se produce como una partícula lipoproteica, y cuando se co-exprea con el antígeno S del VHB produce una partícula mixta conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/GB89/00895, publicada bajo WO 90/01496. Un caos preferido es una vacuna de Malaria en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodios que probablemente son candidatos de componentes de una vacuna de Malaria multiestadio son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos de *Plasmodium spp.*

Las vacunas del presente documento también se pueden utilizar para la profilaxis o terapia de trastornos crónicos además de alergia o enfermedades infecciosas. Dichos trastornos crónicos son enfermedades tales como el asma, arteriosclerosis, y enfermedad de Alzheimer y otros trastornos autoinmunitarios. Las vacunas para su uso como contraceptivo también se contemplan.

Los antigénicos relevantes para la profilaxis y la terapia de pacientes susceptibles o que padecen la enfermedad degenerativa de Alzheimer son, en particular, el fragmento de aminoácidos 39-43 del extremo N (A β , el precursor amiloide proteico y fragmentos más pequeños. Este antígeno se desvela en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/27944--(Athena Neurosciences).

Los auto-antígenos potenciales que se podrían incluir como vacunas para trastornos autoinmunitarios o como vacuna contraceptiva incluyen: citocinas, hormonas, factores de crecimiento o proteínas extracelulares, más preferentemente una citocina 4-helicoides, más preferentemente IL-13. Las citocinas incluyen por ejemplo, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL20, IL21, TNF, TGF, GMCSF, MCSF y OSM. Las citocinas 4-helicoidales incluyen IL2, IL3, IL4, IL5, IL13, GMCSF y MCSF. Las hormonas incluyen, por ejemplo, hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), gonadotropina coriónica (CG), VGF, GHrelina, agouti, proteína relacionada con agouti y neuropéptido Y. Los factores de crecimiento incluyen, por ejemplo el VEGF.

Los ácidos nucleicos que se utilizan en la preparación de sensibilización pueden ser ARN o ADN incluyendo el ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferentemente la secuencia de nucleótidos en una secuencia de ADN y más preferentemente, una secuencia ADNc. Con el fin de obtener la expresión del péptido antigénico en las células de mamífero, es necesario que la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido antigénico se presente en un sistema vector apropiado. Por "vector apropiado" como se utiliza en el presente documento se quiere decir cualquier vector que haga posible que se expresen el péptido antigénico en un mamífero en cantidades suficientes para provocar una respuesta inmunitaria.

Por ejemplo, el vector seleccionado puede ser un plásmido, un fagémido o un vector vírico. El vector puede comprender un promotor y secuencias de terminación transcripcional/de poliadenilación dispuestas en el orden correcto para obtener la expresión de los péptidos antigénicos. En una realización, el vector es un plásmido (por ejemplo, pDNAVACC). La construcción de los vectores que incluyen estos componentes y opcionalmente otros componentes tales como amplificadores, sitios de enzimas de restricción y genes de selección, tales como genes de resistencia a antibióticos, se conoce bien por los expertos en la técnica se explica en detalle en Maniatis et al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Press, Vols 1-3, 2ª Edición, 1989.

El ácido nucleico en la preparación de sensibilización es un vector que codifica un antígeno de HSV-2 bajo el control de un promotor. Como se utiliza en el presente documento, "bajo el control de" o "unido operativamente" significa que el promotor está en la localización y orientación correcta en relación con un polinucleótido que codifica el antígeno para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido. Los promotores adecuados para su uso en el vector incluyen, pero no se limitan a, promotor genético temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, los promotores ARN pol I, pol II, y pol III. En una realización preferida, el promotor es un promotor genético temprano inmediato de CMV. La secuencia codificante del antígeno de HSV-2 tiene codones optimizados para la expresión en células de mamífero, tal como células humanas. En ciertas realizaciones, el vector codifica una secuencia de glicoproteína gD con codones optimizados humana de longitud completa de SEQ ID NO: 1.

Los inventores han demostrado que se puede conseguir una alta expresión de gD de HSV-2 mediante el uso de codones humanizados optimizados y el uso de un fuerte promotor, que da como resultado un aumento de la inmunogenicidad mientras que disminuye la frecuencia y dosis de ADN necesario para la sensibilización (véase los Ejemplos). Los trabajos previos demostraban que 3 dosis de 100-200 µg de ADN de gD eran necesarias para proporcionar una protección contra el desafío de HSV-2 vivo al contrario con los 0,5-5 µg de ADN que se utilizan en los estudios descritos en los Ejemplos 1-3 (29,41).

Se puede administrar un vector que alberga ácidos nucleicos que codifican un péptido antigénico en varias maneras. Es posible que se administre el vector en forma desnuda (es decir como una secuencia de nucleótidos desnuda sin estar en asociación con formulaciones de liposomas, con vectores víricos o proteínas que facilitan la transfección) suspendidos en un medio apropiado, por ejemplo, una solución salina tampón tal como el PBS y luego se inyectan por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica o mucosa o se administra utilizando una pistola genética u otros dispositivos electrónicos (es decir, electroporación). Adicionalmente, es posible que los vectores se encapsulen, por ejemplo, en liposomas o en partículas de poliláctido co-glicólido (PLG) para la administración mediante las vías nasal y pulmonar. En realizaciones preferidas, el vector que alberga ácidos nucleicos que codifican el antígeno de HSV-2 se administra en forma desnuda mediante una vía intramuscular.

También es posible la administración intradérmica del vector, preferentemente mediante el uso de técnicas de administración por pistola genética (particularmente por bombardeo de partículas). Dichas técnicas pueden implicar el revestimiento del vector en perlas de oro que se administran entonces bajo alta presión en la epidermis, tal como por ejemplo, como se describe en Haynes et al. *J. Biotechnology* 44: 37-42 (1996).

Los vectores víricos recombinantes pueden utilizarse también para suministrar ADN de antígenos. Las ventajas de esta estrategia incluyen la abundante expresión de proteínas codificadas por ADN en múltiples tipos celulares, el fuerte aumento de respuestas de CTL y la capacidad del virus para codificar múltiples genes. El virus vaccinia (incluyendo el virus Ankara modificado) y los adenovirus (no replicantes) son dos virus populares utilizados para el desarrollo de vacunas (Im y Hanke, *Expert, Rev. Vaccines* 3:S89-S97 (2004); Basak et al., *Viral Immunol.* 17:182-196 (2004)).

Recientes modificaciones de las vacunas de ADN incluyen el desarrollo de minigenes que codifican epítomos de CTL únicos, el uso de señales de direccionamiento codificadas por genes para permitir una presentación de epítomos más eficaz en la ruta del MHC y la generación de proteínas secretadas para dirigirse a la ruta de MHC clase II (Doria-Rose y Haigwood, *Methods* 31:207-216 (2003); Leifert et al., *Immunol. Rev.* 199:40-53 (2004)).

La preparación de refuerzo comprende el antígeno encapsulado en liposomas. En ciertas realizaciones, el antígeno encapsulado en liposomas en la preparación de refuerzo es el dominio extracelular de gD que comprende los aminoácidos 1-314 de la proteína gD. En otras realizaciones, el antígeno es el dominio extracelular de gD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Los liposomas tienen varias ventajas potenciales como plataformas de suministro para vacunas. La encapsulación de los antígenos en liposomas secuestra estos antígenos, por lo tanto los liposomas sirven como un depósito de antígenos capaz de una liberación sostenida del antígeno. Además, los liposomas son biocompatibles y biodegradables, y de baja toxicidad e inmunogenicidad. Cuando tienen un tamaño adecuado (por ejemplo, > 0,2 µm hasta 5 µm), los liposomas se captan selectivamente por las células presentadoras de antígeno en el cuerpo, y tienen el potencial para inducir tanto respuestas humores de anticuerpo como de CTL. Los liposomas sirven como vehículo/excipiente así como como si fuera un adyuvante que se puede administrar repetidamente sin toxicidad o inmunogenicidad.

Los liposomas son estructuras que consisten en una membrana en bicapa compuesta por fosfolípidos de origen biológico o sintético, habitualmente con forma esférica. Los liposomas se forman naturalmente cuando los fosfolípidos o lípidos se ponen en contacto con agua. La estructura de los liposomas se puede manipular por métodos para formarlos en el laboratorio, que incluyen la aplicación de energía en forma de calor, energía sónica, ciclos de congelación-descongelación, o de cizalladura. La membrana bicapa de fosfolípidos de los liposomas separa y protege los materiales atrapados en el centro acuoso interior del exterior.

Los liposomas que se utilizan en los métodos de la presente invención se pueden preparar utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Estos liposomas pueden tener un diámetro medio de 0,5 a 5 micrómetros, aproximadamente 2 a 4 micrómetros, o aproximadamente 1 a 4 micrómetros. En algunos casos, los liposomas de 0,2 a 8 micrómetros también pueden ser útiles. En ciertas realizaciones, los liposomas que se pueden utilizar en los métodos de la invención son liposomas aniónicos (por ejemplo, cargados negativamente). La carga de los liposomas se puede modificar incorporando lípidos iónicos. Véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.290.563. Por ejemplo, la incorporación de fosfato de dicetilo confiere una carga negativa a los liposomas. En una realización, los liposomas que se utilizan en las preparaciones de refuerzo son liposomas aniónicos que comprenden fosfatidilcolina, colesterol, y fosfato de dicetilo. En otra realización, los liposomas que comprenden fosfatidilcolina, colesterol, y fosfato de dicetilo en una realización de 7:3:0,5 % molar. En algunas realizaciones, los liposomas que se utilizan en las preparaciones de refuerzo consisten en lípidos, es decir los liposomas no contienen proteínas, ligandos, o adyuvantes adicionales. Por ejemplo, en una realización, los liposomas no son liposomas fusogénicos (es decir, no contienen ninguna proteína incorporada en la membrana liposómica).

A modo de ejemplo, un método para fabricar los liposomas que se pueden utilizar en las preparaciones de refuerzo en los métodos de la invención se describe de la siguiente manera. Los liposomas del objeto de la invención se preparan con las siguientes concentraciones de lípidos: Fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo 7/3/0,5 % molar. El fosfato de dicetilo se disuelve en cloroformo más un 5 % de etanol, se sonica y entonces se añade la fosfatidilcolina y el colesterol. Se secan los lípidos en un evaporador rotatorio Labconco durante una hora y las trazas de cloroformo se retiran por secado por congelación con un Sistema de Secado por Congelación Freezone 4.5 durante una noche. La película lipídica se hidrata con el antígeno, tal como la glicoproteína gD del HSV-2 (gD), a una concentración de 125-300 µg/ml en 10 mM de tampón HEPES, 150 mM de NaCl, pH 7,4 (HBS), y se filtra con un filtro de nilón de 0,2 µm. La mezcla se removió completamente y se dejó que se asentara durante 1 hora y después se removió de nuevo para asegurar la formación de vesículas multilamelares. Los liposomas resultantes se someten entonces a tres ciclos de congelación y descongelación (1 ciclo de congelación durante una hora y descongelación durante otra hora a temperatura ambiente). El tamaño de los liposomas se midieron con un Analizador de Tamaño de Partículas submicrométricas MD N4 (Coulter Electronics). Se midió el potencial zeta utilizando el analizador de potencial zeta Zeta-Puls (Brookhaven Instruments) en 5 mM de tampón HEPES, 1,0 mM de NaCl, pH 7,4. Para obtener liposomas con diámetros medios específicos menores de 2 micrómetros, después del tercer ciclo de congelación-descongelación, los liposomas se pueden calentar en un baño de agua a 50 °C y se extrudió a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 1,0 µm para obtener los liposomas con diámetros medios de aproximadamente 1,0 µm. Los liposomas se pueden extruir adicionalmente para obtener liposomas de tamaño pequeño, por ejemplo, por extrusión adicional de los liposomas a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 0,4 µm y finalmente de 0,2 µm utilizando un micro-extrusor Avanti manual para obtener liposomas de diámetros medios de aproximadamente 0,2 µm.

En ciertas realizaciones, los liposomas que se pueden utilizar en los métodos de la invención son "liposomas de larga circulación" (también conocidos como "liposomas estéricamente estabilizados"), que son liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados, que cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado el aumento del tiempo de circulación con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas de circulación larga conocidos en la técnica incluyen los que el liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos tales como monosialogangliósido GM1 o (B) comprende uno o más lípidos derivados con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, al menos para los liposomas de larga circulación que contienen gangliósidos, esfingomielina, o lípidos derivados con PEG, el aumento de la semivida en la circulación de estos liposomas deriva de una captación reducida en el sistema reticuloendotelial (RES) de las células (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Se conocen distintos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos en la técnica. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) expuso la capacidad del monosialogangliósido GM1, sulfato de cerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en la sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron explicados por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 6949). Pat. de EE. UU. N° 4.837.028 y Solicitud PCT publicada WO 88/04924, ambas de Allen et al., desvelan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido GM1 o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La Pat. de EE. UU. N° 5.543.152 (de Webb et al.) desvela liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se desvelan en la solicitud PCT publicada WO 97/13499 (de Lim et al.).

Muchos liposomas comprenden lípidos derivados con uno o más polímeros hidrófilos, y los métodos de preparación de los mismos, se conocen en la técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describía liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C1215G, que contiene un resto PEG. Illum et al. (FEBS Letters, 1984, 167, 79) señaló que el revestimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado un aumento significativo de semividas en la sangre. Los fosfolípidos sintéticos modificados por el acoplamiento de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) y los liposomas que comprenden dichos fosfolípidos son descritos por Sears (Pat. de EE. UU. N° 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov et al. (FEBS Letts., 1990, 268, 235) describían experimentos que demostraban que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos de las semividas en la circulación

sanguínea. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendía dichas observaciones a otros fosfolípidos derivados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir del acoplamiento químico de PEG a DSPE (distearoilfosfatidiletanolamina).

Los liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente en su superficie externa se describen en la Patente Europea 0 445 131 B1 y solicitud PCT publicada WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 porcentaje molar (% molar) de PE derivada con PEG, y los métodos del uso de las mismas son descritas por Woodle et al. Pat. de EE. UU. N° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (Pat. de EE. UU. N° 5.213.804 y Patente Europea N° EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden una cantidad de otros conjugados lípido-polímero se desvelan en la solicitud PCT publicada WO 91/05545 y Pat. de EE. UU. N° 5.225.212 (ambas de Martin et al.) y en la solicitud PCT publicada WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en la solicitud PCT publicada WO 96/10391 (Choi et al.). Pat. de EE. UU. N° 5.540.935 (Miyazaki et al.) y 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que se pueden derivar en sus superficies con restos funcionales.

Se habían descrito distintos liposomas que comprenden dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). En general, sin embargo, dichos liposomas comprenden DMPG en un % molar de aproximadamente un 10 % o más (véase, por ejemplo, Akhtar et al. (Nucl. Acids Res., 1991, 19, 5551; Yachi et al. (Biopharm. Drug Dispos., 1996, 17, 699; y Farmer et al. (Meth. Enz., 1987, 149, 184). Los liposomas que tienen 3 % molar de DMPG se habían descrito, pero dichos liposomas incluían un componente (en particular, un derivado de fosfatidilcolina) que se encuentra en composiciones liposómicas de la presente invención. Dichos componentes derivados de fosfatidilcolina incluyen, por ejemplo, un 10 % molar de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Brodt et al., Cancer Immunol. Immunother., 1989, 28, 54) o 7 % molar de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Perez-Soler et al., J. Nuclear Med., 1985, 26, 743; Wasan et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993, 37, 246; y Li et al., Oncology Res., 1995, 7, 611).

La preparación de liposomas puede estar recién preparada o liofilizada para el almacenamiento a largo plazo. Ambas preparaciones se pueden utilizar con eficacia comparable. Los liposomas que se utilizan en los métodos de la invención pueden ser los mismos (por ejemplo, misma composición o mismo tamaño), o incluyen más de un tipo de liposomas.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar liposomas disponibles en el mercado. Por ejemplo, se pueden fabricar liposomas bajo contrato con Northern Lipids Inc. (Vancouver, BC), una organización de investigación contratista que se especializa en el desarrollo de formulaciones de liposomas basadas en lípidos. En otras ciertas realizaciones, se pueden preparar liposomas de distintos tamaños utilizando la metodología que se describe posteriormente. Los liposomas resultantes, dependiendo de los protocolos de preparación específicos tienen tamaños normalmente de entre aproximadamente 0,5 µm y 5 µm, por ejemplo, de 4 µm, 1 µm, o 0,2 µm pasando las preparaciones a través de un microfluidificador. En resumen, se pueden preparar liposomas cargados negativamente con las siguientes concentraciones de lípidos: fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo 7/3/0,5 % molar. Se incorpora un antígeno tal como el antígeno de HSV-2 (por ejemplo, glicoproteína gD de HSV-2) en liposomas multilaminares a varias concentraciones para el ensayo de respuestas inmunitarias. El tamaño de los liposomas se puede medir con un Analizador de Tamaño de Partícula Submicrométrica MC N4 (Coulter Electronics). En ciertas realizaciones, las preparaciones de antígeno se pueden liofilizar para el almacenamiento y después reconstituirse antes de su uso. Tanto el tamaño como el potencial ζ (zeta, una medida de carga) se pueden medir antes de su uso. El potencial ζ se determinó utilizando el analizador del potencial ζ Zeta-Puls (Brookhaven Instruments). La relación lípido:antígeno proteico se puede variar en algunas preparaciones con el fin de determinar la importancia de esta relación sobre las respuestas inmunitarias al antígeno específico (por ejemplo, gD de HSV-2).

Las preparaciones de sensibilización y refuerzo se administran en una cantidad que será profiláctica o terapéuticamente eficaz. La cantidad exacta puede variar considerablemente dependiendo de la especie y el peso del animal que se va a inmunizar, la vía de administración, la potencia y la dosis de las preparaciones de sensibilización y refuerzo, la naturaleza del estado de enfermedad que se va a tratar o proteger, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para producir una respuesta inmunitaria y el grado de protección o eficacia terapéutica deseada. Basándose en estas variables, un médico o veterinario encargado será capaz de determinar fácilmente el nivel de dosificación adecuado. En los siguientes ejemplos, se determinaron que las dosis adecuadas del vector de ADN que codifica la glicoproteína gD del HSV-2 que se utiliza en la preparación de sensibilización son aproximadamente de 0,5 µg a 5 µg para los ratones y aproximadamente de 100 µg para los cobayas. Estas dosis se pueden escalar a dosis apropiadas para su uso en seres humanos por un experto habituado en la técnica sin necesidad de experimentación. Por ejemplo, las dosis adecuadas del vector de ADN que codifica la proteína gD de HSV-2 en seres humanos puede ser desde aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg. La dosificación precisa dependerá del tipo de vector utilizado, el promotor, el nivel de expresión del antígeno, y el tipo y nivel de codones optimizados de la secuencia de nucleótidos del antígeno. En los siguientes ejemplos, se determinaron que las dosis adecuadas de glicoproteína gD del HSV-2 encapsulada en liposomas que se utiliza en las preparaciones de refuerzo son aproximadamente de 15 µg/50 µl para ratones y aproximadamente 6 µg a 30 µg/100 µl para cobayas. Al igual que las dosis del vector de ADN, estas dosis para la preparación de refuerzo se pueden ajustar apropiadamente para su uso en seres humanos. Las dosis adecuadas para seres humanos del antígeno gD encapsulado en liposomas puede ser de

aproximadamente 3 a 100 µg/100 a 400 µl, por ejemplo aproximadamente 10 µg/100 µl a aproximadamente 50 µg/100 µl.

También se describe un método para proporcionar una inmunidad protectora pasiva contra el HSV-2 en un mamífero que necesita la misma. En un caso, el método comprende el aislamiento del suero de un mamífero donante inmunizado y administrar el suero inmune aislado a un mamífero receptor, en el que el mamífero receptor se protege de esta manera de la infección por HSV-2. Preferentemente, el mamífero donante se inmuniza por los métodos. Por ejemplo, el mamífero donante se inmuniza administrando al mamífero donante una preparación de sensibilización que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno del HSV-2 y una preparación de refuerzo que comprende el antígeno encapsulado en liposomas, en el que la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal. En algunas realizaciones, el mamífero donante se inmuniza utilizando la glicoproteína gD como antígeno del HSV-2. El suero inmune aislado, puede comprender anticuerpos neutralizantes de HSV-2 y/o anticuerpos IgG e IgA específicos del antígeno del HSV-2 (por ejemplo, anticuerpos IgG e IgA anti-glicoproteína gD).

En ciertos casos, el método comprende adicionalmente aislar linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ del mamífero donante y administrar los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ al mamífero receptor. En otro caso, los mamíferos donante y receptor son seres humanos. En otro caso más, el mamífero receptor está en riesgo de infección por HSV-2.

Los métodos de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en relación con procedimientos profilácticos o de tratamiento de todos los mamíferos incluyendo, por ejemplo, animales domésticos, animales de laboratorio, animales de granja, animales salvajes en cautividad y, más preferentemente, seres humanos.

Se contempla que los métodos y kits en el presente documento también se puede practicar con la adición de uno o más adyuvantes conocidos en la técnica. Sin embargo, en algunos casos, no se incluye un adyuvante adicional en las preparaciones de refuerzo. Los inventores han descubierto que los nuevos métodos que se proporcionan en el presente documento las respuestas inmunitarias deseadas sin necesidad de ningún adyuvante excepto el liposoma, evitando así los riesgos y complicaciones asociadas con muchos adyuvantes, especialmente toxinas bacterianas tales como toxina del cólera (CT) y la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT).

