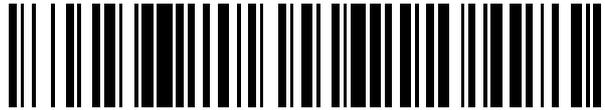


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 556**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 39/245	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2013 PCT/US2013/041364**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173590**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2013 E 13724492 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2850431**

54 Título: **Vacunas para el VHS-2**

30 Prioridad:

16.05.2012 US 201261647764 P
03.08.2012 US 201261679387 P
15.10.2012 US 201261714158 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2018

73 Titular/es:

IMMUNE DESIGN CORP. (100.0%)
1616 Eastlake Ave. E. Suite 310
Seattle, WA 98102, US

72 Inventor/es:

DUBENSKY, THOMAS W. JR.;
HOSKEN, NANCY A.;
ROBBINS, SCOTT, H. y
MOORE, MARGARET, D.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 673 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas para el VHS-2

Campo de la técnica

Vacunas para la infección por el virus del herpes simple tipo 2 y métodos y composiciones relacionados.

5 Antecedentes

El VHS-2 (virus del herpes simple tipo 2) es un miembro de la familia Herpetoviridae, un grupo de virus de ADN que a menudo dan como resultado lesiones cutáneas (por ejemplo, varicela y ampollas febriles) y se caracterizan por infecciones latentes y recurrentes. El VHS-2 es la causa que conduce a úlceras genitales, que pueden manifestarse como un grupo de pequeñas ampollas llenas de fluido que se rompen y forman úlceras dolorosas, que tardan varias semanas en curar. Síntomas adicionales pueden incluir fiebre, sensación general de malestar, dolores musculares, dolor al orinar, flujo vaginal, y agrandamiento y sensibilidad de los ganglios linfáticos en la región inguinal. Son probables los brotes recurrentes. Los virus pueden permanecer en las células nerviosas durante la vida del sujeto infectado y reactivarse, formando úlceras cutáneas, a intervalos irregulares. Incluso en ausencia de úlceras, los virus se pueden producir y propagar de un individuo a otro. En la actualidad esto es incurable.

El herpes genital es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente. En los Estados Unidos, alrededor del 16% de la población, o aproximadamente uno de cada seis personas, está infectada con el VHS-2, con un peso desproporcionado en las mujeres – aproximadamente el 20% de las mujeres y el 12% de los hombres- y en los afro-americanos – aproximadamente el 40% de la población y cerca del 50% de las mujeres afro-americanas. (Morbidity and Mortality Weekly Report, 59:456-459, 23 de Abril, 2010). En conjunto, aproximadamente 50 millones de personas están infectadas en los EE.UU., de los cuales aproximadamente el 80% no son conscientes de su infección, pero pueden aún ser contagiosos. En otros lugares del mundo, el VHS-2 también alcanza proporciones epidémicas. Un grupo de la OMS estimó que en el 2003, 536 millones de personas de la población mundial se infectaron, y estaban apareciendo nuevas infecciones en aproximadamente 23 millones de personas al año (Looker et al., Bull World Health Organ. 86:805-812, 2008). Si bien la prevalencia variaba según la región, la prevalencia aumentaba generalmente con la edad y era mayor entre las mujeres que entre los hombres. Además, la prevalencia del VHS-2 es mayor en los países en desarrollo que en los países desarrollados – con las excepciones de América del Norte, que tiene una alta prevalencia del VHS-2, y el Sur de Asia, que tiene una prevalencia baja de VHS-2. La prevalencia más alta se encuentra en el África Sub-Sahariana donde están infectados con VHS-2 cerca del 80% de las mujeres y el 45% de los hombres. Otras regiones, especialmente el este de Asia y el sureste de Asia, se acercan a este nivel. Además de la transmisión sexual, el VHS-2 se puede transmitir de una mujer al bebé, normalmente durante en el momento del parto. Asociado con el VHS-2 epidémico en la población adulta de los EE.UU., se ha incrementado drásticamente la incidencia de la infección neonatal. Aproximadamente 1.800 casos de infección de VHS neonatal aparecen cada año en los EE.UU., que es un número de casos mayor que en la infección VIH neonatal.

Las consecuencias sanitarias de la infección por VHS-2 son sorprendentes. Aunque la gran mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, el virus puede transmitirse todavía. Aquellos con síntomas padecen de úlceras dolorosas en sus genitales y en la región anal, y a menudo padecen síntomas similares a los de la gripe, tal como fiebre y glándulas inflamadas. Desafortunadamente, aquellos con un primer brote de VHS-2 tienen probablemente varios brotes adicionales (normalmente cuatro o cinco) sólo durante del primer año. Independientemente de la gravedad de los síntomas, el conocimiento de la infección causa a menudo estrés y puede impactar negativamente en la calidad de vida (Rosenthal, et al., Sex Transm Infect. 82:154, 2006; Crosby et al Sex Health, 5:279-283, 2008). En neonatos infectados con VHS-2, la encefalitis neonatal a partir de la infección de VHS tiene una mortalidad >15% incluso con tratamiento, y la morbilidad neurológica entre los niños infectados con VHS-2 es una de las causas de supervivencia del 30-50% adicional asociada con la alta prevalencia de VHS-2, existe una clara consecuencia de que la infección por VHS-2 incrementa sustancialmente el riesgo de adquirir y transmitir el VIH-1. Los datos de África muestran que la infección por VHS-2 puede incrementar el riesgo de transmisión por VIH en hasta siete veces y que hasta la mitad de los nuevos casos de VIH adquiridos son directamente atribuidos a la infección por VHS-2. En general, el riesgo relativo de adquirir el VIH incrementa más del doble en los individuos infectados con VHS-2. El efecto sinérgico de la adquisición de VIH es mayor para el VHS-2 que para cualquier otra enfermedad de transmisión sexual, poniendo de manifiesto la necesidad de una estrategia de salud pública eficaz capaz de minimizar los efectos del VHS-2 epidémico existente.