Un adyuvante es una sustancia o procedimiento que aumenta las repuestas inmunitarias específicas a los antígenos modulando la actividad de las células inmunitarias. Los adyuvantes a modo de ejemplo incluyen adyuvantes basados en sales tales como las sales de aluminio, adyuvantes derivados de bacterias como los lipopolisacáridos y toxinas bacterianas, emulsiones adyuvantes que hacen posible la liberación lenta del antígeno, anticuerpos agonistas con moléculas co-estimulantes, adyuvante de Freund, muramil dipéptidos, y adyuvantes recombinantes/sintéticos. En una realización particular, el adyuvante es un ligando del receptor tipo toll (TLR), particularmente TLR-4, tal como el monofosforil lípido A (MPL), o el ligando de TLR-7, tal como R837. Recientemente, se ha expuesto que los ligandos de TLR-4 y TLR-7 en combinación con una formulación de nanopartículas aumentan y prolongan las respuestas de anticuerpo cuando se administran con la inmunización seguida de antígeno (Kasturi et al. (2011) *Nature*, Vol. 470: 543-560). Por lo tanto, los ligandos TLR-4 y/o TLR-7 pueden incluirse en las preparaciones de sensibilización o refuerzo de la invención. El aluminio es el adyuvante basado en sales más común que se utiliza para estimular respuestas inmunitarias contra las vacunas proteicas y es el único adyuvante aprobado para su uso en seres humanos en los Estados Unidos (Alving, *Vaccine* 20(3):S56-S64 (2002); Hunter, *Vaccine* 20(3):S7-12 (2002)). Sin embargo, el aluminio favorece las respuestas tendientes a Th2 y no estimula la inmunidad mediada por células. La inmunidad mucosa se puede inducir mediante el uso de toxinas bacterianas tales como la toxina del cólera (CT) y la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT), sin embargo la seguridad de estos adyuvantes es cuestionable (Alving, *Vaccine* 20(3):S56-S64 (2002); Hunter, *Vaccine* 20(3):S7-12 (2002)). El desarrollo de los adyuvantes más nuevos y seguros se ha enfocado recientemente en estimular rutas de respuesta inmunitaria particulares. La co-administración de citocinas, tales como el interferón-γ y el factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), se muestran como prometedores en la estimulación de las respuestas inmunitarias (revisado en (Petrovsky y Aguilar, *Immunol. Cell Biol.* 82:488-496 (2004)). Sin embargo, los altos niveles de citocinas pueden producir toxicidad, y los regímenes de dosificación se deben modular cuidadosamente. La administración de citocinas es una promesa particular para la vacunación con ADN en la que los genes que codifican la citocina y el antígeno se pueden expresar simultáneamente por el mismo vector. Los adyuvantes adicionales que se están explorando incluyen los que se dirigen a la ruta de señalización toll. Los motivos CpG del ADN que se encuentran comúnmente en el ADN bacteriano son potentes activadores de las respuestas inmunitarias celulares, y las vacunas basadas en ADN de nueva generación a menudo codifican múltiples motivos CpG (revisado en (Petrovsky y Aguilar, *Immunol. Cell Biol.* 82:488-496 (2004)).

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos adicionales que no se deberían considerar como limitantes. Los expertos en la técnica deberían a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y obtener aún un resultado parecido o similar sin alejarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. La inmunización heteróloga induce respuestas sinérgicas de IgG específicas de gD del HSV-2

5 Los inventores demostraron previamente que la carga y tamaño de los liposomas son críticos para la inducción de respuestas óptimas contra HBsAg cuando se suministra por vía intranasal (26). Para confirmar esta observación para el antígeno gD del virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), los inventores inmunizaron homológicamente (con una separación de 3 semanas) con liposomas cargados positiva o negativamente con tamaños medios de 0,2 o 1-4 μm . Cada condición de liposoma se ensayó con 3 o 15 μg de gD incorporada. Como se observaba para HBsAg, solamente los liposomas cargados negativamente inducían respuestas de IgG específica de gD medibles (datos no mostrados). Los inventores observaron también que 15 μg de proteína encapsulada en liposomas con un tamaño de 1-4 μm inducían las respuestas más altas (datos no mostrados). A partir de estos experimentos, se escogió la composición del liposomas óptima como 15 μg de gD encapsulada en liposomas cargados negativamente con un tamaño de 1-4 μm (de aquí en adelante llamados gD LIP).

15 La investigación anterior había de mostrado que la vacunación con altas dosis múltiples de ADN de gD solo es suficiente únicamente para proteger los ratones y los cobayas del desarrollo de enfermedad después de un desafío letal con HSV-2, aunque la replicación vírica solo puede ser contenida parcialmente (29,30). Sin embargo, altas dosis múltiples (hasta de 3 mg) de vacunación con ADN solo no son inmunogénicas de manera similar en los seres humanos (31). Un papel reciente del mismo grupo demostraba que esta vacuna de ADN daba lugar a respuestas celulares T específicas de HSV, en el que los autores denominaban "inmunoseronegativos" (32). Como estos eran estudios en seres humanos, no se sabe cómo de efectivas pueden ser las respuestas seronegativas, celulares positivas en la prevención o modificación de un desafío posterior.

25 Para desarrollar una vacuna que sea eficaz en la población humana, los inventores hicieron la hipótesis de que un régimen de vacunación de sensibilización y refuerzo que se basa en respuestas sinérgicas (incluyendo respuestas inmunitarias mucosas) después de la inmunización heteróloga con componentes de ADN y antígeno-liposomas de la vacuna tendría una mayor oportunidad de éxito. Para producir la vacuna de gD, se sintetizó la secuencia de ADN que codifica gD *in vitro* para generar una secuencia genética completamente optimizada para la expresión en células de mamífero (GeneArt; North Carolina). El gen sintetizado (SEQ ID NO: 1) se clonó en un vector específico de vacuna de ADN, pDNAVACC (Nature Technology; Nebraska) bajo el control de un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE) y se secuenció para confirmar su identidad. Se confirmó la expresión eficaz de la proteína gD de HSV-2 por la construcción vacunal del ADN de gD tanto por transferencia de Western como por ELISA (datos no mostrados). Se adquirió el antígeno gD en Vybiom (Ithaca, New York). El antígeno se produjo en *Pichia pastoris* y comprendía el dominio extracelular de gD (SEQ ID NO: 2). Se prepararon los liposomas con gD encapsulada como se había descrito anteriormente (26).

40 Para ensayar la hipótesis de los inventores, primero titularon la vacuna de ADN de gD en ratones para determinar la dosis óptima de vacunación. Se inmunizaron por vía intramuscular ratones Balb/c hembras con distintas dosis de la vacuna de ADN de gD (0,05-50 μg de ADN de gD). Tres semanas después de la inmunización se recolectó el suero y se agrupó de los ratones inmunizados y se midieron las respuestas de IgG total contra gD utilizando un ensayo ELISA. En la segunda dosis de vacunación más baja (0,25 μg de ADN), 4/6 ratones desarrollaron anticuerpos contra gD. Las dosis más altas de ADN daban como resultado una respuesta dependiente de la dosis en todos los animales (Figura 1A). Los ratones se inmunizaron con 0,5, 5 o 50 μg de ADN gD tenían títulos de anticuerpo específicos de gD de 28, 94 y 203 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG, respectivamente. Esto era mayor que la respuesta de IgG que se veía en los ratones que se habían infectados con virus HSV-2 (1000 ufp) durante 50 semanas ($\sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG; datos no mostrados). Estos resultados indican que la vacuna de ADN expresa la proteína gD en cantidades suficientes para provocar respuestas de anticuerpo específicas de antígeno.

50 Para determinar si la parte de ADN de la vacuna era protectora en ratones contra la enfermedad y la mortalidad, los ratones desafiados vacunados con la vacuna de ADN gD solo con una dosis baja (5 DL50) o alta (100 DL50) de HSV-2. Como se muestra en la Figura 1B, excepto la dosis más baja de vacuna de ADN todas proporcionaban protección al desafío con 5 DL50 de HSV-2. Más del 50 % de los animales inmunizados con las vacunas de ADN excepto las dos dosis mayores murieron o estaban moribundos a las 2 semanas de la infección con 100 DL50 de HSV-2 (Figura 1C). La dosis más alta de desafío vírico ayudaba a revelar que la protección contra la infección por HSV-2 era dependiente de la dosis de vacunación con ADN: cuanto mayor era la concentración de vacuna de ADN, mayor era el número de animales que sobrevivían. Basándose en estos resultados, los inventores escogieron las dosis de 0,5 μg y 5,0 μg como baja (subóptima) y alta dosis de vacuna de ADN para utilizarse en los estudios posteriores.

60 Para ensayar la capacidad de la vacuna completa (gD ADN + gD LIP) para inducir respuestas inmunitarias, se inmunizaron los ratones Balb/c hembras de manera heteróloga con una inyección intramuscular (i.m.) de 0,5 μg de ADN de gD (administradas los días 0 y 2) seguida por un refuerzo intranasal (i.n.) de gD LIP (50 μl de dosis total por ratón en ambas narinas) administrado 3 semanas más tarde. Para evaluar la contribución de cada componente vacunal, se inmunizaron grupos separados de ratones con gD ADN seguido por liposomas vacíos (gD ADN) o vector vacío seguido por gD LIP (gD LIP). Además, los inventores ensayaron el efecto del aumento de la dosis de

sensibilización de la vacuna de ADN inmunizando un grupo adicional de ratones con 5 µg de gD ADN + gD LIP. Los ratones intactos servían como control negativo. Se midieron las respuestas de anticuerpo en el suero y vaginales por ELISA dos semanas después de la inmunización con liposomas. Los resultados se muestran en la Figura 2.

La IgG del suero apenas se detectaba después de una única vacunación con cualquiera de los componentes solos (Figura 2A). Por el contrario, los niveles de IgG después de la inmunización con 0,5 µg de gD ADN + gD LIP alcanzaban más de 1100 µg/ml, demostrando una respuesta sinérgica clara. Los animales inmunizados con 5 µg de gD ADN + gD LIP tenían respuestas de anticuerpos séricos de dos veces las de los animales inmunizados con 0,5 µg de gD ADN + gD LIP (2393 µg/ml y 1151 µg/ml, respectivamente). La diferencia de los niveles de IgG después de la inmunización con cualquier componente solo frente a ambos componentes en combinación era altamente significativa ($p < 0,0001$). Las respuestas de anticuerpo vaginales (IgG e IgA) seguía un patrón similar (Figura 2B), sin embargo, las diferencias no alcanzaban una significación estadística. Cuando el refuerzo con gD liposomas se suministraba i.m. después de la sensibilización con ADN (dosis de 0,5 µg) solamente se observó un aumento marginal de la IgG del suero en ausencia de cualquier respuesta mucosa (datos no mostrados).

Se utilizó un ensayo de neutralización basado en placas para comparar la capacidad de los anticuerpos del suero para neutralizar virus HSV-2 completos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes de HSV-2 se midieron con un ensayo de neutralización dependiente de complemento. Se añadió complemento de cobaya (Biomed; Foster City, CA) al medio a una dilución final de 1:125. La mezcla de medio-complemento se utilizó como diluyente en la preparación de diluciones del virus y las diluciones de suero adicionales. Se combinaron una cantidad de 0,15 ml de diluciones de tres veces de suero con un volumen igual de dilución vírica (calculada para producir aproximadamente 100 unidades formadoras de placas) y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Después de retirar el medio de cultivo, se añadieron 0,3 ml de cada mezcla de suero-virus para duplicar los cultivos celulares de Vero que habían crecido cerca de la confluencia en placas de cultivo tisular de 35 mm. Estas placas se incubaron y agitaron a temperatura ambiente durante 1 h. El inóculo se retiró y se añadió un medio que contenía un 2 % de FBS y 7,5 µg/ml de inmunoglobulina humana agrupada (Sigma; St Louis, MO) a cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ durante dos días, el medio de cultivo se desechó y las células se fijaron y tiñeron con un 0,5 % de azul de metileno en un 70 % de metanol. Las placas se contaron y se midió el porcentaje de reducción de placas en comparación con el control (virus incubado sin suero).

Ni el suero recolectado de ratones intactos, ratones inmunizados con 0,5 µg de gD ADN solo o gD LIP solo inducían anticuerpos neutralizables medibles (datos no mostrados). Por el contrario, las muestras de suero recolectadas de ratones inmunizados con 0,5 µg de gD ADN + gD LIP neutralizaban fuertemente el HSV-2, dando como resultado un 70 % de reducción en el número de placas que se veían cuando el suero se diluía a 1:150. La actividad neutralizante debería aumentar utilizando 10x más de dosis de sensibilización de gD ADN (5 µg), seguido por el mismo procedimiento de refuerzo gD LIP. Las muestras de suero agrupadas de los ratones vacunadas con 5 µg de gD ADN + gD LIP demostraba un 94 % de reducción en el número de placas después de una dilución 1:150 de la muestra.

Los resultados de esta serie de experimentos muestran que una inmunización heteróloga que implica la vacunación intramuscular con un ácido nucleico que codifica el antígeno gD seguido por un refuerzo intranasal de la forma proteica del antígeno encapsulada en liposomas produce una respuesta sinérgica de anticuerpos neutralizante en suero y mucosa contra el antígeno.

Ejemplo 2. La inmunización heteróloga induce respuestas de auxiliares Th1 a Th1/Th2 equilibrados

La relación de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicas de antígeno se utilizó para caracterizar la tendencia de tipo T auxiliar de una respuesta inmunitaria (26,33,34). Las relaciones IgG1:IgG2a $< 0,5$ indican una respuesta inmunitaria tendente a Th1, mientras que una relación de $\geq 2,0$ indica una respuesta inmunitaria tendente a Th2. Las relaciones entre 0,5 y 2,0 indican una respuesta mixta.

Para evaluar la contribución de cada componente de la vacuna (por ejemplo gD ADN y gD LIP) y caracterizar el tipo de respuesta inmunitaria inducida por el protocolo de inmunización heteróloga, los inventores utilizaron ensayos de ELISA cuantitativa para determinar la relación IgG1:IgG2a obtenida tras la administración de cada componente individual y los dos componentes combinados. Los inventores también compararon los resultados después de la inmunización con 0,5 µg de gD ADN o 5 µg de gD ADN (Figura 3). La inmunización con 0,5 µg de gD ADN o gD LIP solas daban como resultado relaciones de IgG1:IgG2a de 0,84 y 27,9 respectivamente, indicando respuestas mixtas y tendentes a Th2. La relación después de la inmunización con 5 µg de gD ADN solo era de 0,39 indicando una respuesta tendente a Th1. Las relaciones después de la inmunización con ambos componentes eran de 0,47 y 0,33, respectivamente, después de la sensibilización con 0,5 µg o 5 µg de gD ADN.

Estos resultados demuestran que: (1) la inmunización con gD ADN solo induce una respuesta mixta o tendente a Th1 dependiendo de la cantidad de ADN que se utilice; (2) con gD LIP solo induce una respuesta tendente a Th2; (3) las respuestas tendentes a Th1 establecidas por la sensibilización con ADN se mantienen después del refuerzo con el componente proteico encapsulado en liposomas de la vacuna.

Además de la IgG del suero y vaginales, y las células T CD4, el IFN- γ también es un mecanismo protector principal

en las infecciones por HSV-2 (35). Aunque el IFN- γ no es esencial para el aclaramiento vírico, tiene un papel importante en aumentar los mecanismos de aclaramiento mediado por células T (36). El IFN- γ producido localmente en el tracto genital aumenta el aclaramiento vírico y puede en último término ser importante para reducir la cantidad de virus disponible para infectar los ganglios sensoriales.

El examen de respuestas de células T específicas contra gD se limita en los ratones Balb/c ya que los epítomos específicos de gD ya se habían definido en esta estirpe. Para determinar si la proteína gD completa podía utilizarse para estimular las células T específicas de gD, los inventores vacunaron los ratones con 0,5 μ g gD ADN, gD LIP o 0,5 μ g de gD ADN + gD LIP y se infectaron los animales con HSV-2 dos semanas después de la inmunización con liposomas. Los inventores razonaban que la infección actuaría como un refuerzo adicional de manera que se aumenten las respuestas inmunitarias y aumenten la probabilidad de detectar respuestas de células T específicas de gD. Diez días después de la infección, se aislaron los esplenocitos y se incubaron con 10 μ g/ml de proteína gD. Los sobrenadantes se recolectaron 48 horas después de la estimulación y se examinaron en un ensayo ELISA para detectar el IFN- γ . Como se muestra en la Figura 4A, el IFN- γ se detectaba fácilmente en los animales infectados vacunados con cualquiera de los componentes solos o por la inmunización heteróloga, mientras que la liberación de IFN- γ era mínima en el único animal intacto superviviente (152 pg/ml). La vacunación con gD ADN solo inducía la respuesta de IFN- γ más alta que era significativamente mayor que el nivel observado tras la vacunación con gD LIP o gD ADN+ gD LIP ($p < 0,05$). La menor producción de IFN- γ que se encontraba en los animales vacunados con gD ADN + gD LIP puede deberse a la respuesta inmunitaria protectora establecida por la vacunación, lo que da lugar a la disminución de la infección vírica y por lo tanto limita su efecto de refuerzo de la producción de IFN- γ . De manera más importante, la secreción de IFN- γ estaba aumentada en los grupos vacunados de ratones sugiriendo que se establecía una respuesta de células T específicas por la inmunización y que se reclutaba vigorosamente con el desafío vírico.

En un experimento por separado, los inventores midieron los niveles de IFN- γ en las muestras de lavados vaginales de ratones intactos o vacunados infectados con HSV-2 cantidades de tiempo variables. Se vacunaron grupos de ratones con 0,5 μ g de ADN, 5 μ g de ADN, gD LIP, 0,5 μ g de gD ADN + gD LIP o 5 μ g de gD ADN + gD LIP y se infectaron 2 semanas después de la última inmunización. Se recolectaron los lavados vaginales los días 0 (antes de la infección), 1, 3, 5 y 7 después de la infección y se utilizaron en un ensayo ELISA para medir directamente los niveles de IFN- γ . El IFN- γ era indetectable los días 0, 1 pero aumentaba el día 3 y alcanzaba un pico el día 4 después de la infección (Figuras 4B y C), un momento en el que las células T de memoria responden al desafío vírico y las células inmunitarias intactas se someten a una respuesta inmunitaria innata (34,35). El día 3 después de la infección, los niveles de IFN- γ más bajos eran los de los animales intactos. Se veían niveles más altos de IFN- γ en animales vacunados con cualquiera de los componentes solo, viéndose las mayores respuestas en animales inmunizados con gD ADN ya que las respuestas eran recordadas por las células previamente sensibilizadas. De manera interesante, el día 5 los niveles de IFN- γ en los ratones vacunados con 0,5 μ g ADN + gD LIP eran menores que en animales vacunados solo con gD LIP, y los niveles en los animales vacunados con 5 μ g de gD ADN + gD LIP eran casi indetectables. El día 5 después de la infección, los animales intactos presentaban una respuesta innata robusta contra el virus, que era mayor que la de los animales vacunados con gD ADN solo, gD LIP solo o 0,5 μ g ADN + gD LIP mientras que los niveles en los animales vacunados con 5 μ g de ADN + gD LIP se mantenían casi indetectables. El día 7 después de la infección, el nivel de IFN- γ en animales intactos eran menores (64 pg/ml) que el de los animales vacunados con 0,5 μ g de gD ADN solo (255 pg/ml), gD LIP solo (128 pg/ml) o 0,5 μ g de gD ADN + gD LIP (108 pg/ml) mientras que los niveles de IFN- γ en los animales vacunados con 5 μ g de ADN + gD LIP se mantenían indetectables. La falta de respuesta de IFN- γ en los animales vacunados con 5 μ g de ADN + gD LIP puede sugerir que la replicación vírica estaba eficazmente inhibida probablemente por anticuerpos neutralizantes al desafiarse con el virus, basándose en la correlación entre la replicación vírica y la secreción de IFN- γ .

Ejemplo 3: La inmunización heteróloga protege a los animales de una dosis letal de HSV-2 e induce una inmunidad a largo plazo

Para ensayar la capacidad de la inmunización heteróloga para proporcionar una protección frente al virus vivo, los inventores infectaron ratones inmunizados con 0,5 μ g de gD ADN o gD LIP solos y los ratones inmunizados con 0,5 μ g de gD ADN + gD LIP. Dos semanas después de la última inmunización, se inocularon los animales vía intravaginal con 100x DL50 de HSV-2. El aislado clínico de la cepa MS del HSV-2 se adquirió en la ATCC y se cultivó y tituló en células Vero. Cinco días antes de la infección, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con 2 mg de medroxiprogesterona (Depo-Provera, Pfizer, St. Louis, MI). El día de la infección se anestesiaron los animales por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina/xilacina y se les instilaron por vía intravaginal 20 μ l de suspensión que contenía la dosis vírica indicada. Los animales se controlaron en cuanto al peso corporal y signos clínicos de enfermedad durante al menos 21 días después de la infección. Las lesiones se valoraron de acuerdo con la siguiente escala: 0= enrojecimiento o lesiones no visibles, 1 = enrojecimiento o ligera hinchazón, 2 = erosiones, vesículas o hinchazón moderada, 3: vesículas bastante grandes, 4 = grandes úlceras con maceración grave y/o retención urinaria y/o parálisis de extremidades posteriores. A los animales que alcanzaban una valoración clínica de 4 se les practicó la eutanasia inmediatamente. Un resumen de las valoraciones clínicas se muestran en la Tabla 2 y las curvas de supervivencia se muestran en la Figura 5.

Tabla 2. Valoraciones clínicas que disminuyen en ratones inmunizados por la inmunización heteróloga

Inmunización	Nº de animales con la valoración clínica (%)			
	0	1-2	>2	Muerte
Intacto	0	0	5 (100 %)	4 (80 %)
0,5 µg gD ADN	0	1 (10 %)	9 (90 %)	5 (50 %)
gD LIP	0	0	10 (100 %)	6 (60 %)
0,5 µg gD ADN + gD LIP	3 (30 %)	4 (40 %)	3 (30 %)	2 (20 %)

0- normal; 1- enrojecimiento o ligera hinchazón; 2- manchas superficiales, ampollas, hinchazón moderada; 3- múltiples ampollas o manchas superficiales; 4- grandes ampollas con úlceras graves y/o profundas; y/o retención urinaria; y/o parálisis de extremidades posteriores. Los animales que demostraban una valoración de 4 se consideraban moribundos y se sacrificaban. n = 5 para el grupo intacto y n = 10 para el resto de los grupos.

5 Todos los animales intactos infectados progresaban hacia signos graves de enfermedad; 4/5 de los animales estaban moribundos o muertos como resultado de la enfermedad. El quinto animal desarrolló una valoración de 3,5. Las puntuaciones clínicas máximas medias entre los animales infectados inmunizados con 0,5 µg de gD ADN o gD LIP solos era de 2,7 y 3,0, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia después de la vacunación con 0,5 µg gD ADN o gD LIP solos en comparación con los animales no vacunados ($p = 0,08$ y $0,55$, respectivamente). Por el contrario, la mortalidad estaba significativamente reducida en animales vacunados con el régimen heterólogo en comparación con los animales sin vacunar ($p = 0,01$). Solamente 2/10 animales (el 20 %) que se sometieron a inmunización heteróloga estaban moribundos/muertos. Una mayoría de los animales inmunizados con 0,5 µg de gD ADN + gD LIP desarrollaban solamente signos menores de la enfermedad. Tres animales infectados no desarrollaron ningún síntoma de enfermedad clínica, mientras que cuatro no progresaron de la valoración clínica de 2,0.

15 En un experimento separado, los animales se acunaron con 5 µg de gD ADN solo o 5 µg de gD ADN + gD LIP antes de la infección. En este experimento, los animales solo se mantuvieron hasta 10 días post infección para que se pudieran recoger los bazos. En el momento del sacrificio de los animales (día 120), 5/6 animales vacunados con 5 µg de gD ADN solo tenían una valoración clínica de 3 mientras que el sexto animal tenía una valoración clínica de 2. De manera importante, solo 1/5 animales inmunizados con 5 µg de gD ADN + gD LIP presentaba una valoración clínica de 4, mientras que los restantes cuatro animales no presentaban signos clínicos de enfermedad.

25 Se recolectaron muestras vaginales de animales intactos no nativos, animales inmunizados con 0,5 µg gD ADN o gD LIP solos, o animales inmunizados con 0,5 µg de gD ADN + gD LIP los días 1, 3, 5 y 7 después de la infección. Además se recolectaron muestras de los animales inmunizados con 5 µg de gD ADN solo o los animales inmunizados con 5 µg de gD ADN + gD LIP que no mostraban signos clínicos de enfermedad el día 10 después de la infección. Las muestras se titularon en células Vero ara la detección del virus. En los animales no vacunados, el virus se podía detectar en la vagina 1 día después de la infección (Figura 6). Los títulos víricos tenían un pico a los 3 días después de la infección y descendían a continuación, paralelamente a los niveles de IFN- γ (Figura 4). Los días 1, 3 y 5 después de la infección se detectó replicación vírica en todas la muestras aisladas de animales inmunizados con cualquiera de los componentes de vacuna solos o 0,5 µg de gD ADN + gD LIP. En estos días, los títulos víricos disminuían a distintos grados dependiendo de la vacuna utilizada, sin embargo no se observaron diferencias estadísticas entre estos grupos. Por el contrario, no se podían recuperar virus de los animales inmunizados con 5 µg de gD ADN + gD LIP que no presentaban signos clínicos de enfermedad (4/5 ratones) en cualquier punto después de la infección.

40 Para ensayar la capacidad de la inmunización heteróloga para inducir una inmunidad protectora de larga duración, los animales inmunizados con la dosis de 0,5 µg de gD ADN + gD LIP se infectaron 10 o 20 semanas después de la inmunización de refuerzo. Los resultados se compararon con animales intactos y con animales inmunizados con gD ADN solo. La Figura 7 muestra los resultados de las infecciones a las 10 y 20 semanas en comparación con las obtenidas en la Figura 5, en la que los animales se infectaron 2 semanas después del refuerzo. Solo uno animal intacto (1/15; 7 %) sobrevivió a la infección entre los 3 momentos que se investigaron. Dos semanas después del refuerzo, el 50 % de los animales inmunizados con gD ADN solo sobrevivieron a la infección. La inmunidad inducida por gD ADN solo parecía disminuir con el tiempo ya que solo el 20 % de los animales sobrevivió a la infección a las 10 y 20 semanas tras el refuerzo. La tasa de mortalidad a las 20 semanas tras la vacunación era significativamente diferente de la tasa de mortalidad que se veía a las 2 semanas después de la vacunación ($p = 0,048$). Por el contrario, la inmunización heteróloga con gD ADN + gD LIP inducían una inmunidad protectora de larga duración. A las 10 y 20 semanas después del refuerzo, el 89 % y el 60 % de los animales sobrevivían a la infección, respectivamente. La comparación de las tasas de mortalidad después de la infección a las 2, 10 y 20 semanas después de la vacunación no revelaba diferencias significativas entre todos los grupos ($p > 0,373$).

En conjunto, los resultados muestran que una vacuna de HSV-2 comprendida por una sensibilización con ADN administrado por vía intramuscular y un refuerzo encapsulado en liposomas suministrado por vía intranasal induce respuestas inmunitarias claramente sinérgicas, que incluyen una inmunidad humoral, de células T y mucosa. La

vacuna es flexible y se puede aumentar la potencia aumentando la dosis de vacuna de ADN. DE hecho, se observó una inmunidad esterilizante en el 80 % de los ratones que recibieron la dosis más alta de la vacuna de ADN en combinación con el componente en liposomas. La protección es duradera ya que > 50 % de los animales aún están protegidos de la enfermedad letal 20 semanas después de la inmunización final (sensibilizados con la dosis subóptima de ADN). DE manera interesante, el protocolo de vacunación heteróloga induce respuestas inmunitarias protectoras en la cavidad vaginal, un sitio mucoso remoto del a localización de la inmunización.

En suma, este régimen de inmunización heterólogo estimulaba altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero, una respuesta de tipo T auxiliares dependiente de la dosis de ADN sensibilizante, un aumento de respuestas inmunitarias mucosas y una inmunidad protectora potente en el portal de entrada del virus: la cavidad vaginal.

Ejemplo 4. Transferencia pasiva de suero y células T CD4⁺ de los ratones inmunizados protegían ratones intactos del desafío con el HSV-2

Los ratones se inmunizaron con el protocolo de inmunización heterólogo descrito en los Ejemplos 1-3. Específicamente, los ratones recibieron una dosis de sensibilización intramuscular de un vector de ADN que codifica el antígeno gD seguido por una dosis de refuerzo intranasal de antígeno gD encapsulado en liposomas. Los bazos se recolectaron de entre estos ratones inmunizados con la vacuna o los ratones donantes intactos. Las células T CD4⁺ se purificaron por clasificación FACS. Debido el número limitado de células T del donante, el ratón intacto receptor recibía 4×10^5 de células T CD4⁺ de los donantes inmunizados o nativos. Veinticuatro horas después de la transferencia de células T, a los ratones receptores se les transfirió pasivamente con suero inmune de ratones vacunados o suero intacto, y entonces se desafiaron con 2×10^4 UFP de HSV-2. La DL50 aproximada de esta reserva de virus HSV-2 en Balb/c tratados con progesterona era de $1,3 \times 10^3$ UFP.

Los ratones que recibieron la transferencia de suero estaban significativamente protegidos de la enfermedad y muerte tras el desafío con HSV-2 en comparación con los receptores que recibían el suero intacto (Figuras 8B y C). Estos resultados sugieren que el suero inmune es el principal contribuyente de la protección observada. Debido al bajo número de células T que se utilizaron, los ratones que recibían células T CD4⁺ junto con suero intacto no mostraban ninguna mejoría en comparación con los ratones que recibían suero intacto solo o suero intacto junto con células T CD4⁺ intactas. De manera interesante, la co-transferencia de células T CD4⁺ y suero inmune proporcionaba mejor protección que la transferencia de células T CD4⁺ o el suero inmune solos. Aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas, se veía una diferencia en las curvas de peso corporal, curvas de valoración clínica, así como los resultados de carga vírica (Figuras 8A, B, y D). Por lo tanto, esto datos sugieren que el suero inmune solo proporciona un papel protector, y una combinación de suero inmune y células T CD4⁺ inmunitarias produce una protección más eficaz contra la infección con HSV-2 de una manera sinérgica.

Ejemplo 5. Comparación de estrategias de refuerzo intramuscular e intranasal después de la sensibilización con gD ADN

Para determinar si la vía de administración de la dosis de refuerzo afectaba la calidad de la respuesta inmunitaria protectora inducida, se sensibilizaron ratones Balb/c con la vacuna gD ADN (i.m.) primero y después se reforzaron con gD LIP (antígeno gD encapsulado en liposomas) sea i.n. o i.m. tres semanas más tarde (Figura 9A). Dos semanas después del refuerzo con gD LIP /un día antes del desafío con HSV-2), el suero y las muestras de lavado vaginal se recolectaron de los ratones para detectar los títulos de IgA específica anti-gD por ELISA. Los ratones que recibieron el refuerzo de liposomas i.m. no mostraban ninguna respuesta de IgA, mientras que los ratones que recibían el refuerzo con gD LIP i.n. tenían una media de $7,8 \pm 1,3$ µg/ml de IgA específica de gD en el suero y $0,23 \pm 0,13$ µg/ml en las muestras de lavado vaginal (datos no mostrados). Después del desafío con HSV-2 a dos dosis diferentes (2×10^4 UFP y 8×10^4 UFP), el peso corporal (Figura 9B) y la valoración clínica (Figura 9C) se registraron diariamente. Las muestras de lavado vaginal se recolectaron y se examinaron por un ensayo de placas para titular los títulos víricos (Figura 9D). Los resultados muestran que el refuerzo gD LIP suministrado inducía una protección más eficaz contra el desafío con HSV-2 dos semanas después del refuerzo que gD LIP administrado i.m., particularmente a la dosis de desafío más alta (Figura 9). Se observaron un aclaramiento vírico más rápido del sitio vaginal y una mayor protección contra la enfermedad inducida por HSV-2 en ratones que recibían el refuerzo con liposomas i.n. en comparación con los ratones reforzados i.m. (Figuras 9C y D).

Para ensayar la hipótesis de que la vacunación mucosa puede proporcionar una protección a largo plazo mejor que la inmunización sistémica, los inventores compararon la eficacia protectora de ratones que recibieron liposomas i.n. o i.m. (17 semanas después de la última inmunización). Los ratones Balb/c se sensibilizaron con la vacuna gD ADN (i.m.) y después se reforzaron con gD LIP (antígeno gD encapsulado en liposomas) sea i.n. o i.m. tres semanas más tarde (Figura 10A). Diecisiete semanas después del refuerzo con gD LIP, todos los animales se desafiaron con 2×10^4 u 8×10^4 UFP de HSV-2. Se registraron el peso corporal (Figura 10B) y la valoración clínica (Figura 10C) diariamente después de la infección. Se recolectaron los lavados vaginales y se examinaron por un ensayo de placas para titular los títulos de virus (Figura 10D). Los resultados muestran que los ratones que recibieron el refuerzo con gD LIP por vía intranasal estaban mejor protegidos que los ratones que recibieron el refuerzo con gD LIP por vía intramuscular.

Ejemplo 6. Una vacuna mucosa para el virus del herpes simple tipo-2 induce anticuerpos neutralizantes en el suero y en mucosas de cobayas

Para examinar adicionalmente la eficacia de un protocolo de inmunización heteróloga para inducir una inmunidad protectora contra HSV-2, se ensayó el protocolo en un modelo de cobaya. A diferencia del modelo de infección con HSV-2 en ratón, que carece del desarrollo de recurrencia del herpes genital, se había utilizado el cobaya para estudiar la eficacia de la protección inmunitaria contra la enfermedad clínica y su latencia y recurrencia posterior después de la infección con HSV-2 (Stanberry (1991) Rev. Infect. Dis., Vol. 13(11); S920-S923).

Primero, los inventores evaluaron la capacidad del vector que codifica el antígeno gD (es decir, la vacuna gD ADN) para expresar el antígeno en las células huésped. Para producir la vacuna gD, se sintetizó la secuencia de ADN que codifica gD *in vitro* para generar una secuencia genética totalmente optimizada para la expresión en células de mamífero (SEQ ID NO: 1). El gen sintetizado se clonó en el vector específico de la vacuna de ADN, pDNAVACC (Nature Technology; Nebraska) bajo el control de un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE) y se secuenció para confirmar la identidad. Se transfectaron las células 293T con el vector vacío o con el vector que contenía la secuencia gD con codones optimizados. La expresión del antígeno gD se evaluó por análisis de transferencia de Western. Como se muestra en la Figura 11, la vacuna gD ADN expresaba altamente la proteína gD de longitud completa. La expresión de la proteína gD del vector vacunal era tan alta que se detectó una pequeña parte del antígeno proteico en el sobrenadante de las células transfectadas con la vacuna gD ADN. La proteína gD de HSV-2 extracelular que comprende los aminoácidos 1-314 de la proteína gD (proteína gD recombinante) se produjo en *Pichia pastoris*, y se encapsuló en liposomas cargados negativamente para el componente de refuerzo de la vacuna. La proteína de HSV-2 gD extracelular (secretada del cultivo celular de levaduras) se confirmó que era menor que la proteína gD de longitud completa.

Para ensayar la capacidad de la vacuna (sensibilización gD ADN + refuerzo con gD LIP) para inducir las respuestas inmunitarias, 10 cobayas Dunkin Hartley hembras se inmunizaron de manera heteróloga sensibilizando con una inyección i.m. con 100 µg de gD ADN (administrado los días 0 y 2; (50 µg por día)) seguido por un refuerzo i.n. con 30 µg de gD LIP (100 µl de dosis total por cobaya en ambas narinas) administrado 3 semanas más tarde (Figura 12). Para evaluar la contribución de cada uno de los componentes vacunales solos y juntos, se inmunizaron grupos de 10 cobayas con gD ADN seguido por liposomas vacíos o vector ADN seguido por gD LIP. Los cobayas intactos servían como control negativo.

Cinco semanas después de la inmunización, se evaluaron las respuestas de anticuerpo. Las mediciones de IgG del suero después de una única vacunación con gD ADN o gD LIP solos era de 2000 µg/ml respectivamente y 480 µg/ml respectivamente (Figura 13A). El nivel de fondo/basal en animales intactos era de 200 µg/ml. Por el contrario, los niveles de suero después de la inmunización con gD ADN + gD LIP alcanzaban más de 25.000 µg/ml, que demostraba una respuesta clara 10 veces sinérgica. La diferencia en los niveles de IgG en el suero después de la inmunización con ADN solo frente a los dos componentes en combinación era altamente significativa (Figura 13E; $p < 0,0001$ para el suero; $n = 10$ por grupo).

La IgG vaginal después de una única vacunación con gD ADN o gD LIP solos era de 4,8 µg/ml y 1,3 µg/ml respectivamente (Figura 13B). El nivel de fondo/basal en animales intactos era 1,1 µg/ml. Por el contrario, los niveles de IgG vaginales después de la inmunización con gD ADN + gD LIP alcanzaba más de 50 µg/ml, también demostraba una respuesta clara 10 veces sinérgica. La diferencia de los niveles de IgG vaginal tras la inmunización con ADN solo frente a ambos componentes en combinación era altamente significativa (Figura 13F; $p < 0,001$ para IVAG, $n = 10$ por grupo). El suero u las respuestas de anticuerpo IgA vaginal seguía un patrón similar en muestras agrupadas (Figuras 13C y D) y en individuos midiendo los títulos ELISA de punto vinal por medias geométricas: la media de IgA después de la inmunización con gD ADN solo era de 310 y 60 para el suero e IVAG respectivamente; la media de IgA después de la inmunización con ambos gD ADN y gD LIP era de 3480 y 484 para el suero e IVAG respectivamente (no mostrado).

Para ensayar si el suero de los cobayas inmunizados presentaba actividad de neutralización contra el virus HSV-2, se recolectaron muestras antes del desafío vírico y se analizó en un ensayo de neutralización basado en placas. Los títulos de anticuerpos neutralizantes de HSV-2 se midieron con un ensayo de neutralización dependiente de complemento. Ese utilizó el complemento de cobaya (Biomed; Foster City, CA) a medio DMEM a una dilución final de 1:125. La mezcla de complemento-medio (que contenía 5-10 % de FBS final) se utilizó como diluyente en la preparación de diluciones víricas y diluciones de muestras. Para las muestras de suero, se combinaron 0,15 ml de diluciones de 2 veces con un volumen igual de dilución vírica (que contenía aproximadamente 10 UFP). Para las muestras de IVAG, una cantidad de 0,2 ml de diluciones de 2 veces se combinaron con 20 µg de dilución de virus (que contenía aproximadamente 100 UFP). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de retirar el medio de cultivo, se añadieron 0,2 ml de cada mezcla de muestra-virus para duplicar cultivos de células Vero cultivados hasta casi la confluencia en placas de 6 pocillos. Estas placas se incubaron con balanceo a 37 °C durante 90 min. Las placas se cubrieron con medio de cubrición (mezcla 1:1 de un 1 % de agarosa y DMEM que contenía un 10 % de FBS inactivado por calor; 1x Pen/Estrep; 1x L-Glutamina y 1x Fungizona). Las placas se incubaron en una incubadora con CO₂ durante dos días, y entonces se tiñeron con medio de tinción (el medio de cubrición que contenía un 1,2 %-1,5 % de rojo neutro al 1 %). Se hizo un recuento en las placas un día después de la tinción, y el

porcentaje de reducción de placas se midió en comparación con el control (virus incubado sin muestra).

Las muestras recolectadas de los cobayas intactos, cobayas inmunizados con gD ADN solo o gD LIP solo no inducía un anticuerpo neutralizante medible (Figura 14A). Sorprendentemente, las muestras recolectadas de los cobayas inmunizados con gD ADN + gD LIP neutralizaba fuertemente el HSV-2 de manera dependiente de la dosis, que resulta en una reducción del 88 %, 98 % y 100 % de reducción en el número de placas a diluciones de 1:200, 1:100 y 1:50 respectivamente, en comparación con el virus solo sin muestra añadida. Con el fin de examinar si la estrategia vacunal con sensibilización i.m. y refuerzo i.n. podía producir una respuesta de neutralización mucosa en las secreciones vaginales, también se utiliza el ensayo de neutralización para comparar la capacidad de los anticuerpos vaginales para neutralizar virus HSV-2 completo. DE nuevo, las muestras recolectadas de los cobayas intactos, cobayas inmunizados con gD ADN solo o gD LIP solo fallaban para inducir anticuerpos neutralizantes medibles (Figura 14B). Por el contrario, las muestras vaginales recolectadas de cobayas inmunizados con gD ADN + gD LIP neutralizaban fuertemente al HSV-2 de una manera dependiente de la dosis, dando como resultado una reducción del 96,5 % en el número de placas vistas cuando se utilizaban muestras agrupadas sin diluir (Figura 14B), la Figura 14C muestra las medias $\pm$ SEM para las muestras vaginales a una dilución de 1:2. La reducción en el número de placas era del 50,8 % (significancia: $p < 0,001$ en relación con el virus solo sin muestra añadida) cuando se utilizaba una dilución 1:2 de muestras individuales. En el conocimiento de los inventores es la primera vez que las secreciones vaginales mucosas de animales inmunizados con cualquier sistema de suministro vacunal sin replicación ha demostrado neutralizar al HSV-2 a niveles detectables.

Ejemplo 7. La inmunización heteróloga que utiliza el antígeno gD protege a los cobayas de una alta dosis de desafío mucoso con HSV-2

Los inventores infectaron cobayas inmunizados con gD ADN solo, gD LIP solo, o gD ADN + gD LIP (véase el Ejemplo 6 para los detalles de la inmunización) para ensayar la capacidad de la inmunización heteróloga para proporcionar protección contra el virus vivo. Dos semanas de pues de la última inmunización, los animales intactos e inmunizados se inocularon por vía intravaginal con 2×10^6 ufp de HSV-2. Los animales se monitorizaron en cuanto al peso corporal y signos clínicos de enfermedad durante 90 días después de la infección. Las lesiones se valoraron de acuerdo con la siguiente escala: 0 = enrojecimiento o lesiones no visibles, 1 = enrojecimiento o hinchazón leve, 2 = erosiones, vesículas, o hinchazón moderado, 3 = vesículas bastantes grandes, 4 = grandes úlceras con maceración grave y/o retención urinaria y/o parálisis de extremidades inferiores. A los animales que alcanzaban una valoración clínica de 4 se les practicaba la eutanasia inmediatamente. Se tomaron frotis vaginales día sí día no durante 7 días después de la infección (p.i). Después del análisis de la carga vírica en el tracto genital por los frotis tomados los 7 días seguidos inmediatamente al desafío vírico se determinó que 4 cobayas (uno de cada grupo) no se habían infectado satisfactoriamente y por lo tanto se excluyeron de análisis adicionales. La Figura 14 A muestra las valoraciones clínicas medias por grupo durante la fase aguda de la enfermedad y un resumen de las valoraciones clínicas se muestran en la Tabla 3. Las curvas de supervivencia se muestran en la Figura 15B.

Tabla 3: Las valoraciones clínicas están disminuidas en cobayas inmunizados por inmunización heteróloga

Inmunización	Número de animales con enfermedad clínica			
	valoración 0	valoración 1-2	valoración >2	muerte
Intacto	0	0	9	5
gD ADN	4	4	1	0
gD LIP	0	0	9	7
gD ADN +gD LIP	8	1	0	0

La gravedad de la enfermedad se valoró utilizando la siguiente escala: (0) sin síntomas, (1) eritema vaginal (enrojecimiento o hinchazón), (2) única o pocas vesículas vaginales pequeñas, (3) lesiones herpéticas bastante grandes o fusionadas, (4) ulceración genital grave y/o parálisis de extremidades posteriores, y (5) encontrado muerto. A los animales que alcanzaban un estado moribundo o presentaban una valoración de (4) se les practico la eutanasia inmediatamente. n = 9 para cada grupo. Los cobayas inmunizados con gD ADN + gD LIP presentaban signos de valoración clínica significativamente reducidos de enfermedad en comparación con los no vacunados y los animales inmunizados con gD ADN o gD LIP solos ($p = 0,01$, ensayo de rango logarítmico).