El incremento de la prevalencia del VHS-2 en las poblaciones adulta y pediátrica persiste a pesar del uso generalizado de la intervención farmacológica. La medicación antiviral, tal como el Aciclovir, proporcionada a altas dosis en el inicio de la infección puede reducir la transmisión del VHS, pero no previene de la infección latente del ganglio neuronal. La terapia antiviral tiene muchos inconvenientes, que incluyen efectos adversos como náuseas, vómitos, erupciones cutáneas, y descenso de la función renal, y se debería usar con precaución ya que pueden ser teratogénicos, así como tóxicos para los embriones en desarrollo. Además, la administración continua de supresores con valaciclovir reducen la transmisión de VHS por debajo del 50% a pesar de la intervención temprana. Si bien este nivel de eficacia era aceptable, el planteamiento era inviable considerando el alto coste y que el 80% de los

infectados no son conscientes de su estado. Alternativas para los fármacos antivirales, tal como microbicidas tópicos, no se demostró clínicamente, y las barreras físicas (por ejemplo, preservativos) tienen una eficacia insignificante en el "mundo-real". Por estas razones, la vacunación es esencial para combatir y disminuir el impacto sobre la salud de la infección por VHS-2.

- 5 La primera vacuna para el VHS se desarrolló en los años 20, y desde entonces, se han intentado una variedad de planteamientos vacunales – pero todos sin resultados. Los tipos de vacunas convencionales, han durado mucho tiempo, incluyen virus enteros, virus inactivados, virus atenuados vivos, virus vivos modificados, y subunidades derivadas de cultivos celulares fracasaron en la mayoría de los casos o tuvieron baja eficacia (Stanberry, Herpes 11 (Suppl 3) 161A-169A, 2004). Con la llegada de la tecnología de ADN recombinante, se han desarrollado las vacunas de subunidades recombinantes. Estas vacunas comprenden una o dos glicoproteínas de envoltura en combinación con adyuvantes. Las glicoproteínas fueron candidatos atractivos principalmente porque son las dianas de anticuerpos neutralizantes y están altamente conservadas entre las cepas de VHS-2. En la última década, se suspendieron ensayos clínicos exhaustivos en dos vacunas candidatas, una desarrollada por Chiron y la otra por GlaxoSmithKline, debido a eficacia insuficiente. La vacuna de Chiron comprendía formas truncadas de dos glicoproteínas del VHS-2, gD2 y gB2, en combinación con el adyuvante MF59. La vacuna proporcionó en el mejor caso la protección transitoria contra el VHS-2 aunque se generaron altos títulos de anticuerpos de VHS-2 (Stanberry, ibid). GlaxoSmithKline (GSK) desarrolló y ensayó una vacuna similar; sin embargo contenía sólo una única glicoproteína, gD2, y alumbre y MPL como adyuvantes. Tras ocho años de estudios y ensayos clínicos, GSK declaró su fracaso en Octubre de 2010. La vacuna era ineficaz en la prevención de la infección en mujeres seronegativas, el único grupo en ensayos clínicos tempranos que parecían beneficiarse.

Compendio

La invención se establece en las reivindicaciones acompañantes.

La invención proporciona una composición farmacéutica inmunogénica que comprende:

- 25 (a) (i) un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 que es un fragmento inmunogénico de al menos 100 aminoácidos del polipéptido UL19 que comprende 451-1054 restos de SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75% de aminoácidos 1-450 de SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75% de aminoácidos 1055-1374 de SEQ ID NO:4; o una variante inmunogénica del mismo que mantenga al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 100 aminoácidos contiguos;
- 30 (ii) una proteína UL25 de VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la misma; y
(iii) una proteína gD2 de VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la misma;
- (b) un lípido monoácido A (MALA) adyuvante; y
- (c) un transportador aceptable farmacéuticamente, como se establece en las reivindicaciones.

35 La invención proporciona también un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende las proteínas o fragmentos inmunogénicos de (a)(i), (a)(ii), y (a)(iii), anteriores, como se establece en las reivindicaciones.

Las composiciones de la invención son útiles en un método para tratar una infección de VHS-2 en un sujeto; un método para generar una respuesta inmunológica en un sujeto; y, un método para inmunizar a un sujeto contra el VHS-2.

40 Se establecen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones acompañantes.

En la presente memoria se describe un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un fragmento inmunogénico del polipéptido UL19 que carece de al menos del 75% de los aminoácidos 1-450 de SEQ ID NO:4 y que carece de al menos del 75% de los aminoácidos de 1055-1374 de SEQ ID NO:4; (b) la secuencia establecida en SEQ ID NO:12; (c) una variante inmunogénica de (a) o (b) que mantenga al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 15 aminoácidos contiguos; (d) un fragmento inmunogénico de (a) o (b); y (e) una fusión quimérica de (a), (b), (c) o (d). En otra realización se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido anteriormente mencionado.

Por la inmediata divulgación se proporcionan también composiciones farmacéuticas. En una realización, se proporciona una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende: (i) un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 seleccionado del grupo que consiste en: (a) un fragmento inmunogénico del polipéptido UL19 que carece de al menos del 75% de los aminoácidos 1-450 de SEQ ID NO:4 y que carece de al menos del 75% de los aminoácidos de 1055-1374 de SEQ ID NO:4; (b) la secuencia establecida en SEQ ID NO:12; (c) una variante inmunogénica de (a) o (b) que mantenga al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 15

aminoácidos contiguos; (d) un fragmento inmunogénico de (a) o (b); y (e) una fusión quimérica de (a), (b), (c) o (d); (ii) opcionalmente, un agente que activa la inmunidad innata; y (iii) un transportador aceptable farmacéuticamente.

5 En otra realización, se proporciona la composición anteriormente mencionada la cual comprende además UL25 o un fragmento inmunogénico de la misma. En otra realización, la composición comprende además gD2 o un fragmento inmunogénico de la misma.

En otra realización de la inmediata divulgación, se proporciona la composición anteriormente mencionada en donde el agente es un adyuvante. En una realización, el adyuvante es GLA (glucopiranosil lípido A). En otra realización, el GLA está en la forma de una emulsión de aceite en agua o en una forma acuosa. En determinadas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende escualeno.

10 En otra realización de la divulgación, se proporciona un método para tratar una infección de VHS-2 en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición mencionada anteriormente. En otra realización, se proporciona un método para generar una respuesta inmunológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición mencionada anteriormente. En otra realización, se proporciona un método para inmunizar a un sujeto contra el VHS-2 que comprende administrar al sujeto una composición mencionada anteriormente. Según varias realizaciones de la divulgación, se proporciona un método mencionado anteriormente en donde la vía de administración es por vía mucosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal, o vaginal. En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende además administrar al sujeto una segunda, tercera o cuarta composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-8.

20 La invención reivindicada se dirige a composiciones y métodos útiles para prevenir o tratar en sujetos infecciones de VHS-2 (virus del herpes simple de tipo 2), como se establece en las reivindicaciones, preferiblemente en seres humanos, en una realización el ser humano es una mujer, mientras que en otra realización el ser humano es un hombre. Las composiciones comprenden (i) una glicoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la glicoproteína de envoltura de VHS-2, (ii) una proteína estructural del VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la proteína estructural de VHS-2, en donde la proteína estructural no es una de las glicoproteínas de envoltura, (iii) un agente que activa la inmunidad innata en un sujeto y (iv) un transportador aceptable farmacéuticamente. En determinadas realizaciones, la glicoproteína de envoltura es gD2 y la composición tiene bien gD2 o bien en una realización alternativa, un fragmento inmunogénico derivado de gD2. En algunas realizaciones, la proteína estructural es una o más de UL47, ICP0, ICP4, ICP47, UL5, UL8, UL15, UL19, UL25, UL30, UL32, UL46, UL39 (ICP10), UL7, UL40, UL54 y UL26 y si están presentes los fragmentos inmunogénicos, son derivados de UL47, ICP0, ICP4, ICP47, UL5, UL8, UL15, UL19, UL25, UL30, UL32, UL46, UL39 (ICP10), UL7, UL40, UL54 y/o UL26. Se entiende que la secuencia exacta de una proteína puede variar de un herpesvirus a otro, y por tanto, todas las referencias hacia una proteína de VHS-2 engloban a cualquiera de tales proteínas obtenibles a partir de cualquier VHS-2 que aparezca de forma natural. En otras realizaciones, tanto UL19 como UL25, o fragmentos a partir de UL19 (por ejemplo SEQ ID NO:12, un tipo de Fragmento de Dominio Superior) y UL25, o está presente una mezcla de proteína entera y fragmentos, por ejemplo, una mezcla de UL25 de extensión completa y un fragmento de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO:12, opcionalmente con UL47 o un fragmento de la misma. A veces, el agente que activa la inmunidad innata es un adyuvante. En particular, el adyuvante puede ser GLA u otro adyuvante MALA. En una realización la composición farmacéutica inmunogénica comprende gD2, GLA u otro adyuvante MALA, y dos o tres antígenos seleccionados a partir de UL25, UL19 y UL47 de extensión completa o fragmentos, y un transportador aceptable farmacéuticamente. En realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica inmunogénica comprende un adyuvante MALA, preferiblemente GLA que tienen la fórmula estructural de la Figura 1, gD2, UL25, Fragmento de Dominio Superior (ud, de sus siglas en inglés) UL19, y un transportador aceptable farmacéuticamente; opcionalmente tal composición comprende además uno o más proteínas estructurales de VHS-2 adicionales, o fragmentos de las misma.