De los animales intactos infectados 9/9 progresaban a signos severos de enfermedad; 5/9 de los animales estaban moribundos o murieron como resultado de la infección, con una valoración media clínica máxima de 3,5 (Figura 15 y Tabla 3). Las valoraciones medias clínicas entre animales infectados inmunizados con gD ADN o gD LIP solos eran 0,45 y 3,95, respectivamente. Cuatro de los nueve animales inmunizados con gD ADN solo progresaban a una valoración clínica de 1-2, y solo uno era > 2. Ninguno de estos animales estaba moribundos/muertos. Sorprendentemente, 9/9 animales inmunizados con gD LIP solo, se valoraban más de 2, y 7 estaban moribundos/muertos, sugiriendo un posiblemente aumento de patología inmunitaria en cobayas asociada con una respuesta inmunitaria tendente a Th2 que los inventores habían observado previamente en el modelo de ratón. Se alcanzó una excelente protección inmunitaria, basándose en la valoración clínica y los datos de mortalidad, en animales vacunados con el régimen heterólogo gD ADN + gD LIP, en comparación con los no vacunados y animales

inmunizados con gD LIP solo ($p = 0,01$, ensayo de rango logarítmico). Una gran mayoría (8/9) de los animales inmunizados con gD ADN + gD LIP no mostraban signos de enfermedad mientras que solo un animal presentaba una valoración de 0,5-1 brevemente los días 21 y 22 después de la infección (Figura 15A y Tabla 3). Ninguno de los animales que se sometieron a inmunización heteróloga estaban moribundos/muertos (Figura 15B).

Las muestras vaginales se recolectaron de todos los animales el día 1, 3, 5 y 7 después del desafío con HSV-2. Las muestras se titularon en células Vero para la detección del virus. La Figura 16 muestra que el virus se podía detectar en la vagina de todos los grupos con un pico el día 1 después de la infección y disminuyendo a grados variables hasta el día 7. Sin embargo, en comparación con los animales no vacunados, los títulos víricos en los animales vacunados con ambos gD ADN + gD LIP el día 3 y el día 7 era de 2,37 y 0,94 log menores ($P = < 0,01$). De hecho, no se detectaron virus el día 7 para los cobayas vacunados de manera heteróloga (nivel de detección = 1,7 log UFP/ml) indicando un aclaramiento temprano del virus del tracto genital. En paralelo con la valoración clínica y los datos de la curva de supervivencia, los títulos vaginas de los animales los días 3 y 7 vacunados con gD ADN solo, eran también 1,2 log menores que los cobayas no vacunados en ambos días ($P = 0,001$). NO se observó ninguna diferencia significativa entre animales vacunados con gD LIP y animales no vacunados.

Ejemplo 8. La vacunación heteróloga protege los cobayas de la infección latente y reactivación de HSV-2 durante la fase recurrente de la enfermedad

Para ensayar si los animales presentaban signos de síntomas de enfermedad recurrente después de la enfermedad aguda (aproximadamente 15 días después de la infección), los cobayas se mantuvieron durante 90 días después de la infección y se controlaron diariamente. La Figura 17 muestra la recurrencia acumulada por cobaya para cada grupo ajustado por los días que los animales presentaban recurrencias. Los animales que se habían vacunado con gD ADN o gD LIP solos, no mostraban una reducción significativa de eventos de reactivación de HSV-2 en comparación con animales no vacunados. Sorprendentemente sin embargo, los animales vacunados con gD ADN + gD LIP no presentaban síntomas de eventos recurrentes excepto un animal que se valoró como 0,5-1 los días 21 y 22 después de la infección, en paralelo con la fase aguda en la que tampoco se notaron signos de enfermedad. Los resultados demuestran la robusta naturaleza de la vacuna para prevenir la infección aguda inicial y cualquier reactivación o recurrencia posterior.

Al final del estudio el día 90 después de la infección se sacrificaron los animales y se recolectaron los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de la región lumbosacra de la médula espinal de los animales supervivientes para ensayar la presencia de genomas víricos de HSV-2 latente. El ADN genómico se extrajo y se midió el ADN vírico por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando los cebadores específicos de la glicoproteína G (gG) de HSV-2. La Figura 18 muestra que para los cobayas intactos, el número medio de copias de genomas víricos por 100 ng de ADN total era 139 y los animales vacunados con gD LIP solo, tenían una media de 154,5 copias. De manera interesante, la cantidad de ADN vírico latente en los animales vacunados con gD ADN solo, era significativamente menor (27,56 copias; $p < 0,01$). De manera notable, solamente un animal vacunado con gD ADN + gD LIP presentaba ADN latente (7 copias/100 ng) por encima del límite de detección de 5 copias/100 ng. En conjunto con la inhibición de la enfermedad aguda y recurrente conseguida por la vacuna mucosa, estos resultados sugieren que el virus HSV-2 es incapaz de diseminarse de la mucosa genital a los núcleos nerviosos sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal en cobayas vacunados con el protocolo de inmunización heteróloga.

Para evaluar la longevidad de la respuesta inmunitaria protectora inducida por el protocolo de inmunización heteróloga, se inmunizaron cobayas Dunkin Hartley hembras utilizando el protocolo de inmunización heteróloga descrita anteriormente y se desafiaron con virus HSV-2 vivo 15 semanas después del refuerzo con liposomas. Específicamente, los animales se inmunizaron de manera heteróloga por sensibilización con una inyección i.m. con 100 µg de gD ADN los días 0 y 2 seguido por un refuerzo i.n. con 6 o 30 µg de gD LIP (domino gD extracelular encapsulado en liposomas aniónicos) administrado 3 semanas más tarde. Quince semanas después del refuerzo con gD LIP, todos los animales se desafiaron con 2×10^6 UFP de HSV-2. Los animales inmunizados e infectados satisfactoriamente se observaron clínicamente durante 35 días después de la infección. Se compararon dos lotes de liposomas diferentes (el antiguo y el nuevo) de vacunas gD LIP (30 µg/100 µl), dos volúmenes diferentes (100 µl vs. 300 µl) de inoculación intranasal y dos dosis diferentes de vacuna gD LIP (6 vs. 30 µg/100 µl) en la protección que aparece a largo plazo. Los porcentajes de supervivencia de cada grupo de cobayas se muestran en la Figura 19. Los animales reforzados con gD LIP antigua o gD LIP nueva estaban muy bien protegidos frente a un desafío de una dosis alta de HSV-2. No había diferencia de supervivencia entre los grupos reforzados i.n. con gD LIP de 30 µg en 100 µl o 6 µg en 100 µl. Después, los 30 µg en 100 µl se diluyeron por 200 µl de agua para que sean 30 µg en 300 µl y se suministraron i.n., se observó una supervivencia peor y más temprana. La fórmula de HSV-2 mucosa óptima para los cobayas se determinó que era una inyección i.m. con 100 µg de gD ADN los días 0 y 2 seguida por un refuerzo i.n. con 6 a 30 µg de gD LIP administrado 3 semanas más tarde.

En resumen, los resultados de estos estudios demuestran la eficacia del protocolo de inmunización heteróloga para inducir una inmunidad protectora contra el HSV-2. Este régimen de inmunización heteróloga cumple muchos criterios de una vacuna contra HSV-2 potente: la vacuna estimula altos títulos de anticuerpos séricos y vaginales con altas actividades neutralizantes; reduce significativamente la carga vaginal y estimula el aclaramiento vírico durante la fase aguda; protege completamente a los animales del desarrollo de signos clínicos de la enfermedad hasta 90 días

después del desafío con HSV-2; y más sorprendentemente, previene el establecimiento de latencia del HSV-2 en los ganglios de la raíz dorsal. La estrategia de sensibilización con ADN y el refuerzo con liposomas es eficaz así como segura para dar lugar a respuestas inmunitarias y protección contra el HSV-2.

5 Ejemplo 9. Eficacia terapéutica de una vacuna mucosa del virus del herpes simple en cobayas

En este ejemplo, los inventores ensayaron si una vacuna que comprendía una vacuna de ADN administrada por vía intramuscular y un antígeno proteico encapsulado en liposomas administrado por vía intranasal, tiene una eficacia terapéutica en contener la recurrencia de herpes genital en cobayas previamente infectados con HSV-2. El modelo de cobaya es uno de los modelos animales más utilizados para el estudio del herpes genital (Stanberry et al. (1985) Intervirology, Vol. 24(4): 226-231; Stanberry et al. (1982) J Infect Dis, Vol. 146(3): 397-404). Al igual que con los seres humanos, el modelo de cobaya se caracteriza por una infección aguda inicial con graves lesiones genitales seguido por eventos recurrentes espontáneos, y se ha utilizado ampliamente para vacunas tanto profilácticas como terapéuticas.

Para establecer los cobayas infectados con HSV-2 que presentan parámetros de enfermedad clínica para controlar el efecto de una vacuna terapéutica, los inventores inocularon inicialmente los animales con 4×10^4 a 1×10^6 ufp del HSV-2 (cepa MS) por vía intravaginal. Se infectaron tres grupos de animales ($n = 16/\text{grupo}$) con tres dosis víricas diferentes: 4×10^4 , 2×10^5 y 1×10^6 ufp. Se controlaron los signos clínicos de enfermedad y morbilidad diariamente después de la infección. Se analizaron frotis vaginales recolectados el día 2 y el día 4 después de la infección por un ensayo de placas para confirmar si se había producido la infección vírica y la replicación satisfactoriamente en la cavidad vaginal. Se determinó que 5 de los 48 cobayas no presentaban signos de infección vírica, indicando que la tasa satisfactoria de infección era del 89,6 %. De los animales restantes, un total de 13 animales se encontraron muertos o moribundos debido a una infección por HSV-2 virulento. Los 30 cobayas restantes infectados satisfactoriamente presentaban signos clínicos de enfermedad que variaban de una valoración clínica de 2-3 durante la fase aguda, y se dividieron en dos grupos ($n = 15/\text{grupo}$) el día 28 después de la infección.

Para ensayar la capacidad de la vacuna (vacuna gD ADN de sensibilización + refuerzo gD LIP) en cuanto al efecto terapéutico, se inmunizaron los cobayas con las vacunas y vehículos de control como se indica en el esquema de la Figura 20A. Para la dosis de sensibilización, se administró la vacuna gD ADN que codificaba un gen de la glicoproteína gD de longitud completa con codón optimizado, bajo el control de un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (grupo 1) o un vector plásmido (grupo 2) por vía intramuscular los días 28 y 30 (total 100 µg de ADN por cobaya; 50 µg por día). Para la dosis de refuerzo, se administraron liposomas cargados negativamente que encapsulaban el dominio extracelular de la glicoproteína gD (gD-liposomas) (grupo 1) o liposomas vacíos (grupo 2) 2 semanas después de la sensibilización con ADN (100 µl de dosis total por cobaya, 50 µl por narina) como se ilustra en la Figura 20A.

Se recolectaron muestras de suero de los grupos vacunados y no vacunados de cobayas el día 21, tres semanas después de la infección (7 días antes de la sensibilización con ADN) y el día 57 (15 días después del refuerzo con liposomas). La IgG del suero de las muestras agrupadas de los grupos de vacuna y vector antes de la vacunación era de $1,7 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^4$ µg/ml, respectivamente. Después de la vacunación, la IgG del suero en el grupo de vector/vehículo no aumentaba significativamente ($1,9 \times 10^4$ µg/ml). Sin embargo, los niveles de suero habían aumentado más de 10 veces en los animales vacunados hasta $2,1 \times 10^5$ µg/ml (Figura 20B). Cuando las muestras individuales obtenidas el día 57 se analizaron después de la acuñación (Figura 20C), el nivel de IgG anti-gD de HSV-2 en el grupo de la vacuna era significativamente mayor que en el grupo de control (aproximadamente 10 veces, $P < 0,001$). Tanto las muestras de suero como las muestras de frotis vaginales recolectados el día 47 se ensayaron en un ensayo de neutralización vírica como se describe en el Ejemplo 6. El tratamiento con la vacuna inducía mayor respuesta de anticuerpos de neutralización sérica (Figura 21A) y vaginal (Figura 21B) en los cobayas expuestos a la infección por HSV-2. Los resultados muestran que la administración de la vacuna de gD ADN y liposomas en animales infectados con HSV-2 era muy satisfactoria en romper la barrera de inmunidad anti- HSV-2 pre-existente, que incluye anticuerpos específicos anti-gD.

Después de la infección primaria, el HSV-2 monta una infección latente en los ganglios del nervio sacro y se produce periódicamente la reactivación del virus periódicamente durante la vida de un individuo y puede resultar en una enfermedad recurrente o diseminación inaparente que se produce incluso en presencia de respuestas inmunitarias a la infección vírica inicial (Whitley y Roizman (2001) Lancet, Vol. 357(9267): 1513-1518). Una vacuna terapéutica satisfactoria tendría que prevenir o reducir marcadamente recurrencias periódicas. Tras la inmunización de los cobayas, los animales se observaron durante 60 días en cuanto a evidencias de lesiones herpéticas recurrentes espontáneas. Los episodios recurrentes se enumeraron como recurrencias acumuladas (aparición de lesiones) por cobaya por cada grupo, se observaron las recurrencias ajustadas por el número de días (Figura 22). Los datos indican que la administración de la vacuna a los cobayas pre-infectados reducía marcadamente el número de recurrencias de enfermedad clínica por HSV-2. La Tabla de la Figura 22 muestra que después de la vacunación, la diferencia entre los grupos de la vacuna y el control es altamente significativa ($P < 0,0001$). La diferencia en las tasas de recurrencia entre los dos grupos de tratamiento de animales se puede deber a las respuestas inmunitarias sinérgicas, especialmente la inmunidad mucosa, inducida por el régimen de inmunización heterólogo de sensibilización y refuerzo. Los anticuerpos de neutralización estaban aumentados en las muestras de suero y

especialmente en muestras vaginales después de la inmunización con la vacuna mucosa de HSV-2 (Figura 21), sugiriendo el posible papel de la inmunidad mucosa provocada por esta vacuna sobre la eficacia terapéutica..

Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se recolectaron los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de la región lumbosacra de la médula espinal para ensayar la presencia de genomas víricos de HSV-2 latente. El ADN genómico se extrajo y el ADN vírico se midió por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando cebadores específicos de glicoproteína G (gG) de HSV-2. El ADN genómico de cobaya se midió por qPCR utilizando cebadores específicos de lactoalbúmina de cobaya. Los niveles de virus HSV-2 latente se expresaron como número de copias de HSV-2 por 100 ng de ADN genómico de cobaya. Para el grupo de control (vector de ADN + liposomas vacíos), el número medio de copias de genomas víricos por 100 ng de ADN genómico era de 247.5 ± 98.2 ($n = 14$). Para el grupo de vacuna (gD ADN + gD liposomas) el número medio de copias de HSV-2 era 106.9 ± 27.5 ($n = 14$). No había una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($p = 0.18$). No es inesperado que la vacuna administrada terapéuticamente no afectara el número de copias víricas latentes en los DRG, ya que es como el HSV-2 se evade de las defensas del huésped. Sin embargo, tomados en conjunto con la cantidad reducida de recurrencia que se observaba después del tratamiento con las vacunas, los resultados de estos experimentos sugieren que el tratamiento con la vacuna es clínicamente terapéutico sin eliminar la latencia vírica.

El principal obstáculo de las vacunas contra el HSV es el establecimiento de latencia en los núcleos de los ganglios de la raíz dorsal que protege el virus de las respuestas inmunitarias. Las respuestas inmunitarias estimuladas por una vacuna terapéutica probablemente solo alcanzan el virus después de la reactivación durante la migración desde los ganglios sensoriales o en las terminales nerviosas periféricas y la mucosa genital. Como una vacuna mucosa, la estrategia heteróloga de los inventores de gD ADN de sensibilización y gD liposomas de refuerzo había demostrado que genera respuestas inmunitarias y protección mucho más fuertes que la vacuna ADN sola tanto en modelos de ratón y cobaya desafiados con HSV-2 (véase los Ejemplos 3 y 7). Las respuestas inmunitarias sinérgicas, especialmente las de los sitios mucosos, funcionan para contener la liberación y diseminación vírica, controlando de esta manera la recurrencia de enfermedades clínicas relacionadas con la reactivación del HSV-2.

Referencias

1. Handsfield HH, Stone KM, Wasserheit JN. Prevention agenda for genital herpes. *Sex Transm Dis* 1999; 26(4):228-31.
2. Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J, Critchlow C, Corey L. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med* 1987; 316(23):1444-9.
3. Mertz GJ, Benedetti J, Ashley R, Selke SA, Corey L. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann Intern Med* 1992; 116(3):197-202.
4. Wald A, Corey L, Cone R, Hobson A, Davis G, Zeh J. Frequent genital herpes simplex virus 2 shedding in immunocompetent women. Effect of acyclovir treatment. *J Clin Invest* 1997; 99(5):1092-7.
5. Straus S, Corey L. Herpes simplex viruses. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, y Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia [etc.]: Churchill Livingstone; 2000. p. 1556-80.
6. Kimberlin DW. Antiviral therapy for cytomegalovirus infections in pediatric patients. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13(1):22-30.
7. Stamm WE, Handsfield HH, Rompalo AM, Ashley RL, Roberts PL, Corey L. The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men. *JAMA* 1988; 260(10):1429-33.
8. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein-d-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 2002; 347(21):1652-61.
9. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3):541-53, quiz 554-545.
10. Ashley RL, Dalessio J, Burchett S, Brown Z, Berry S, Mohan K, et al. Herpes simplex virus-2 (HSV-2) type-specific antibody correlates of protection in infants exposed to HSV-2 at birth. *J Clin Invest* 1992; 90(2):511-4.
11. Dudley KL, Bourne N, Milligan GN. Immune protection against HSV-2 in B-cell-deficient mice. *Virology* 2000; 270(2):454-63.
12. Mester JC, Milligan GN, Bernstein DI. The immunobiology of herpes simplex virus. In: Stanberry LR, editor. *Genital and neonatal herpes*. New York: John Wiley y Sons, Ltd.; 1996. p. 49-91.

13. Milligan GN, Bernstein DI. Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2. *Virology* 1995; 212(2):481-9.
- 5 14. Speck P, Simmons A. Precipitous clearance of herpes simplex virus antigens from the peripheral nervous systems of experimentally infected C57BL/10 mice. *J Gen Virol* 1998; 79(Pt 3):561-4.
- 10 15. Koelle DM, Posavad CM, Barnum GR, Johnson ML, Frank JM, Corey L. Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 1998; 101(7):1500-8.
16. Posavad CM, Koelle DM, Shaughnessy MF, Corey L. Severe genital herpes infections in HIV-infected individuals with impaired herpes simplex virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(19):10289-94.
- 15 17. Posavad CM, Koelle DM, Corey L. Tipping the scales of herpes simplex virus reactivation: the important responses are local. *Nat Med* 1998; 4(4):381-2.
- 20 18. Parr MB, Parr EL. Mucosal immunity in the female and male reproductive tracts. In: Ogra PL, LammME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1994. p. 677-89.
19. Parr MB, Parr EL. Mucosal immunity to herpes simplex virus type 2 infection in the mouse vagina is impaired by *in vivo* depletion of T lymphocytes. *J Virol* 1998; 72(4):2677-85.
- 25 20. Milligan GN, Bernstein DI, Bourne N. 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* 1998; 160(12):6093-100.
- 30 21. Kuklin NA, Daheshia M, Chun S, Rouse BT. Role of mucosal immunity in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 1998; 160(12):5998-6003.
22. Gallichan WS, Rosenthal KL. Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization. *J Infect Dis* 1998; 177(5):1155-61.
- 35 23. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(2):148-58.
24. Seder RA, Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 2000; 406(6797):793-8.
- 40 25. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, et al. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med* 1999; 5(5):526-34.
- 45 26. Yang K, Whalen BJ, Tirabassi RS, Selin LK, Levchenko TS, Torchilin VP, et al. A DNA vaccine prime followed by a liposome-encapsulated protein boost confers enhanced mucosal immune responses and protection. *J Immunol* 2008; 180(9):6159-67.
27. O'Hagan DT. Recent developments in vaccine delivery systems. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001; 1(3):273-86.
- 50 28. Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995; 145:5-31.
29. Bourne N, Milligan GN, Schleiss MR, Bernstein DI, Stanberry LR. DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. *Vaccine* 1996; 14(13):1230-4.
- 55 30. Bernstein DI, Tepe ER, Mester JC, Arnold RL, Stanberry LR, Higgins T. Effects of DNA immunization formulated with bupivacaine in murine and guinea pig models of genital herpes simplex virus infection. *Vaccine* 1999; 17(15-16):1964-9.
- 60 31. Cattamanchi A, Posavad CM, Wald A, Baine Y, Moses J, Higgins TJ, et al. Phase I study of a herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA vaccine administered to healthy, HSV-2 seronegative adults by a needle-free injection system. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(11):1638-43.
- 65 32. Posavad CM, Remington M, Mueller DE, Zhao L, Magaret AS, Wald A, et al. Detailed characterization of T cell responses to herpes simplex virus-2 in immune seronegative persons. *J Immunol* 2010; 184(6):3250-9.

33. Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* 1996; 70(9):6119-25.

34. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997; 158(5):2278-84.

35. Parr MB, Parr EL. The role of gamma interferon in immune resistance to vaginal infection by herpes simplex virus type 2 in mice. *Virology* 1999; 258(2): 282-94.

36. Milligan GN, Bernstein DI. Interferon-gamma enhances resolution of herpes simplex virus type 2 infection of the murine genital tract. *Virology* 1997; 229(1):259-68.

37. Baral RN, Saha A, Chatterjee SK, Foon KA, Krieg AM, Weiner GJ, et al. Immunostimulatory CpG oligonucleotides enhance the immune response of anti-idiotypic vaccine that mimics carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52(5):317-27.

38. Sandler AD, Chihara H, Kobayashi G, Zhu X, Miller MA, Scott DL, et al. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; 63(2):394-9.

39. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008; 9(10):776-88.