45 En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una porción antigénica de una glicoproteína de envoltura de VHS-2 y un transportador aceptable farmacéuticamente. Los términos "fragmento inmunogénico" y "fragmento inmunológico" y "porción antigénica" se emplean de manera intercambiable en la presente memoria para designar fragmentos o porciones de proteínas que producen una respuesta del anticuerpo o una respuesta citotóxica celular que conserva especificidad para (reactividad cruzada con) la proteína de extensión completa. En determinadas realizaciones, la porción antigénica se une a anticuerpos neutralizantes. En determinadas realizaciones, la porción antigénica es a partir de gD2 o gB2, y en otras realizaciones, la porción antigénica, ya sea de gD2, gB2 u otra glicoproteína de envoltura, comprende al menos parte, y opcionalmente toda, la secuencia líder. En cualquiera de las realizaciones, la porción antigénica comprende dos o más epítomos lineales o comprende dos o más epítomos discontinuos a partir de la glicoproteína de envoltura. En cualquiera de las realizaciones, la composición comprende además un agente que activa la inmunidad innata. El agente puede ser un adyuvante, tal como GLA como se divulga en, por ejemplo, la Publicación US N° 2009/0181078.

60 Las composiciones se pueden emplear en métodos para tratar una infección de VHS-2 o para generar una respuesta inmunológica, que puede prevenir o mejorar una infección de VHS-2. Sujetos adecuados para los métodos incluyen a aquellos que son seropositivos para el VHS-2, así como a los que son seronegativos para el VHS-2. En los métodos, se administra a un sujeto una de las composiciones descritas en la presente memoria.

Algunas declaraciones ejemplares de la presente divulgación se establecen como sigue, empleando la designación (xy) donde cada una de las x y de las y indican una letra, la designación indica una realización, o un grupo de realizaciones donde más de una (xy) se identifica dentro de una realización. (AA) Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende (i) una glicoproteína de envoltura de VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; (ii) una proteína estructural de VHS-2 diferente a la glicoproteína de envoltura de VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; (iii) un agente que activa la inmunidad innata; y (iv) un transportador aceptable farmacéuticamente. (AB) Composición (AA) en donde la glicoproteína de envoltura de VHS-2 es gD2, y la composición comprende gD2. (AC) Composición (AA) en donde la composición comprende un fragmento inmunológico de gD2. (AD) Una composición de cualquiera de uno o más de (AA), (AB) y (AC), en donde la proteína estructural de VHS-2 es una o más proteínas que se seleccionan del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7, y UL26. (AE) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 es UL19. (AF) La composición de (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 es UL19. (AG) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 es un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO:12. (AH) Composición (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 es un fragmento inmunológico de UL47. (AI) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 es UL25. (AJ) Composición (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 es UL25. (AK) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 un fragmento inmunológico de UL25. (AL) Composición (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 es ICP0. (AM) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 es UL47. (AN) Composición (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 un fragmento de UL47. (AO) Composición (AA) en donde la proteína estructural de VHS-2 diferente a la glicoproteína de envoltura de VHS-2 es UL47, y es un fragmento inmunológico de la misma. (AP) Composición (AB) en donde la proteína estructural de VHS-2 diferente a la glicoproteína de envoltura de VHS-2 es UL47, y es un fragmento inmunológico de la misma. (AQ) Una composición de cualquiera de una o más de (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP) que comprende además una segunda proteína estructural de VHS-2 diferente a la glicoproteína de envoltura de VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma. (AR) composición (AQ) en donde la segunda proteína estructural de VHS-2 diferente de la glicoproteína de envoltura de VHS-2 se selecciona del grupo que consiste en UL19, UL25 y UL47, donde la segunda proteína estructural no es idéntica a la proteína estructural. (AS) composición (AR) que comprende la segunda proteína estructural. (AT) Composición (AR) que comprende un fragmento inmunológico de la segunda proteína estructural. (AU) Una composición de cualquiera de uno o más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que comprende además UL25. (AV) Una composición de cualquiera de uno más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que comprende además un fragmento inmunológico de UL25. (AW) Una composición de cualquiera de uno más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que comprende además UL47. (AX) Una composición de cualquiera de uno o más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que comprende además un fragmento inmunológico de UL47. (AY) Una composición de cualquiera de uno más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que comprende además UL19. (AZ) Una composición de cualquiera de uno más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que comprende además un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO:12. (BA) Una composición de cualquiera de uno más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que comprende además UL47. (BB) Una composición de cualquiera de uno más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que comprende además un fragmento inmunológico de UL47. (BC) Una composición de cualquiera de uno más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que comprende además UL19. (BD) Una composición de cualquiera de uno más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que comprende además un fragmento inmunológico de UL19. (BE) Una composición de cualquiera de uno más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que comprende además UL25. (BF) Una composición de cualquiera de uno más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que comprende además un fragmento inmunológico de UL25. (BG) Una composición de cualquiera de uno más de (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE), y (BF) en donde el agente es un adyuvante. (BH) Una composición que se selecciona a partir de (BG) en donde el adyuvante es GLA u otro adyuvante MALA, y cada una de las opciones en (BG) se selecciona independientemente como una realización distinta de la presente invención. (BI) Composición (AA) que comprende gD2; UL25; UL19; GLA u otro adyuvante MALA; y un transportador aceptable farmacéuticamente. (BJ) Composición (AA) que comprende gD2, UL25 y un fragmento inmunológico de UL19. (BK) Composición (AA) que comprende gD2, UL19, y un fragmento inmunológico de UL25. (BL) Una composición de cualquiera de uno más de (BI), (BJ) y (BK) que comprende además UL47. (BM) Una composición de cualquiera de uno más de (BI), (BJ) y (BK) que comprende además un fragmento inmunológico de UL47. (BN) Un método para tratar en un sujeto una infección de VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de cualquiera de una o más de (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE), (BF), (BG), (BH), (BI), (BJ), (BK), (BL), y (BM). (BO) Un método para generar en un sujeto una respuesta inmunológica frente a VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de cualquiera de una o más de (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP), (AQ), (AR), (AS), (AT), (AU), (AV), (AW), (AX), (AY), (AZ), (BA), (BB), (BC), (BD), (BE), (BF), (BG), (BH), (BI), (BJ), (BK), (BL), (BM) y (BN). (BQ) Método (BO) en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y es seronegativo para VHS-1. (BR)) Método (BO) en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y es seronegativo para VHS-1.

En una realización se proporciona una composición que comprende una glicoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunológico de la misma; dos proteínas estructurales de VHS-2 distintas a una glicoproteína de VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; un agente que activa la inmunidad innata; y un transportador aceptable farmacéuticamente. Un ejemplo es una composición que comprende gD2, UL25, y SEQ ID NO:12 (un fragmento de UL19) y un monofosforil lípido A (MALA) adyuvante, por ejemplo, GLA. Además de producir respuestas del

anticuerpo específicas a gD2, la vacunación con esta composición puede producir efectores sólidos CD4 y CD8 específicos del antígeno de VHS-2 y células T de memoria que responden a una infección posterior con virus vivos. Especialmente, la inmunización profiláctica con esta composición puede proteger en gran medida o completamente contra la infección letal de VHS-2 intravaginal en ratones C57BL/6, con inmunidad esterilizante tanto en la mucosa genital como en los ganglios de la raíz dorsal. Esta composición puede expandirse tanto las células T CD4 como a las CD8 mediante infección previa con una cepa atenuada de VHS-2. Consecuentemente con esto, cuando se aplica como una terapia para lesiones de VHS-2 recurrentes en cerdos de guinea, esta composición puede reducir la frecuencia de las lesiones recurrentes.

Se proporcionan también kits. En algunos kits, hay un vial que comprende la composición farmacéutica que comprende una porción antigénica de una glicoproteína de envoltura de VHS-2 y un transportador aceptable farmacéuticamente.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-B presentan un dibujo de GLA (el adyuvante empleado en los Ejemplos) y un esquema de un ejemplo de gotas de aceite con tensioactivos de fosfatidilcolina y Pluronic F68.

La Figura 2 muestra respuestas de células T CD4 específicas para gD2. Los datos se obtuvieron después de que los ratones Balb/c (4/grupo) se inmunizaran dos veces i.m. (vía intramuscular) en un intervalo de 28 días con una vacuna bivalente que comprende diferentes niveles de proteína recombinante y GLA, como se indica. Las gráficas son los resultados de los análisis de citometría de flujo para la producción intracelular de IL-2, TNF- α , y IFN- γ .

La Figura 3 muestra respuestas de células T CD8 esplénicas para el péptido OVA257 (ovoalbúmina) analizadas en el día 25 (D25) después del cebado (D4 después del refuerzo); OVA recombinante = 5 μ g; SE = 2%; lentivirus suministrado s.c. (vía subcutánea); OVA recombinante suministrado i.m.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el porcentaje de células T CD8 positivas para citoquina medido 4 días después del refuerzo. El cebado tuvo lugar el día 0 y el refuerzo el día 21. Columna HA1, d0 HBSS, d21, PBS; HA2, d0, LV-OVA, d21, PBS; HA3, d0 LV-OVA, d21 LV-OVA; HA4, d0 LV-OVA, d21 20 μ g GLA-SE; HA5, d0 LV-OVA, d21 OVA + SE; HA6, d0 LV-OVA, d21 OVA + 20 μ g GLA-SE; HA7, d0 LV-OVA, d21, 4 μ g OVA+ GLA-SE; HA8, d0 LV-OVA, d21 OVA + 0,8 μ g GLA-SE.

Las Figuras 5A-B muestran los datos obtenidos después de inmunizar los grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) a través de un régimen de inmunización cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) bien con 5 μ g de proteína gD recombinante, UL19, o bien UL25 en combinación con 5 μ g de GLA-SE. Se midieron las respuestas de células T CD4 esplénicas en el día 4 después del refuerzo mediante tinción intracelular para IFN- γ , TNF- α , y IL-2 después de la re-estimulación ex vivo con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos CD4 para la proteína inmunogénica recombinante correspondiente. A) gráfica de puntos ICS (tinción de citoquina intracelular) representativa de la respuesta de células T CD4 para cada péptido de 15-mer expresada en ratones inmunizados con la correspondiente proteína inmunógena recombinante. B) se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquina para cada grupo.