40. Lu S. Immunogenicity of DNA vaccines in humans: it takes two to tango. *Hum Vaccin* 2008; 4(6):449-52.

41. Domingo C, Gadea I, Pardeiro M, Castilla C, Fernandez S, Fernandez-Clua MA, et al. Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine* 2003; 21(25-26):3565-74.

42. Bridges PA, Taylor KM. The effects of freeze-drying on the stability of liposomes to jet nebulization. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(3):393-8.

43. Bridges PA, Taylor KM. An investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes. *Int J Pharm* 2000; 204(1---2):69-79.

44. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 2002; 20(Suppl. 3):S56-64.

45. Moynihan JS, Jones DH, Farrar GH, Howard CR. A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B. *Vaccine* 2001; 19(23-24):3292-300.

46. Natuk RJ, Cooper D, Guo M, Calderon P, Wright KJ, Nasar F, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 gD elicit robust CD4+ Th1 immune responses and are protective in mouse and guinea pig models of vaginal challenge. *J Virol* 2006; 80(9):4447-57.

Secuencias

Secuencia de nucleótidos de gD de HSV-2 con codón optimizado humano (SEQ ID NO: 1)

ATGGGACGGCTGACCAGCGGAGTGGGCACAGCCGCCCTGCTGGTTCGTGGCTGTGGGCCTGCGCG
TGGTGTGCGCCAAGTACGCCCTGGCCGACCCAGCCTGAAGATGGCCGACCCCAACCGGTTCCG
CGGCAAGAACCTGCCCCGTGCTGGACCAGCTGACCGACCCTCCCGGCGTGAAGCGCGTGTACCAC
ATCCAGCCCAGCCTGGAGGACCCCTTCCAGCCCCCAGCATCCCCATCACCGTGTACTACGCCG
TGCTGGAGCGCGCCTGCCGGAGCGTGCTGCTGCACGCCCCCAGCGAGGCCCCCAGATTGTGCG
CGGAGCCAGCGACGAGGCCCCGGAAGCACACCTACAACCTGACCATCGCCTGGTATCGGATGGGC
GACAACTGCGCCATCCCTATTACCGTGATGGAGTACACCGAGTGCCCCCTACAACAAGAGCCTGG
GAGTGTGCCCCATCCGGACCCAGCCCCGGTGGAGCTACTACGACAGCTTCAGCGCTGTGAGCGA
GGACAACCTGGGCTTCCTGATGCACGCCCCCTGCCTTCGAGACCGCCGGCACCTACCTGCGGCTG
GTGAAGATCAACGACTGGACCGAGATCACCCAGTTCATCCTGGAGACCGCGCCAGAGCCAGCT
GCAAATACGCCCTGCCCTGCGGATCCCCCCTGCCGCTGCCTGACCAGCAAGGCCTATCAGCA
GGGCGTGACCGTGGACAGCATCGGCATGCTGCCCCGGTTCATCCCCGAGAACCAGCGGACCGTG
GCCCTGTACTCTCTGAAGATCGCCGGCTGGCACGGCCCCAAGCCCCCCTACACCAGCACCCCTGC
TGCCCCCCGAGCTGAGCGACACCACCAACGCCACCCAGCCGAGCTGGTGGCCGAGGACCCCGA
GGATAGCGCCCTGCTGGAGGATCCCGCCGGAACAGTGAGCAGCCAGATCCCCCCCCAAGTGGCAC
ATCCCTAGCATCCAGGACGTGGCCCCCACCACGCCCCAGCCGCCCTAGCAACCCCGGCCTGA
TCATCGGCGCCCTGGCCGGCAGCACCCCTGGCCGCCCTGGTGTATCGGCGGCATCGCCTTTTGGGT
GCGCAGACGCGCCCAGATGGCCCCCAAGCGGCTGCGGCTGCCCCACATCCGCGACGACGACGCC
CCTCCATCTCACCAGCCCCCTGTTCTAG

Secuencia de aminoácidos de gD truncada- aminoácidos 1-314 (SEQ ID NO: 2)

M G R L T S G V G T A A L L V V A V G L R V V C A K Y A L A D P
S L K M A D P N R F R G K N L P V L D Q L T D P P G V K R V Y H
I Q P S L E D P F Q P P S I P I T V Y Y A V L E R A C R S V L L
H A P S E A P Q I V R G A S D E A R K H T Y N L T I A W Y R M G
D N C A I P I T V M E Y T E C P Y N K S L G V C P I R T Q P R W
S Y Y D S F S A V S E D N L G F L M H A P A F E T A G T Y L R L
V K I N D W T E I T Q F I L E H R A R A S C K Y A L P L R I P P
A A C L T S K A Y Q Q G V T V D S I G M L P R F I P E N Q R T V
A L Y S L K I A G W H G P K P P Y T S T L L P P E L S D T T N A
T Q P E L V P E D P E D S A L L E D P A G T V S S Q

5

Secuencia de aminoácidos de gD de longitud completa (SEQ ID NO: 3)

M G R L T S G V G T A A L L V V A V G L R V V C A K Y A L A D P
S L K M A D P N R F R G K N L P V L D Q L T D P P G V K R V Y H
I Q P S L E D P F Q P P S I P I T V Y Y A V L E R A C R S V L L
H A P S E A P Q I V R G A S D E A R K H T Y N L T I A W Y R M G
D N C A I P I T V M E Y T E C P Y N K S L G V C P I R T Q P R W
S Y Y D S F S A V S E D N L G F L M H A P A F E T A G T Y L R L
V K I N D W T E I T Q F I L E H R A R A S C K Y A L P L R I P P
A A C L T S K A Y Q Q G V T V D S I G M L P R F I P E N Q R T V
A L Y S L K I A G W H G P K P P Y T S T L L P P E L S D T T N A
T Q P E L V P E D P E D S A L L E D P A G T V S S Q I P P N W H
I P S I Q D V A P H H A P A A P S N P G L I I G A L A G S T L A
A L V I G G I A F W V R R R A Q M A P K R L R L P H I R D D D A
P P S H Q P L F

Secuencia de aminoácidos de la Variante nº 1 de gD de longitud completa (SEQ ID NO: 4)

MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPPGVKRVYH
IQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMG
DNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRL
VKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTV
ALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
IPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDA
PPSHQPLFY

Secuencia de aminoácidos de la Variante nº 2 de gD de longitud completa (SEQ ID NO: 5)

5

MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDRLTDPPGVKRVYH
IQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMG
DNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRL
VKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTV
ALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
IPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDA
PPSHQPLFY

Secuencia de aminoácidos de la Variante nº 3 de gD de longitud completa (SEQ ID NO: 6)

MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPPGVKRVYH
IQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMG
DNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLIHAPAFETAGTYLRL
VKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTV
ALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
IPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDA
PPSHQPLFY

10

Secuencia de aminoácidos de la Variante nº 4 de gD de longitud completa (SEQ ID NO: 7)

MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPPGVKRVYH
IQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMG
DNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRL
VKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTV
ALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
IPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDA
PPSHQPLFY

15

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de sensibilización y una preparación de refuerzo para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el HSV-2 en un mamífero, comprendiendo el método la administración de la preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo al mamífero:
 - (a) en donde la preparación de sensibilización comprende un vector que codifica un antígeno de HSV-2 bajo el control de un promotor, en donde el antígeno es una glicoproteína gD de HSV-2 de longitud completa y en donde la secuencia que codifica la glicoproteína gD tiene codones optimizados para la expresión en células de mamífero; y
 - (b) en donde la preparación de refuerzo comprende un domino extracelular de la glicoproteína gD encapsulado en liposomas,
- en donde en el método, la preparación de sensibilización se administra por vía intramuscular y la preparación de refuerzo se administra por vía mucosa, provocando de esta manera la respuesta inmunitaria protectora en el mamífero.
2. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de glicoproteína gD tiene codones optimizados para la expresión en células humanas.
3. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector codifica una secuencia de glicoproteína gD de longitud completa que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.
4. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el domino extracelular de la glicoproteína gD comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2.
5. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los liposomas son liposomas aniónicos.
6. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la preparación de refuerzo se administra por vía intranasal.
7. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más síntomas de la infección por HSV-2 han mejorado en el mamífero después de la administración de la preparación de refuerzo.
8. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde uno o más síntomas de la infección por HSV-2 es la propagación del virus.
9. La preparación de sensibilización y la preparación de refuerzo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la carga vírica vaginal en el mamífero está reducida.

FIGURA 1

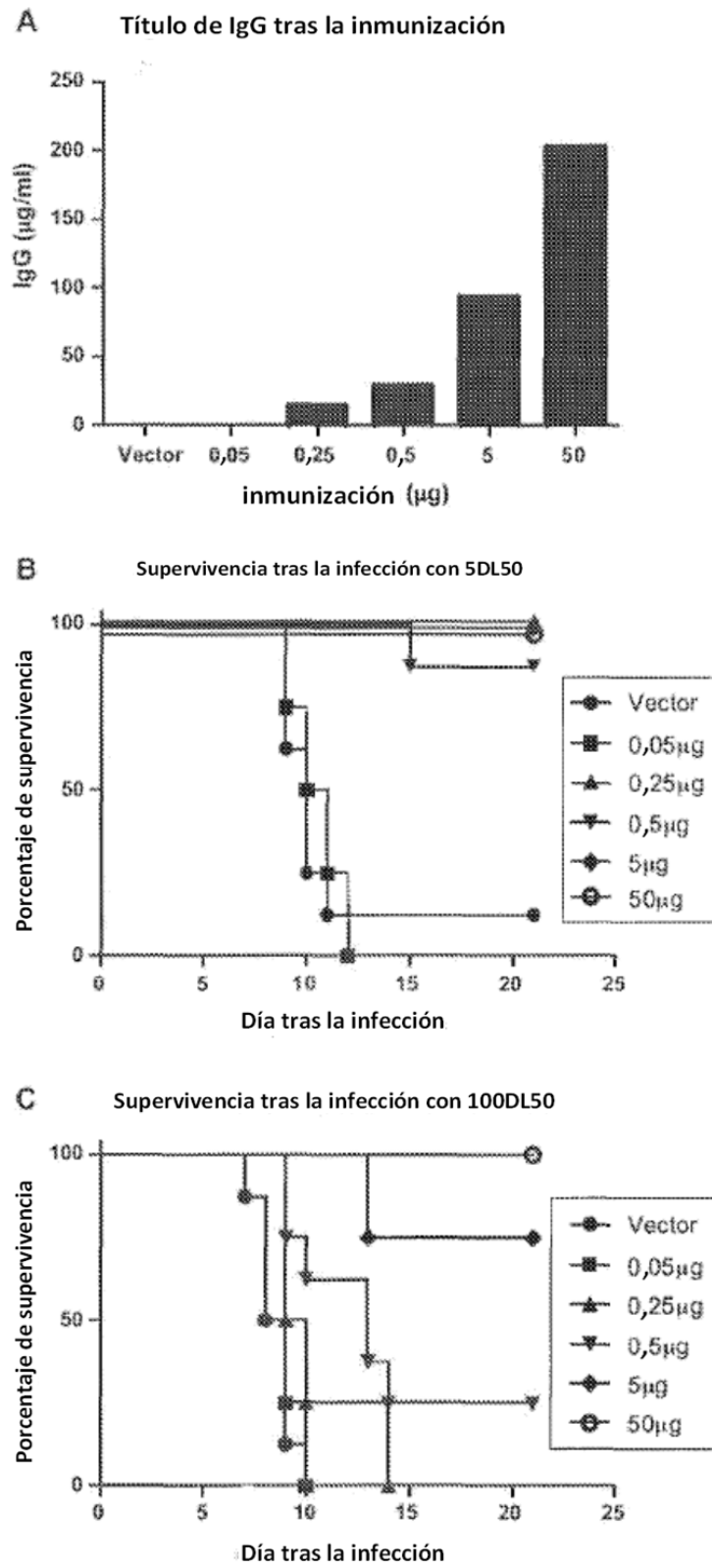


FIGURA 2

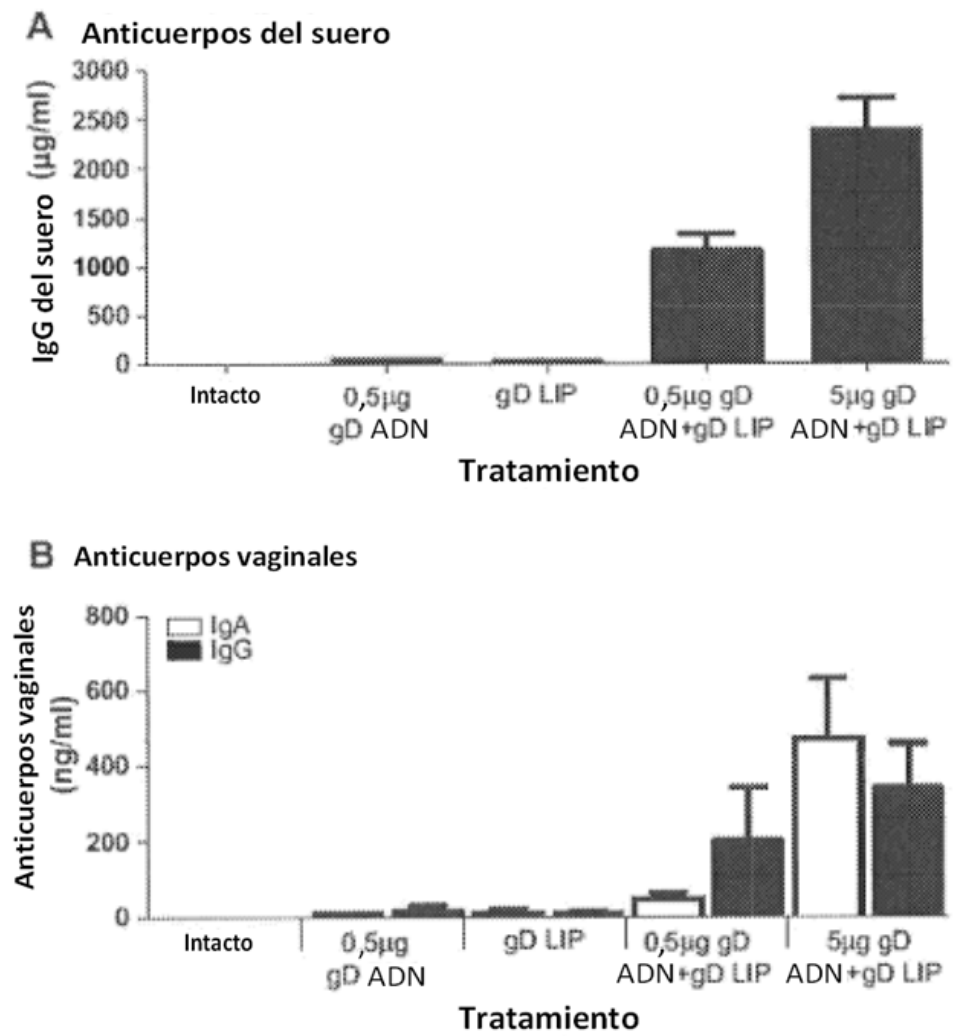


FIGURA 3

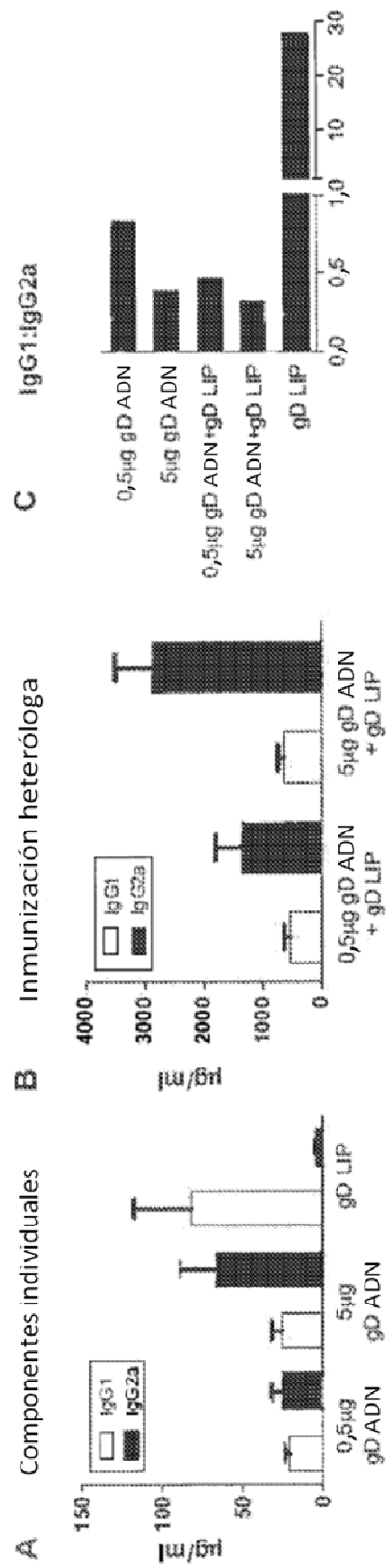


FIGURA 4

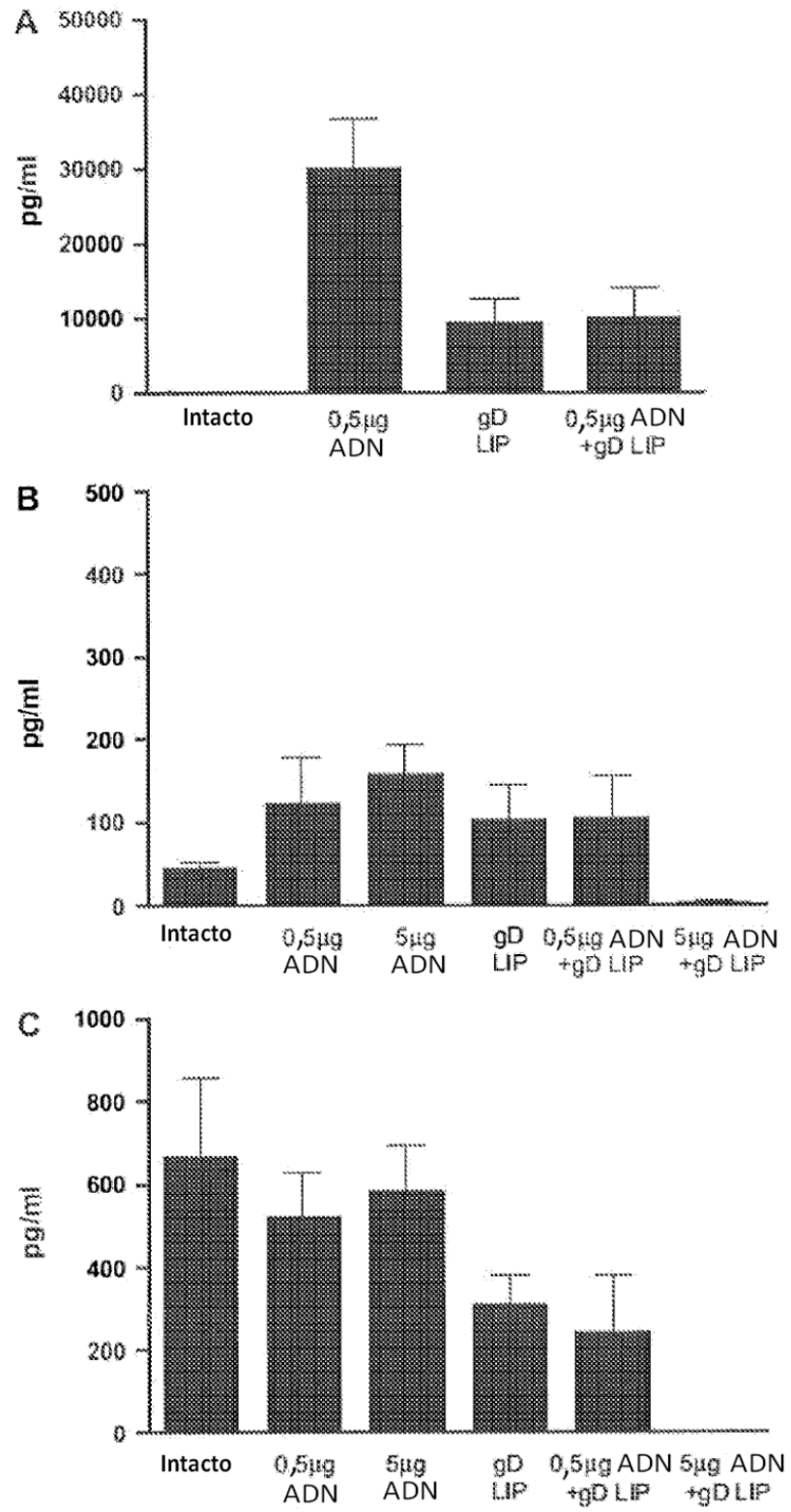


FIGURA 5

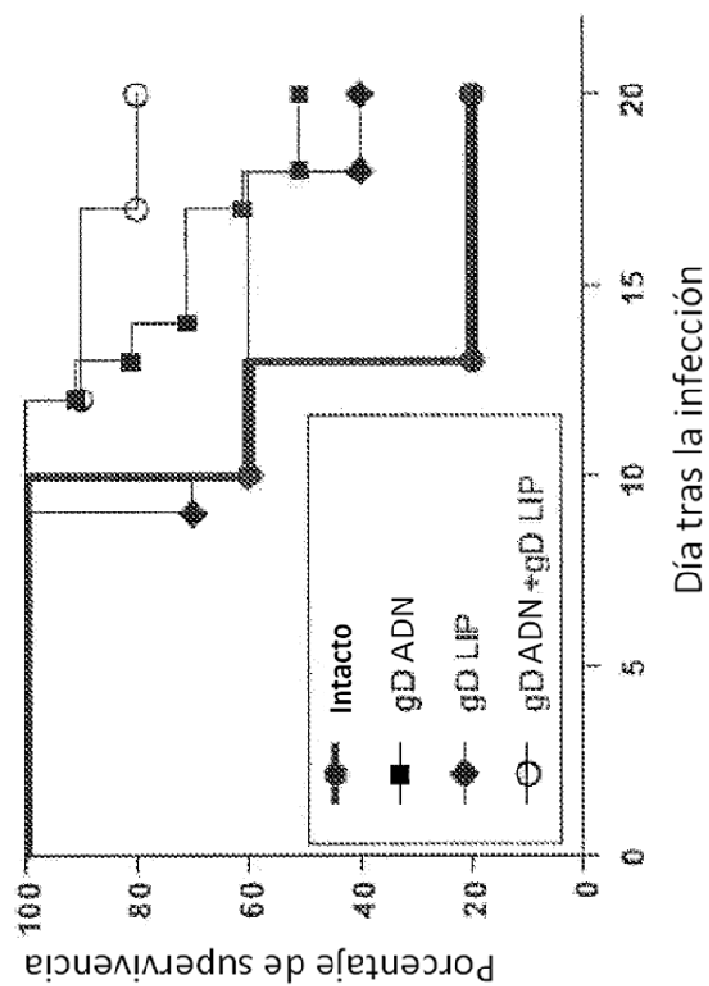


FIGURA 6

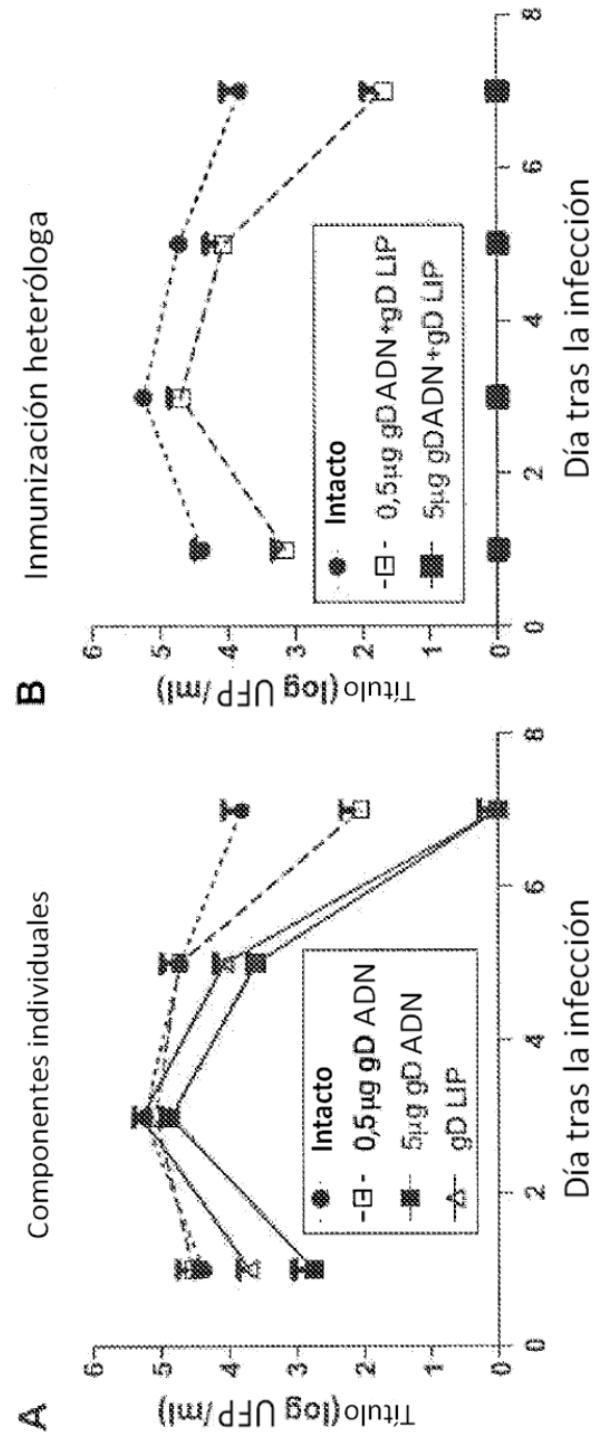


FIGURA 7

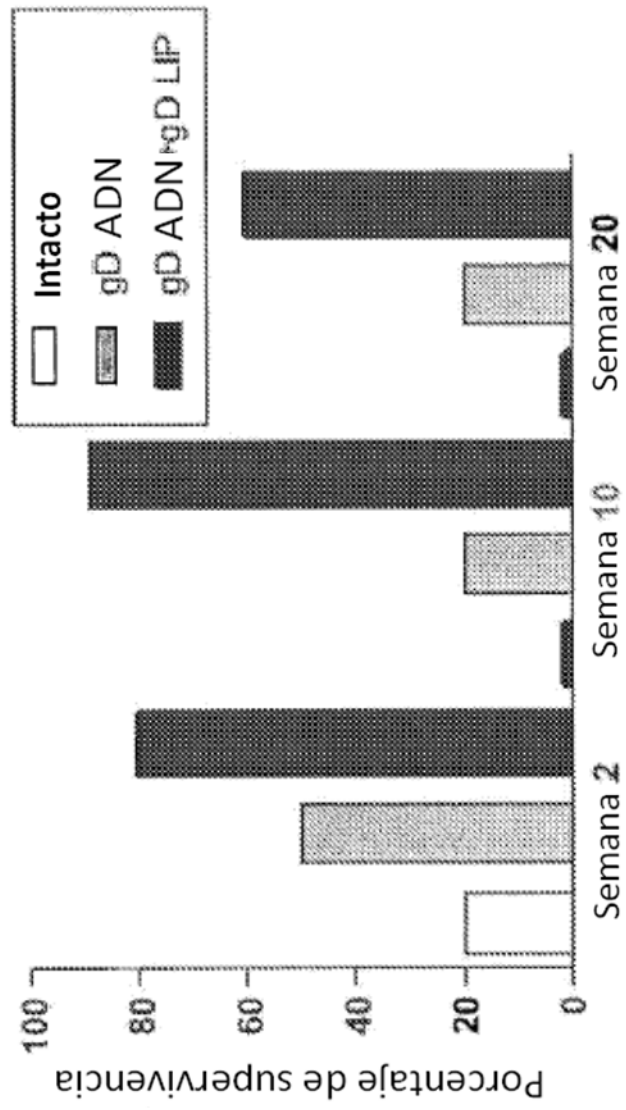


FIGURA 8A-C