Las Figuras 6 A-B muestran los datos obtenidos después de que un grupo de cinco ratones C57BL/6 se inmunizaran a través de un régimen de cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) con proteínas gD, UL19, y UL25 suministradas en combinación y formuladas sobre una base equimolar (0,8, 3,3, y 1,4 μ g de proteína, respectivamente) en combinación con 5,5 μ g de GLA-SE. Se midieron las respuestas de las células T CD4 esplénicas en el día 4 después del refuerzo mediante tinción intracelular para IFN- γ , TNF- α , y IL-12 después de la re-estimulación ex vivo con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos de células T CD4 para cada proteína inmunogénica recombinante correspondiente. Se incluyo como control negativo un péptido individual que carecía del epítomo de células T CD4 a partir de cada estudio del péptido. A) se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas para cada grupo. B) títulos séricos en el punto final (definido como la dilución sérica más alta recíproca que es 2 veces > que la de origen) para anticuerpos específicos al antígeno de subclase IgG1 para cada proteína inmunogénica recombinante en la vacuna trivalente.

Las Figuras 7 A-B muestran los datos obtenidos cuando los grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) se inmunizaron a través de un régimen de inmunización de cebado (d0) o de cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) con 5 μ g de proteína UL19 recombinante en combinación con 5 μ g de GLA-SE. Se midieron las respuestas de las células T CD4 esplénicas en el día 4 o en el día 10 después de la última inmunización mediante ICS para IFN- γ , TNF- α , y IL-12 después de la re-estimulación ex vivo con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos de células T CD4 para UL19. A) gráfica de puntos ICS representativa de la respuesta de células T CD4 para el péptido 297 de 15-mer de UL19 expresado en ratones inmunizados con la correspondiente proteína inmunogénica recombinante. Se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas para cada grupo. B) se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas que responden a UL19 250 ó 297 de 15-mer para cada grupo.

Las Figuras 8A-B muestran los datos obtenidos cuando se inmunizaron los grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) a través de un régimen de inmunización de cebado (d0) o de cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) con 5 µg de proteína UL19 recombinante en combinación con 5 µg de una proteína UL19 recombinante suministrada en solitario o en combinación con 5 µg de SE o de GLA-SE. Se midieron las respuestas de las células T CD4 esplénicas en el día 5 o en el día 10 después de la última inmunización mediante ICS para IFN-γ, TNF-α, y IL-12 después de la re-estimulación ex vivo con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos de células T CD4 para UL19. A) gráfica de puntos ICS representativa de la respuesta de células T CD4 para el péptido 297 de 15-mer UL19 expresada en ratones inmunizados con la correspondiente proteína inmunogénica recombinante. Se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas para cada grupo. B) se representa el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas que responden a UL19 250 ó 297 de 15-mer para cada grupo.

Las Figuras 9 A-C muestran los datos obtenidos cuando grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) se inmunizaron a través de un régimen de inmunización cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) con proteínas recombinantes formuladas bien sobre una base equimolar o equivalente en masa. El total de proteína suministrada fue bien de 5 µg o 15 µg. Se midieron las respuestas de las células T CD4 esplénicas en el día 5 después de la última inmunización mediante tinción intracelular para IFN-γ, TNF-α, y IL-12 después de la re-estimulación ex vivo con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos de células T CD4. A) Se indica el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas que responden a péptidos gD. B) Se indica el porcentaje de células T CD4 positivas a citoquinas que responden a péptidos UL25. C) Se representan el porcentaje de células T CD4 positivas que responden a péptidos UL25.

La Figura 10 muestra los datos obtenidos cuando los grupos de ratones BALB/c (5/grupo) se inmunizaron a través de un régimen de inmunización cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo) con 4 µg de proteína gD recombinante en combinación bien con 4 µg de GLA-SE, SE en solitario, o vehículo PBS, suministrados intramuscularmente en 100 µl (50 µl por pata). Se midieron mediante ELISA los anticuerpos VHS-2 específicos para gD2 de IgG, IgG1 e isótopos de IgG2a.

La Figura 11 muestra los datos obtenidos cuando a grupos de cinco ratones C57BL/6 se les proporcionó una inmunización intramuscular única de vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente de gD2 recombinante, UL19ud, y UL25 en combinación con 5 µg de GLA-SE o productos de vacuna control. Se midieron las respuestas celulares de células T CD4 y CD8 esplénicas específicas del antígeno en el día 6 después de la inmunización mediante tinción de citoquina intracelular (ICS, de sus siglas en inglés) para IFN-γ, TNF-α, y IL-2 después de la re-estimulación ex vivo de cultivos de esplenocitos durante 5 horas con péptidos gD2, UL19, o UL25. A) frecuencia y fenotipo de citoquinas de células T CD4 que responden a péptidos a partir de gD2, UL19ud, o UL25. B) frecuencia y fenotipo de citoquinas de células T CD8 que responden a péptidos UL19. C) frecuencia de células T CD8 que responden a péptidos UL19 en ratones que se inmunizaron 4 semanas antes con vacuna trivalente con GLA-SE y se administraron subcutáneamente con virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-).