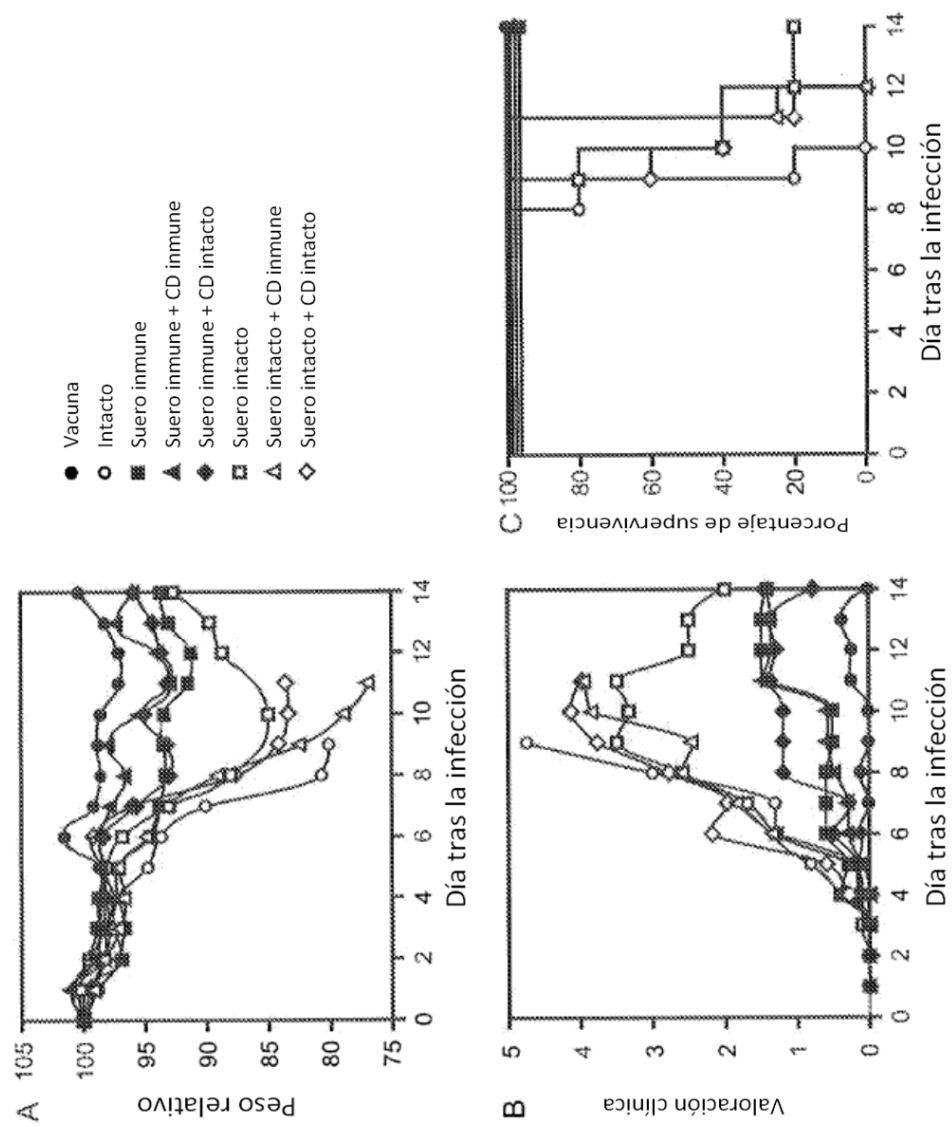


FIGURA 8D

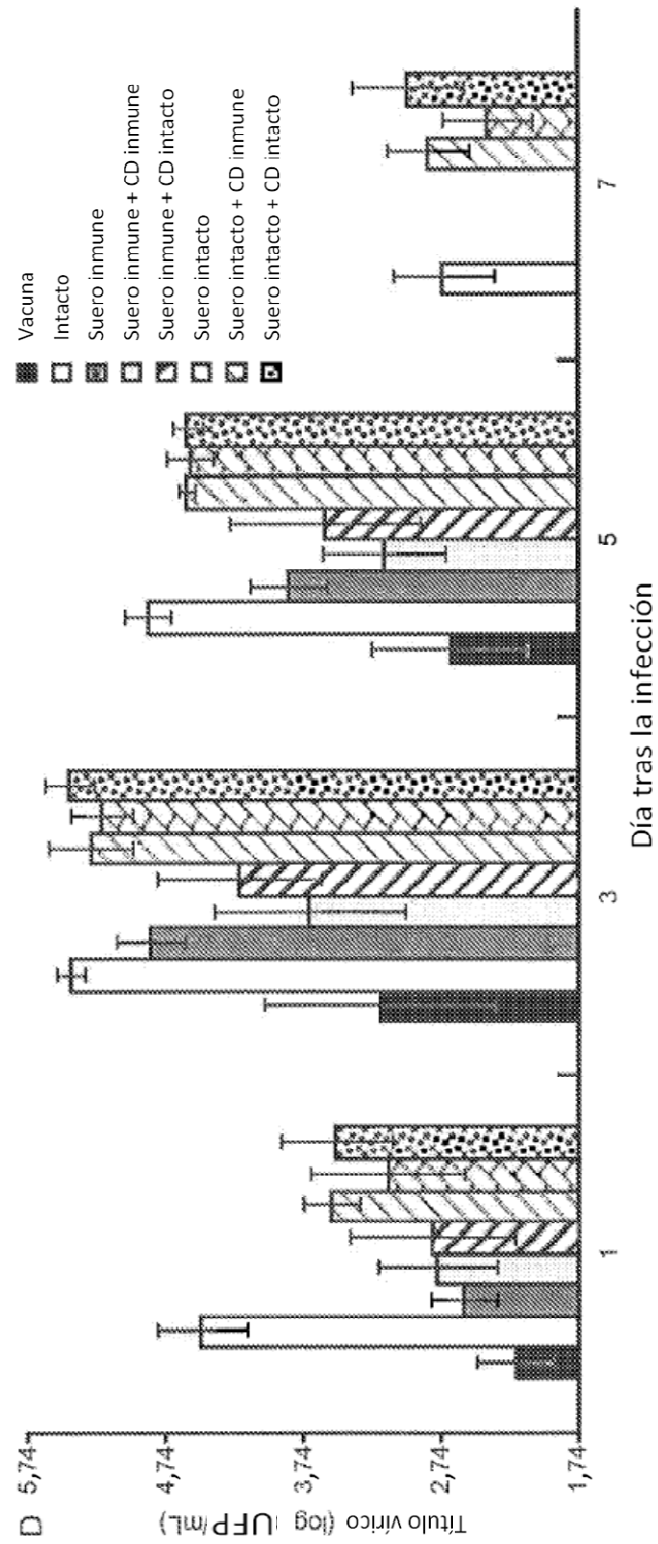


FIGURA 9A-B

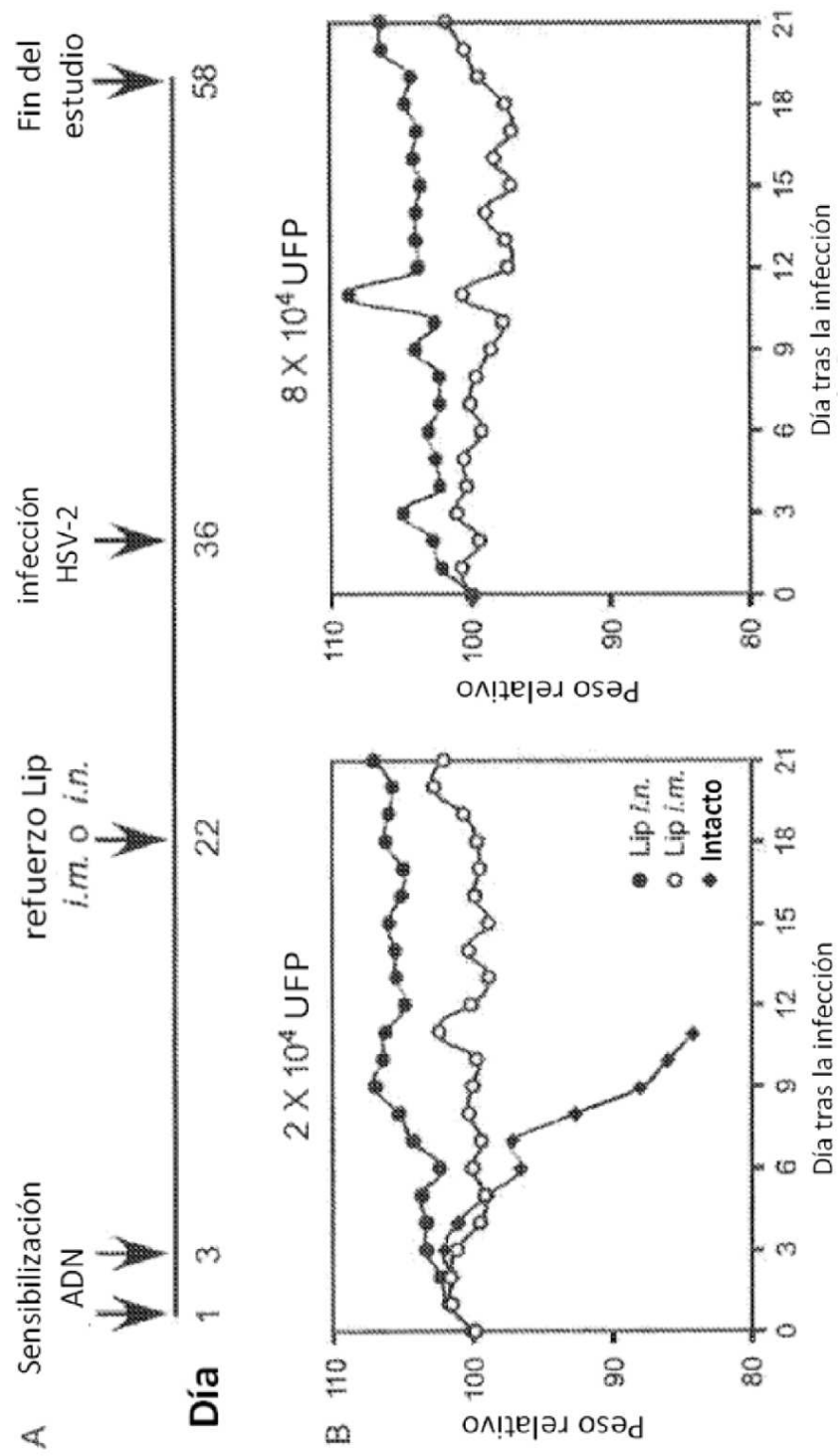


FIGURA 9C-D

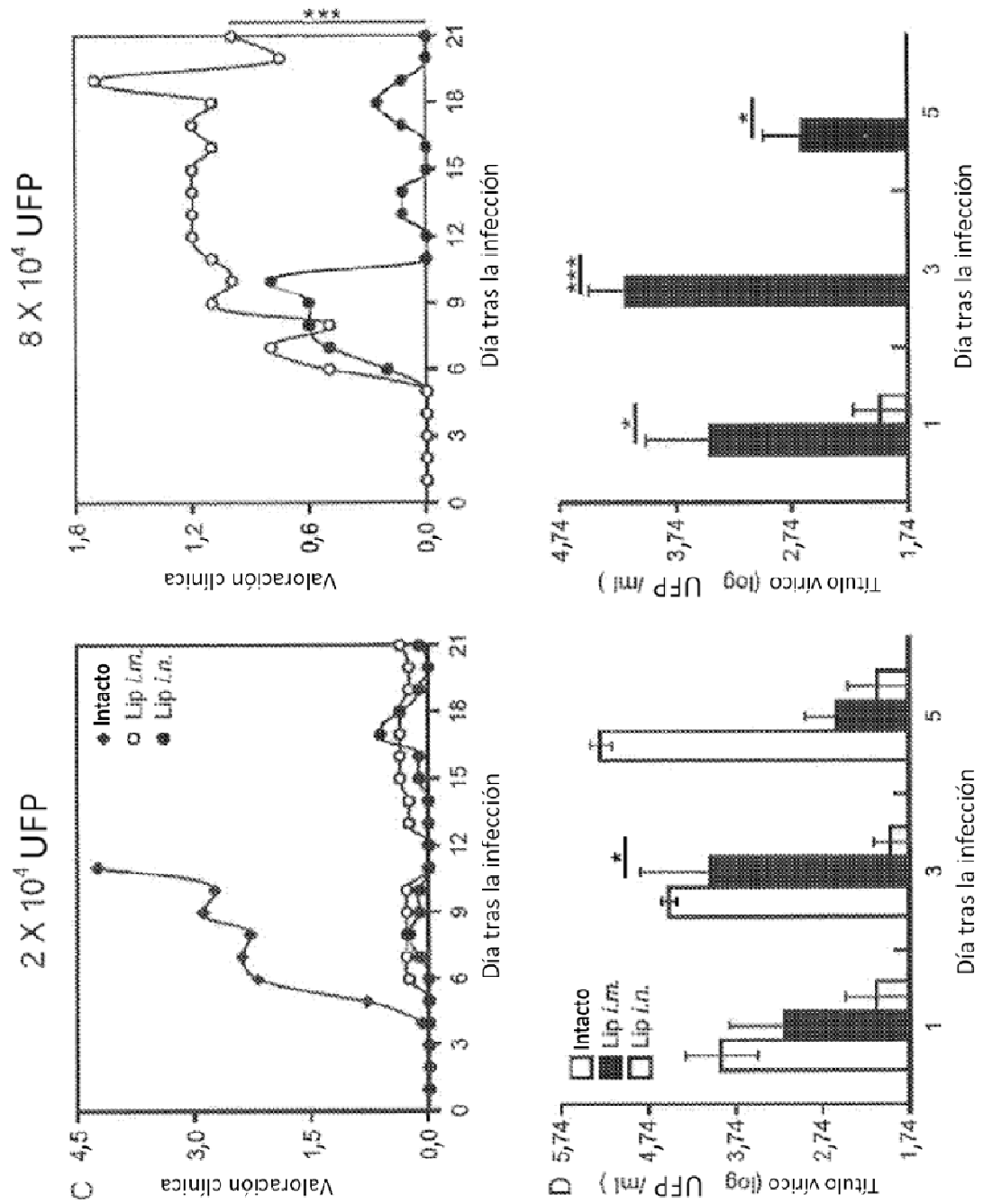


FIGURA 10A-B

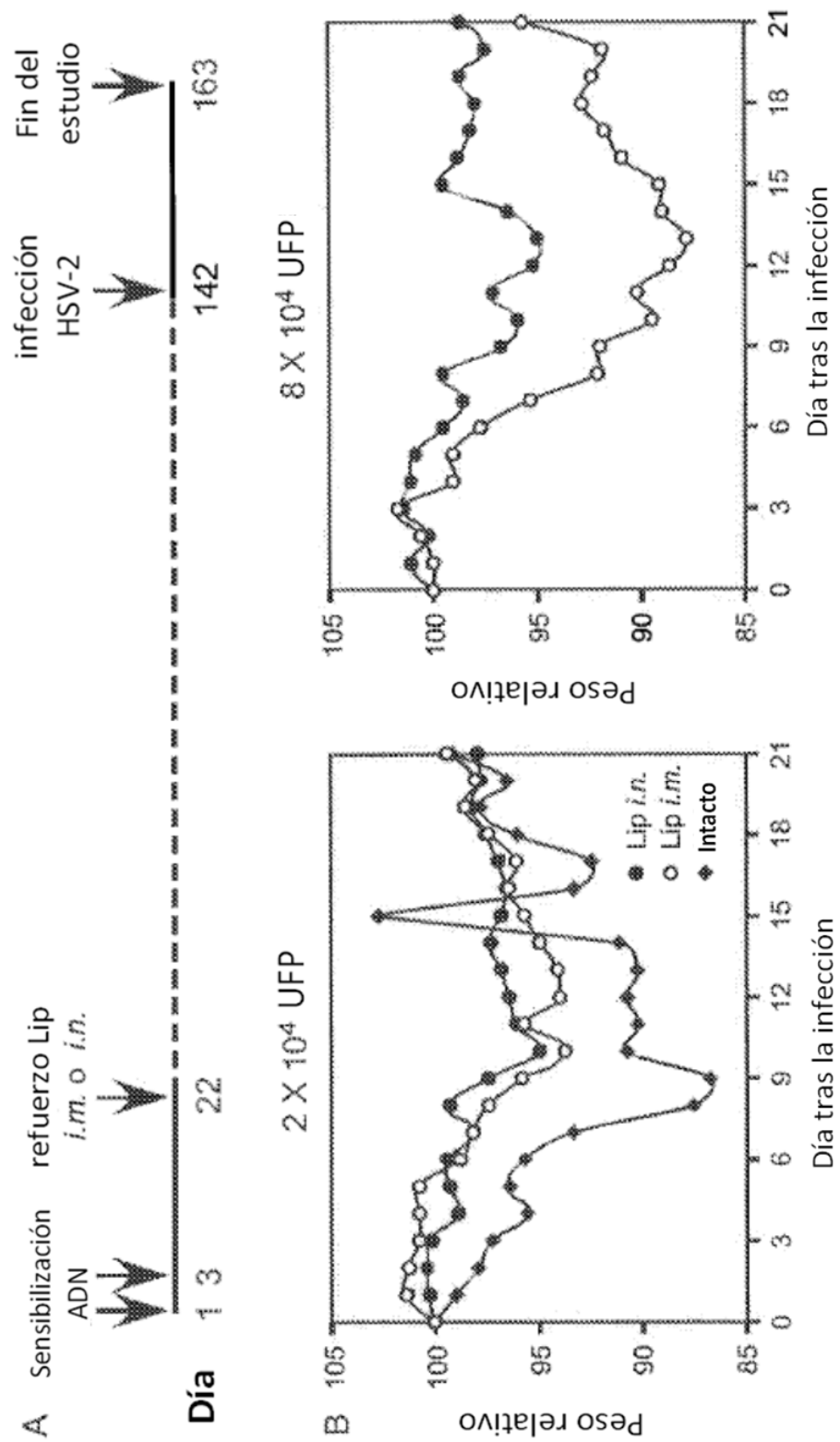
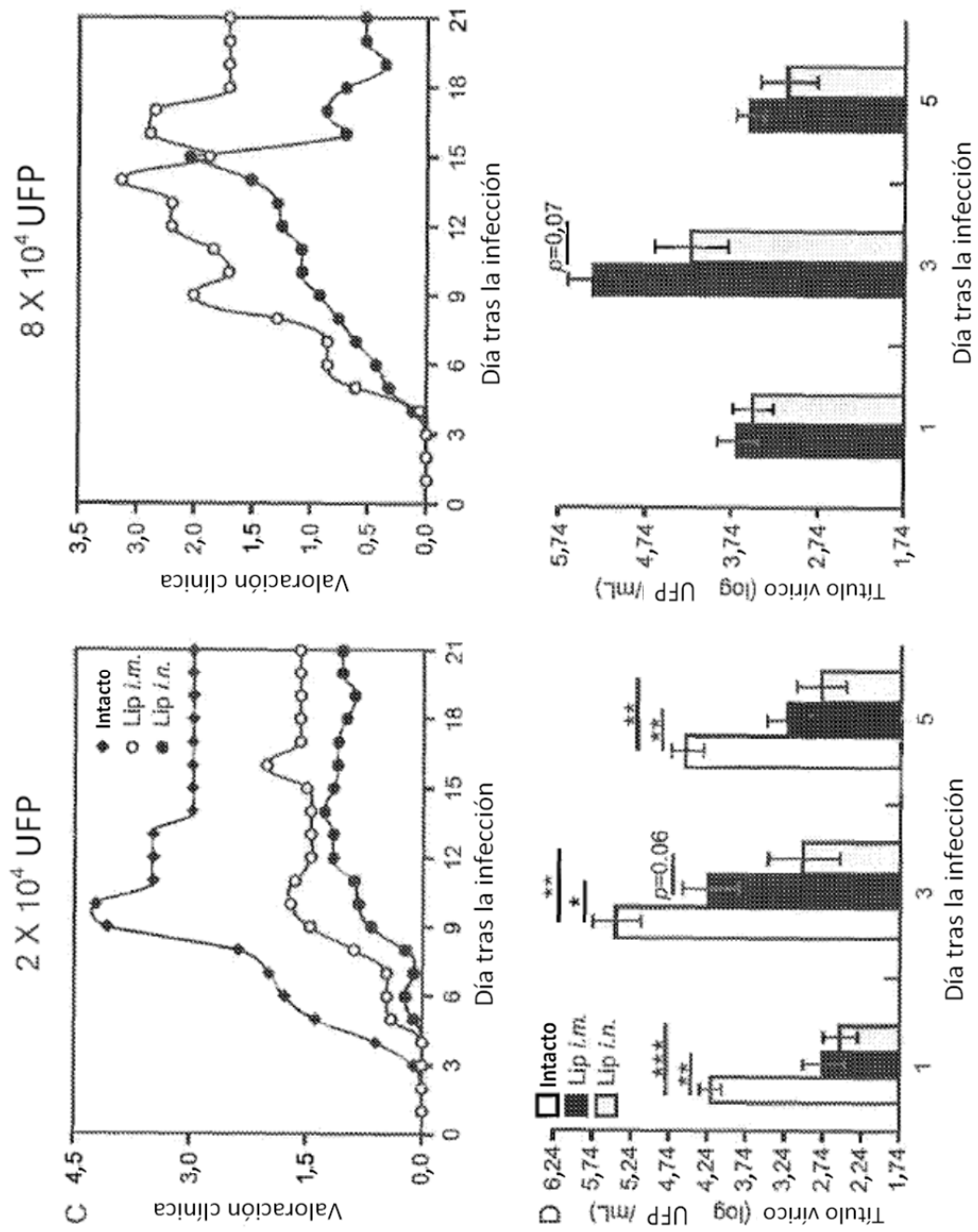


FIGURA 10C-D



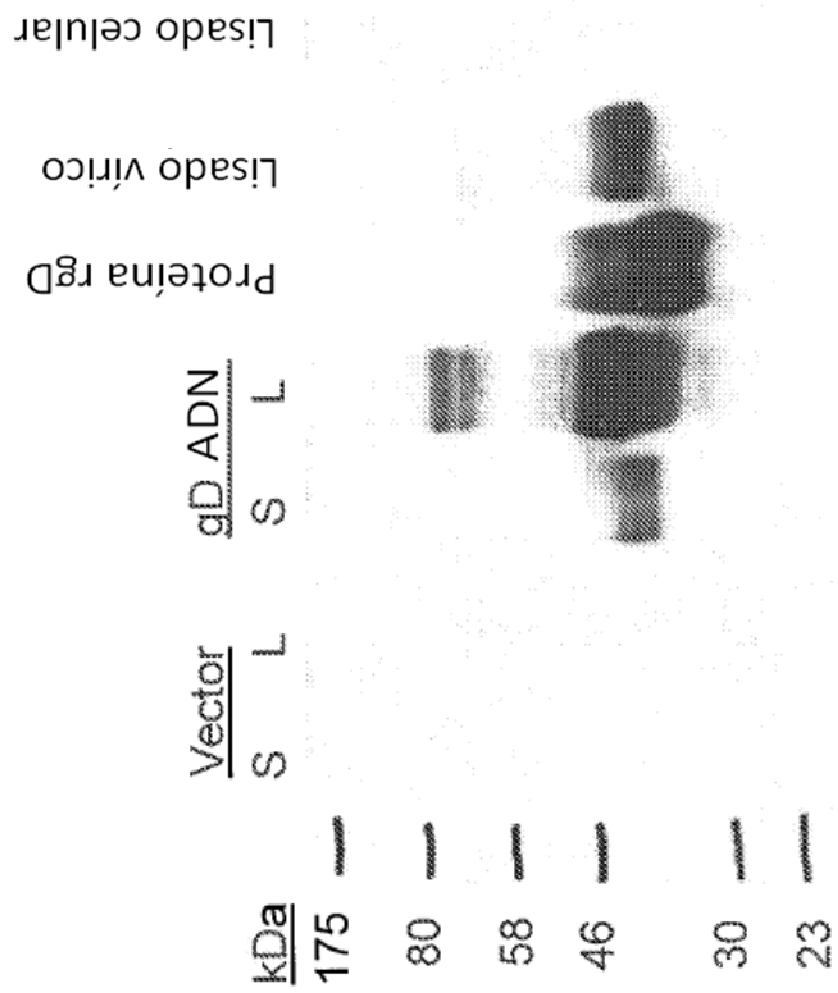
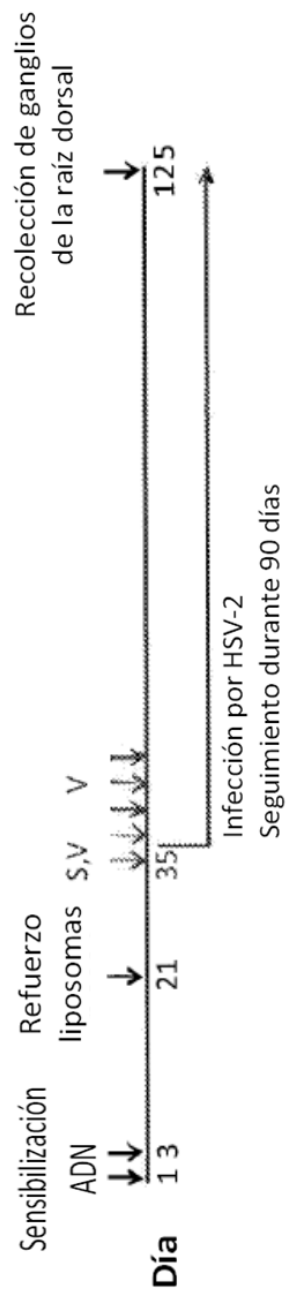