La Figura 12 muestra los datos obtenidos cuando a grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, separadas mediante 28 días, de una vacuna bivalente que consiste en 5 µg de gD2 recombinante y UL19ud en combinación con bien 5 µg de GLA-SE o bien con un vehículo de 5% de dextrosa. Los ratones inmunizados sólo con 5 µg de GLA-SE sirvieron como controles negativos. 22 días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona depot y a continuación se sometió seis días después a una dosis de 50xLD₅₀ de VHS-2 de tipo salvaje vía intravaginal. Los ratones se monitorearon a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. En los días 1, 3, y 5 después de la infección, se recogieron muestras vaginales para la cuantificación del ADN de VHS-2 mediante PCR. Aproximadamente dos meses después de la infección, se recogieron los ganglios de la raíz dorsal de los ratones supervivientes y se cuantificó mediante PCR el ADN de VHS-2 latente. Como se muestra en la Figura 12, panel A, los ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE redujeron drásticamente la formación de lesiones e incrementaron la supervivencia en comparación con los ratones inmunizados bien sólo con gD2 y UL19ud o bien sólo con GLA-SE. Asimismo, como se representa en la Figura 12, panel B, en 9 de cada 10 ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE no se detectó ADN de VHS-2 el día 5, mientras que los ratones del grupo control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina a lo largo del día 5. Como se representa en la Figura 12, panel C, aunque había tres supervivientes en el grupo sólo con GLA-SE, 2 de estos 3 ratones mostraron niveles significativos de VHS-2 latente en los ganglios de la raíz dorsal, los ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE mostraron poco o ningún nivel detectable de VHS-2 en los ganglios.

La Figura 13 muestra los datos obtenidos cuando ratones C57BL/6 (5/grupo) se infectaron subcutáneamente con una dosis subletal de virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-), a continuación se inmunizaron 28 días después con una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente de gD2 recombinante, UL19ud, y UL25 en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de 5% de dextrosa. Los grupos control incluían ratones infectados tratados con GLA-SE en solitario o con vehículo en solitario, así como ratones sin tratamiento previo con vehículo en solitario. Seis días después de la inmunización, se midieron mediante ICS las respuestas de las células T CD8 (panel superior) y de las células T CD4 (panel inferior) específicas de UL19, después de la estimulación con péptidos UL19.

La Figura 14 muestra los datos obtenidos cuando cerdos de guinea (7/grupo) se infectaron intravaginalmente con una dosis subletal de la cepa 333 del virus VHS-2 y se trataron después en los días 13 y 27 tras la infección con una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente de gD2 recombinante, UL19ud, y UL25 en combinación con 5 µg de GLA-SE. Los cerdos de guinea infectados tratados con GLA-SE en solitario sirvieron como controles negativos. Los animales se monitorearon a diario para observar las lesiones vaginales y se asignaron puntuaciones de 0-4 para cada lesión diaria. Se tomaron las medias de las puntuaciones de las lesiones diarias y se trazaron frente al tiempo.

La Figura 15 muestra los datos obtenidos cuando a grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, separadas mediante 28 días, de una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente de gD2 recombinante, UL19ud (véase SEQ ID NO:12), y UL25 en combinación con bien 5 µg de GLA-SE o bien con un vehículo de 5% de dextrosa. Los ratones inmunizados con 5 µg GLA-SE en solitario sirvieron como controles negativos. Un grupo control adicional consistía en ratones inmunizados con 5 µg de GLA-SE y 1 miligramo por ml de aciclovir (ACV) en el agua de bebida comenzando 24 después del reto. Veintidós días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona depot y a continuación se sometieron seis días después a una dosis de 50xLD₅₀ de VHS-2 de tipo salvaje vía intravaginal. Los ratones se monitorearon a diario para observar la formación de lesiones genitales (panel A) y la supervivencia (panel B).

La Figura 16 muestra niveles de ADN de VHS-2 vaginal en ratones inmunizados con vacuna trivalente gD2, UL19ud (SEQ ID NO:12) y UL25 (véase la Figura 15 para la descripción de los grupos de ratones). Se recogieron muestras vaginales en los días 1, 3, y 5 después de la infección, para la cuantificación mediante PCR del ADN de VHS-2.

20 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas inmunogénicas y métodos para el tratamiento o para la prevención de infecciones por el virus del herpes simple, que incluyen infecciones por VHS-1 y VHS-2. Las composiciones comprenden proteínas virales VHS-2 inmunogénicas o porciones inmunogénicas de proteínas virales, tal como fragmentos o péptidos, y al menos un agente que activa el sistema inmunológico innato, preferiblemente un agonista TLR4, por ejemplo, un adyuvante MALA como se describe en la presente memoria. Las proteínas virales (y fragmentos y péptidos) comprenden al menos una glicoproteína de envoltura y al menos una, dos, tres o cuatro proteínas estructurales diferentes a una glicoproteína de envoltura. Alternativamente, las proteínas virales (y fragmentos y péptidos) comprenden al menos un epítipo antigénico y pueden comprender todo o parte de un péptido líder de una proteína de envoltura. Se pueden emplear fragmentos inmunogénicos. Algunos agentes específicos útiles en las composiciones incluyen adyuvantes, sustancias que mejoran la respuesta inmunológica a un antígeno. Las proteínas y fragmentos se producen normalmente mediante tecnología recombinante en la que la proteína o proteínas o el fragmento o fragmentos se expresan en células cultivadas. Los péptidos también se pueden sintetizar químicamente.