FIGURA 11

FIGURA 12



S: Muestras de suero; día 35

V: Muestras vaginales; día 35 y días 1, 3, 5 y 7 tras la infección

FIGURA 13

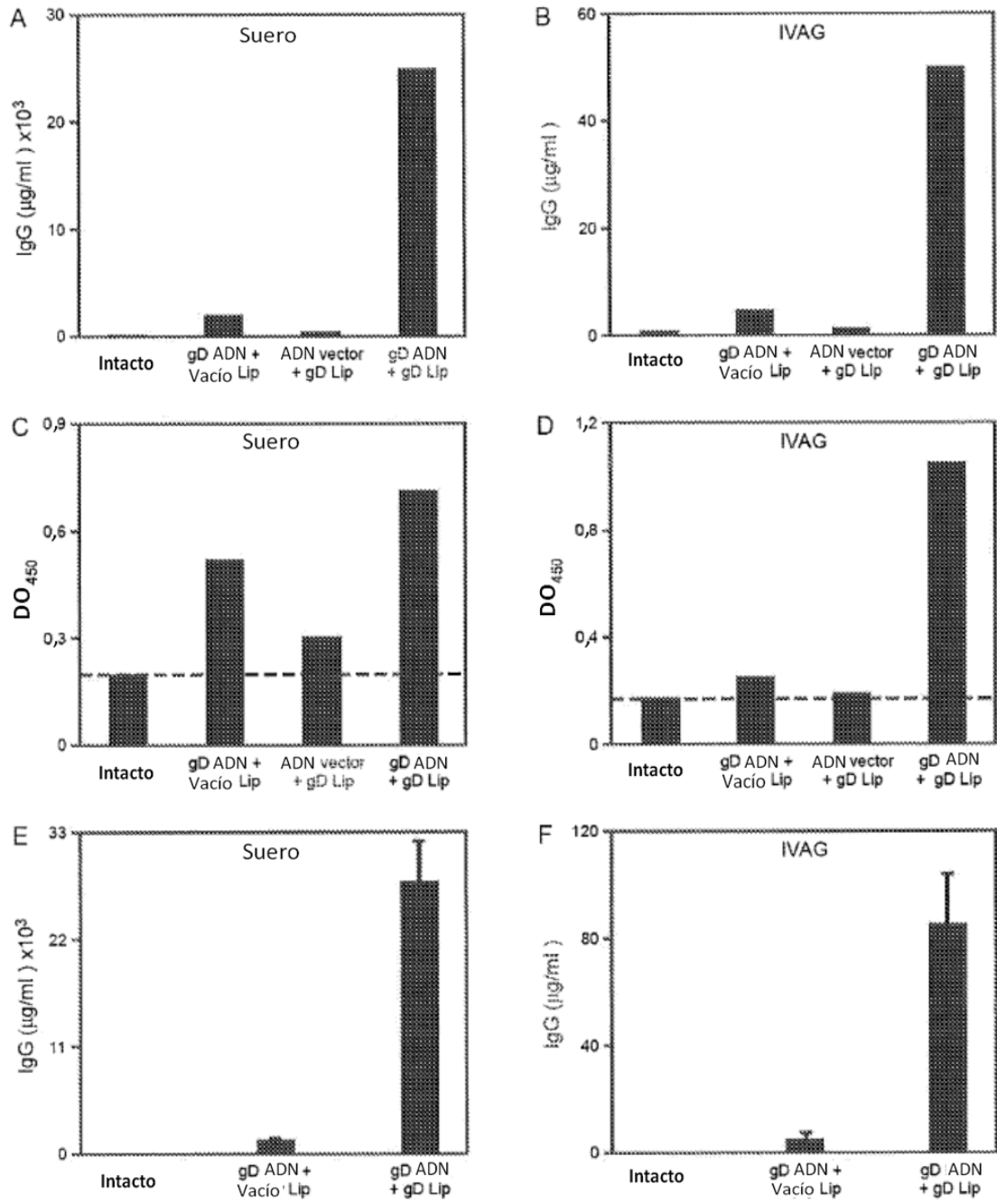


FIGURA 14

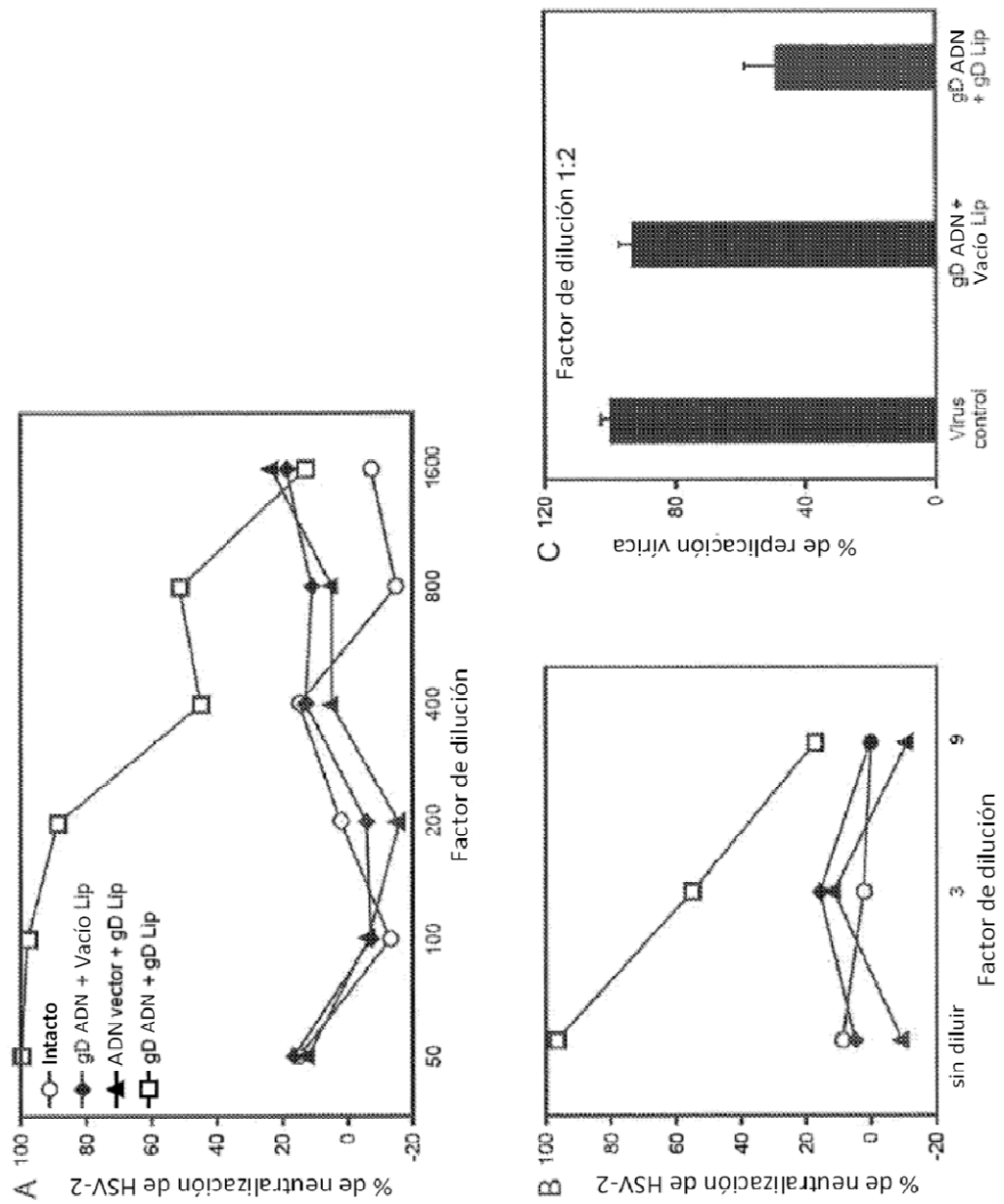


FIGURA 15

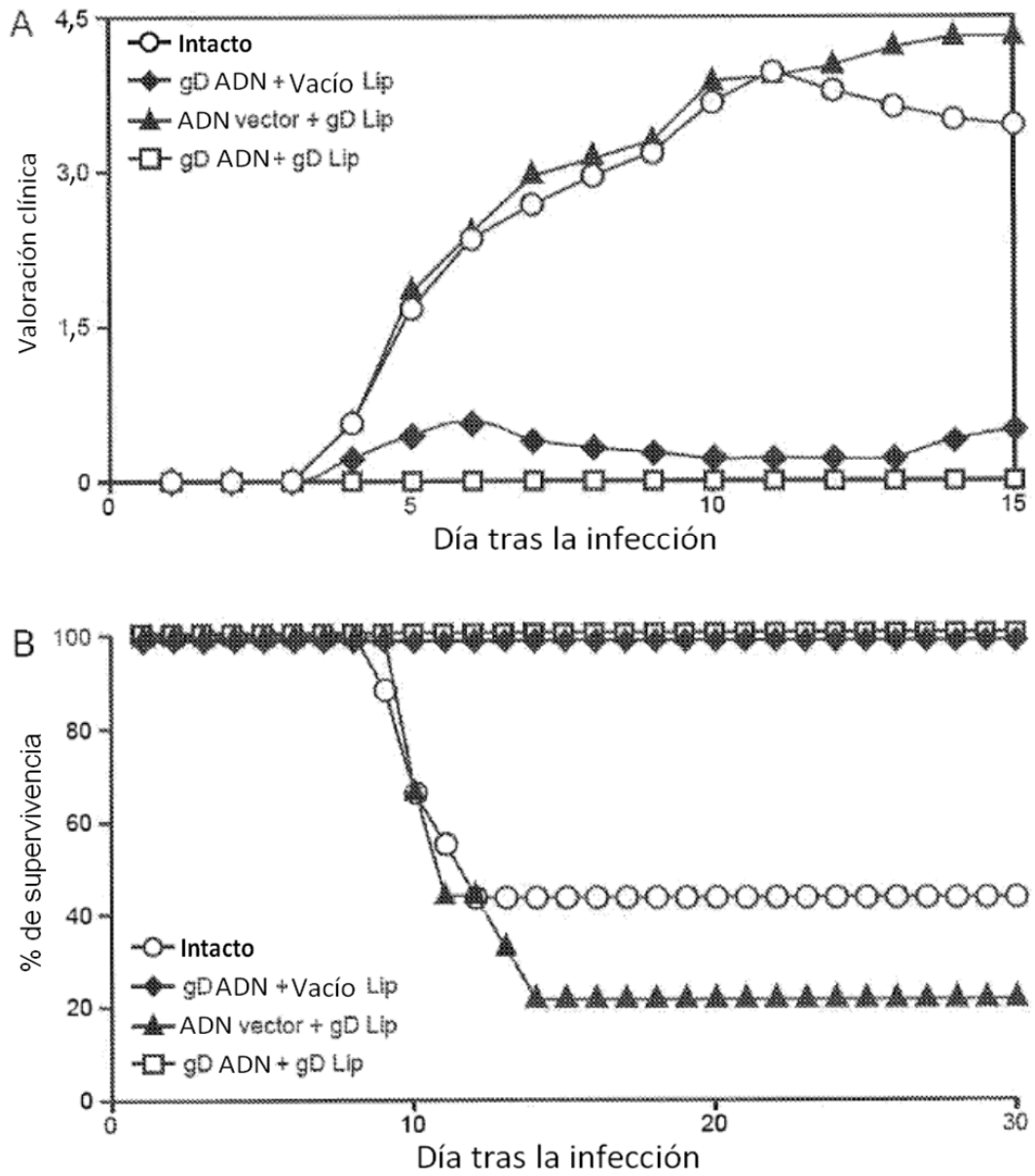


FIGURA 16

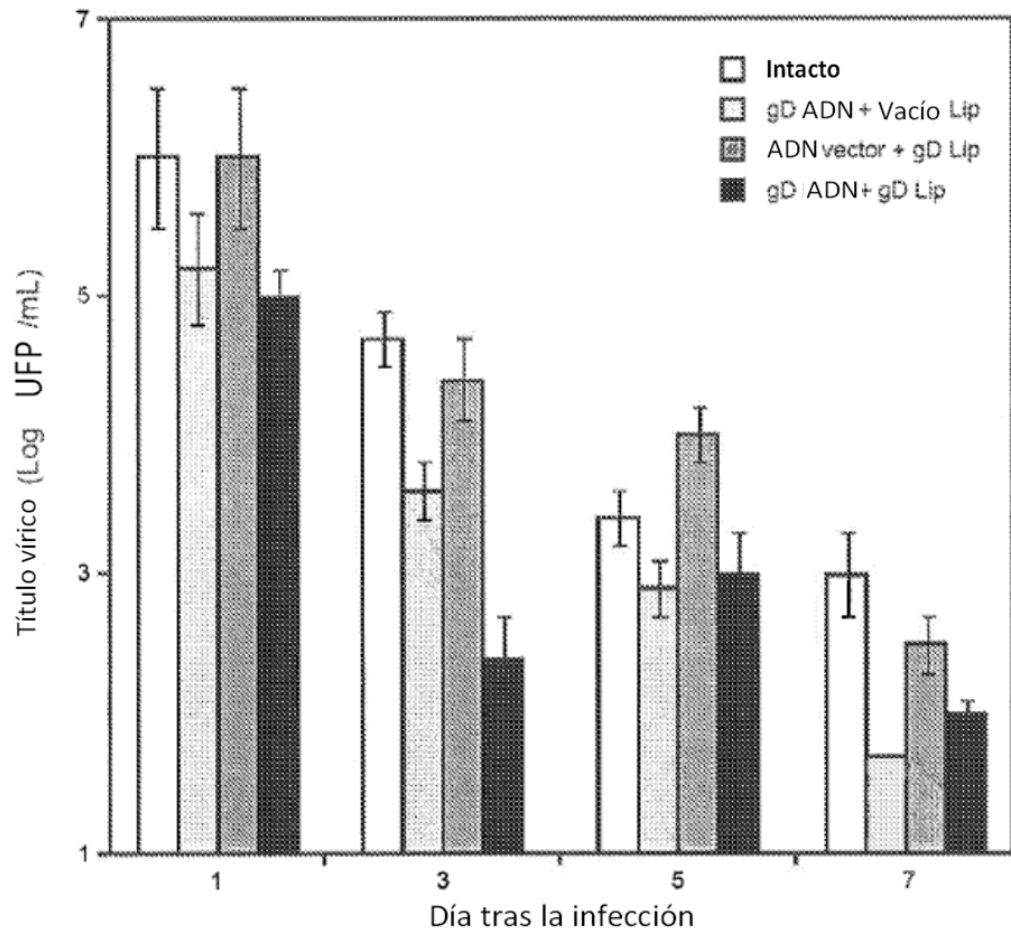


FIGURA 17

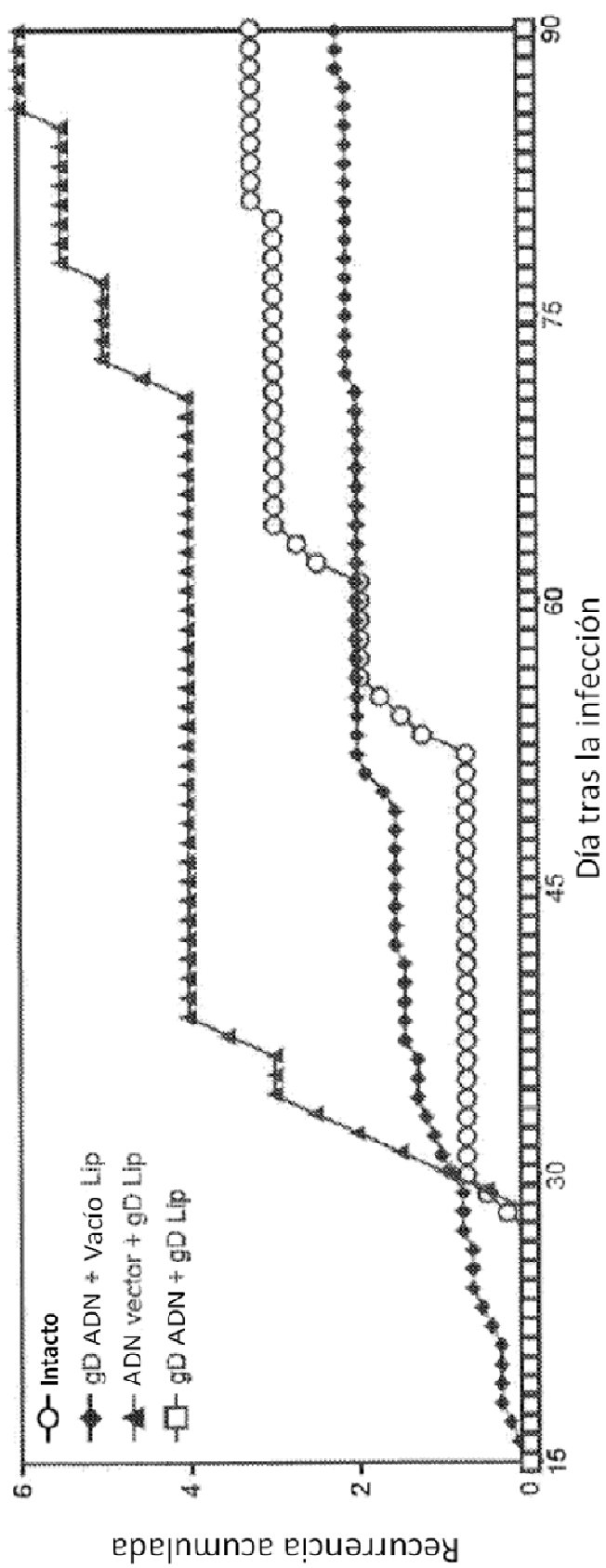


FIGURA 18

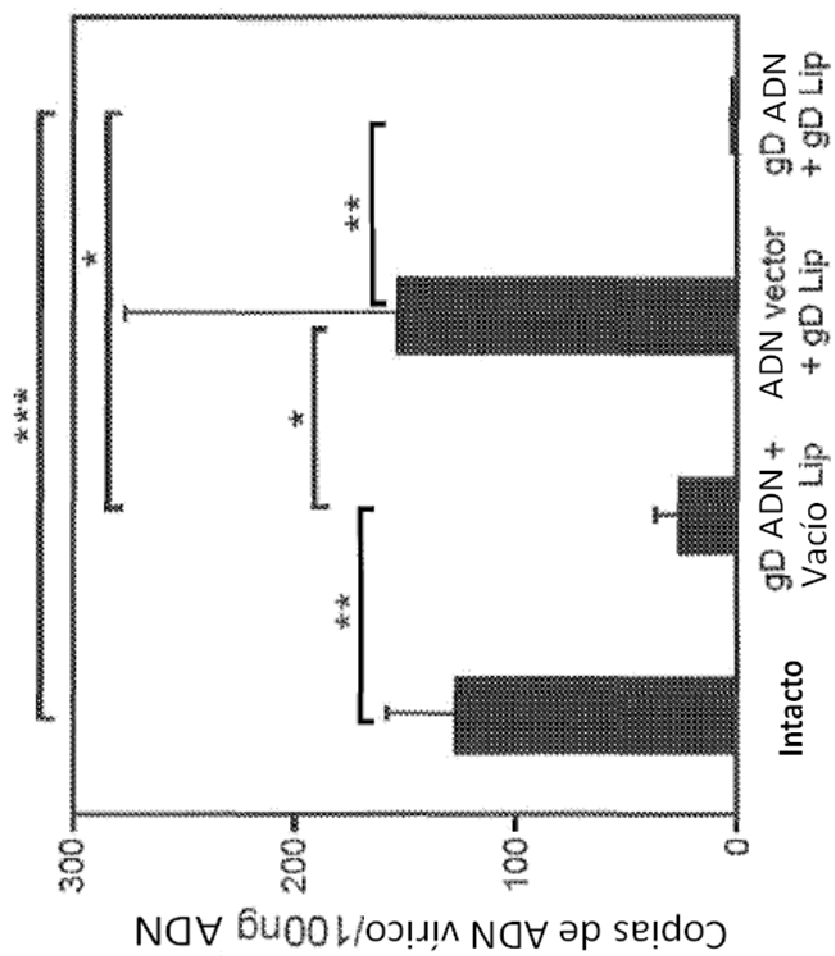


FIGURA 19

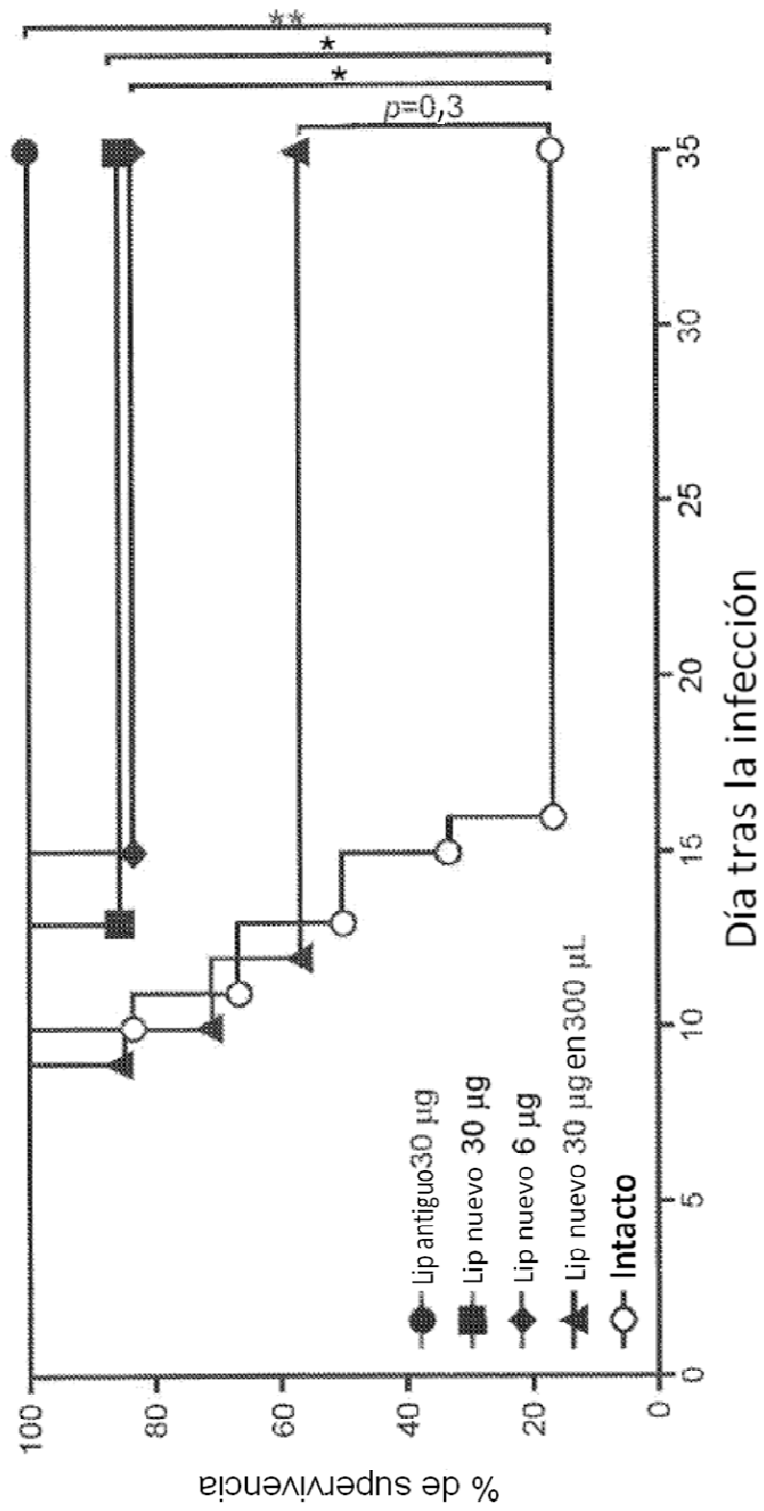


FIGURA 20

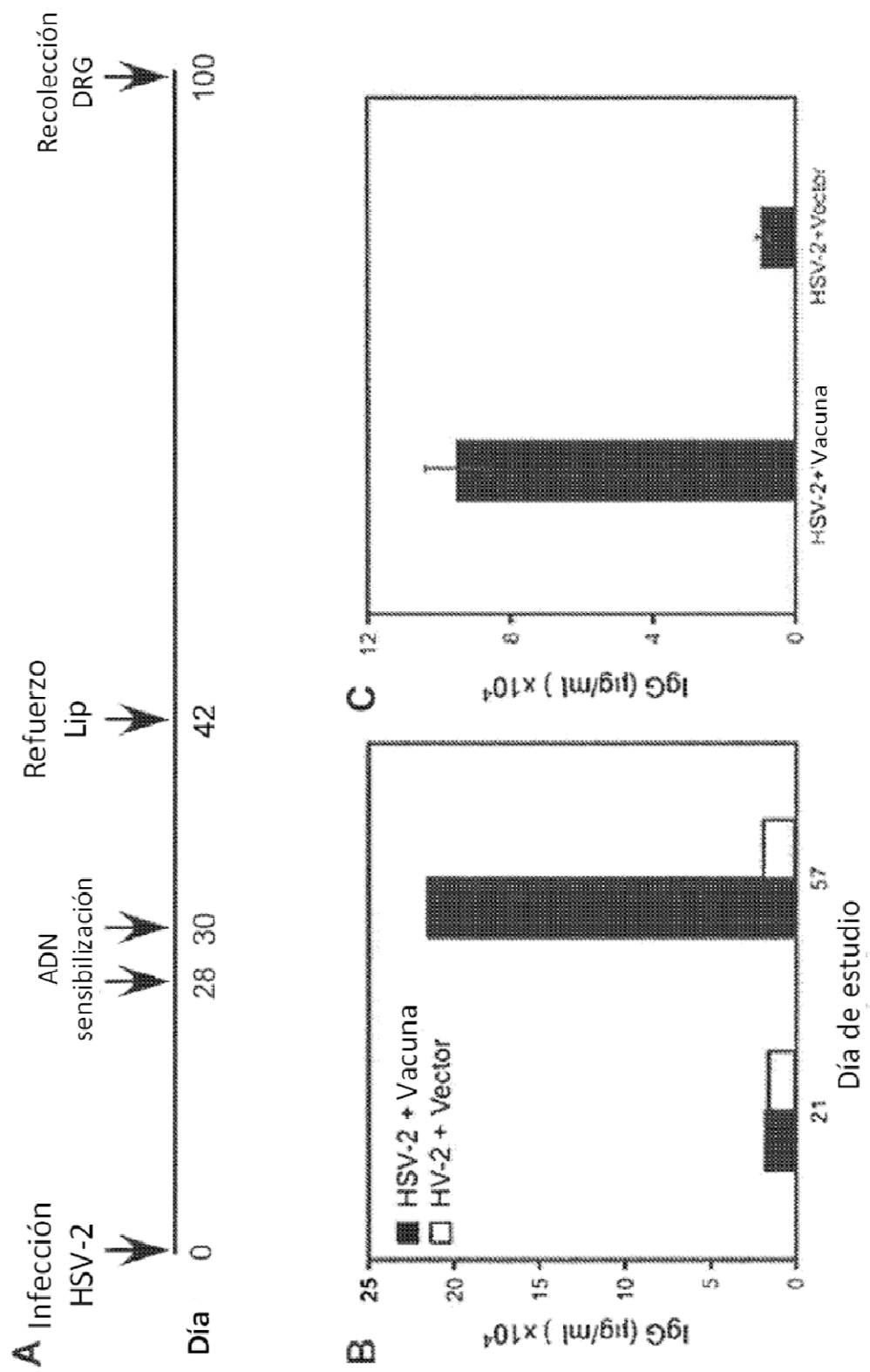


FIGURA 21

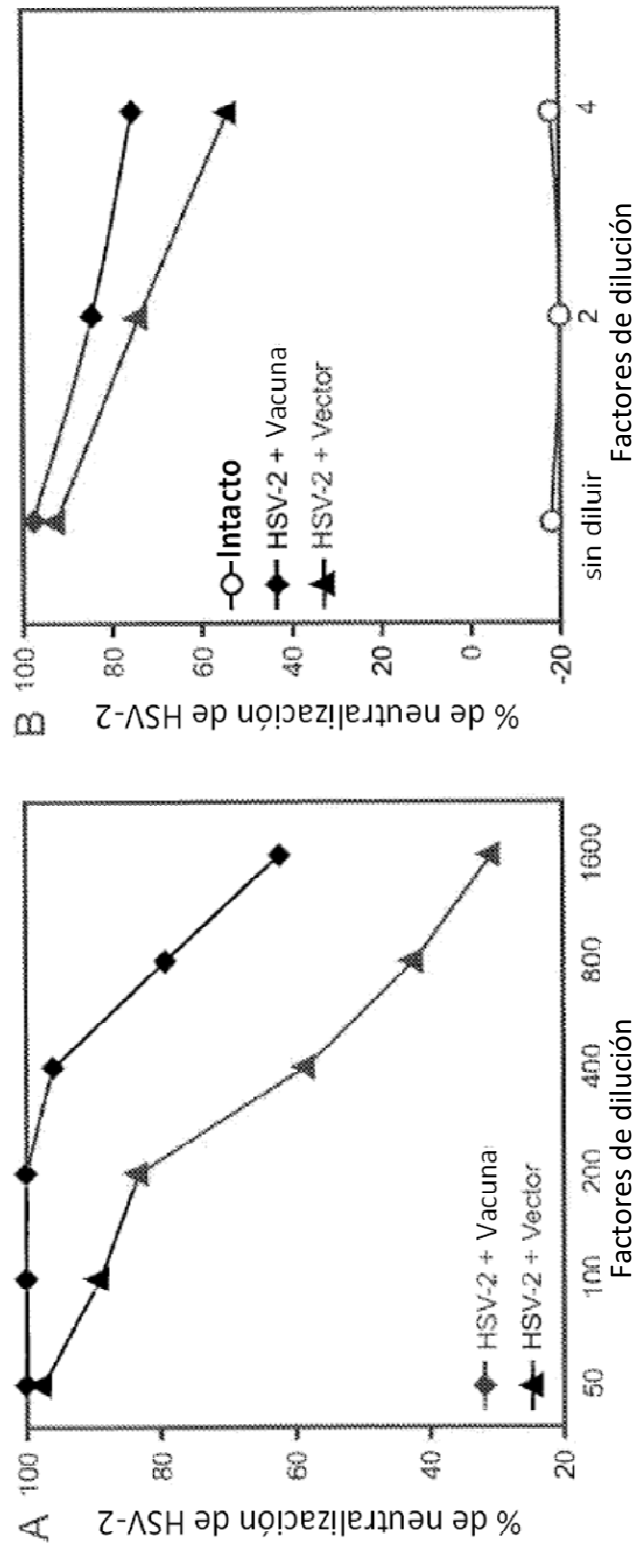
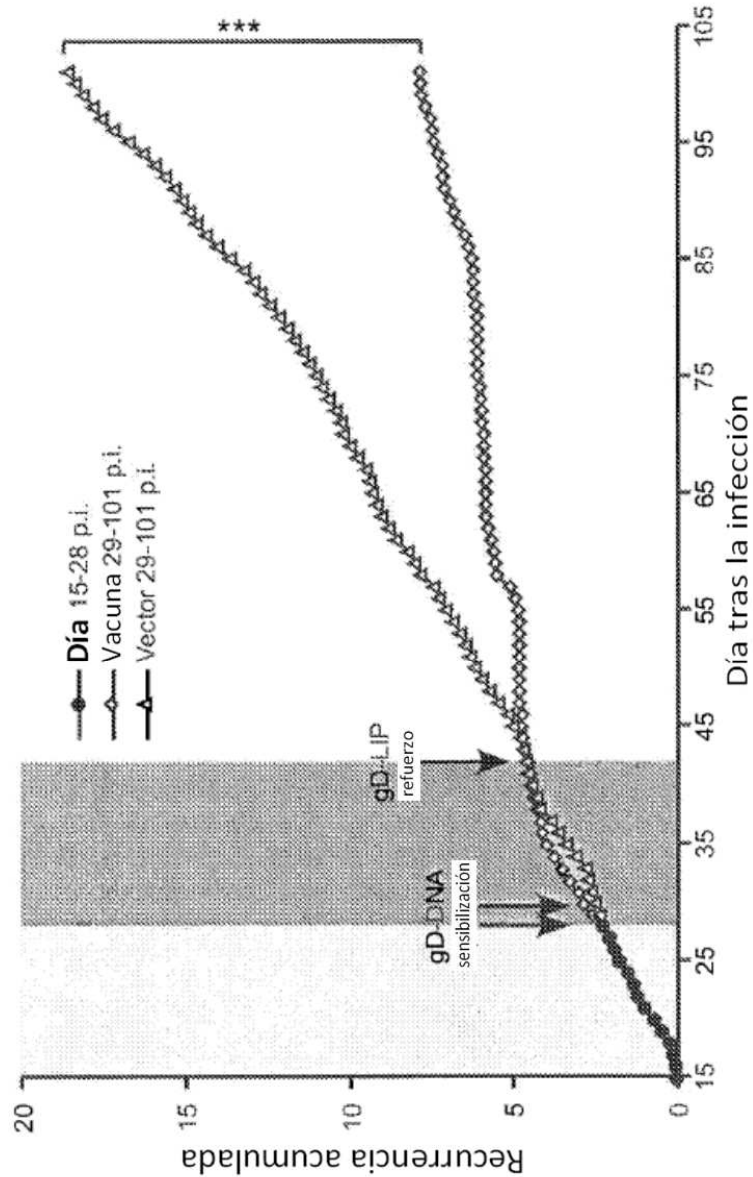


FIGURA 22



Pendiente de la regresión lineal de las curvas de recurrencia acumulada				
Días tras la infección		15-28 p.i.	29-42 p.i.	43-101 p.i.
Vacuna	Vector	0,19	0,15	0,05
			0,20	0,23
Valor de p		NA	=0,004	<0,0001