A. Proteína VHS-2 como un componente de una vacuna

El VHS-2 (virus herpes simple de tipo 2) es un virus de envoltura. Su genoma se expresa a lo largo de 75 proteínas diferentes. Muchas de las proteínas son estructurales y se emplean para formar la cápside y el tegumento, mientras que algunas otras son parte de la envoltura. Las principales proteínas de la cápside incluyen a las que se expresan a partir de marcos abiertos de lectura (los nombres de la proteína están entre paréntesis si el nombre común difiere del nombre ORF) de UL6, UL18 (VP23), UL19 (VP5), UL35 (VP26) y UL38; las proteínas principales del tegumento incluyen UL7, UL11, UL13, UL14, UL16, UL17, UL21, UL25, UL36, UL37, UL41, UL46 (VP11/12), UL47 (VP13/14), UL48 (VP16), UL49, UL51, y US11; las principales proteínas de envoltura incluyen UL1 (glicoproteína L (gL)), UL10 (gM), UL20, UL22 (gH), UL27 (gB), UL43, UL44 (gC), UL49A (gN), UL53 (gK), US4 (gG), US5 (gJ), US6 (gD), US7 (gI), y US8 (gE). (Se han empleado otros nombres de proteínas en la bibliografía). Ejemplos de secuencias de genomas de VHS-2 se encuentran en el GenBank N° de Acceso NC 001798.1 (fecha de actualización el 23 de Abril de 2010, 2:16 pm, accedido el 10 de Enero de 2011; incorporado en su totalidad). Se entiende que los nombres de la proteína empleada normalmente puede ser diferente de los nombres genéticos, por ejemplo, UL19 codifica VP5, pero en referencia al nombre genético en la presente memoria es el mismo que al referente a la proteína codificada. Se entiende que la secuencia exacta de una proteína puede variar de un herpesvirus a otro, y por tanto, todas las referencias a una proteína de VHS-2 (estructural o de envoltura o de no envoltura) engloba a cualquiera de tales proteínas obtenibles a partir de cualquier VHS-2 que aparezca de manera natural. Ya se conoce un número de secuencias y está depositado en la base de datos. El ácido nucleico que codifica la proteína de VHS-2 con una secuencia alternativa se puede leer aislado o amplificado a partir de una o más VHS-2 (por ejemplo, un aislado de VHS-2 depositado o un aislado clínico) con sondas o cebadores adecuados de oligonucleótidos (por ejemplo, que hibridan de manera específica para una secuencia de referencia bajo condiciones estrictas). Dentro de tal grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína VHS-2, por ejemplo, una proteína UL, un ácido nucleico del grupo se hibridará al complemento de otro ácido nucleico dentro del grupo, bajo condiciones estrictas.

El término "bajo condiciones estrictas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará preferentemente a su secuencia diana, y en menor grado, o en absoluto, a otras secuencias. "Hibridación estricta" y "condiciones de lavado de hibridación estricta" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico, tal como hibridaciones Southern u Northern son dependientes de la secuencia, y son diferentes bajo distintos

parámetros medioambientales. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridation with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 en “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier (Nueva York, 1993). En determinadas realizaciones, la hibridación muy estricta y las condiciones de lavado son de aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica en una fuerza iónica y pH determinados. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH determinados) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida a una sonda emparejada perfectamente. En determinadas realizaciones, las condiciones estrictas son iguales a la T_m para una sonda particular.

Un ejemplo de condiciones de hibridación estrictas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en un Southern o Northern blot es del 50% de formol con 1 mg de heparina a 42°C, con la hibridación llevándose a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy estrictas es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado estrictas es un lavado 0,2x SSC a 65°C durante 15 minutos (véase Sambrook et al. para la descripción del tampón SSC). Un lavado muy estricto puede precederse de un bajo lavado estricto para eliminar la señal de la sonda anterior. Un ejemplo de lavado de exigencia media para un duplicado de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es de SSC 1x a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de exigencia baja para un duplicado de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es de SSC 4-6x a 40°C durante 15 minutos. En general, una señal con un índice de ruido de 2x (o mayor) que el observado para una sonda independiente en el ensayo de hibridación particular, indica detección de una hibridación específica.

Debido a que en la entrada viral a las células del hospedador se implican una o más proteínas de envoltura, los anticuerpos para las proteínas de envoltura pueden neutralizar los virus, que previenen de la infección o re-infección por los virus. Sin desear que se lleve a cabo una teoría mecánica, provocar anticuerpos para una o más proteínas de envoltura necesarias para la entrada celular, es una forma de obtener anticuerpos neutralizantes. Las vacunas que comprenden virus enteros, normalmente virus inactivados, presentan de manera natural proteínas de envoltura para células inmunológicas. Para una vacuna que comprende proteínas virales individuales, una estrategia para obtener una respuesta al anticuerpo neutralizante es incluir en una vacuna una o más proteínas de envoltura o fragmentos de proteínas inmunogénicas o péptidos inmunogénicos o alguna combinación de éstos.

El VHS-2 codifica 14 o más proteínas asociadas a la envoltura, estando al menos alguna de ellas implicada con la entrada celular, que incluyen pero no se limitan a gB, gD, gH, y gL. gD parece unirse de forma específica a un receptor VHS-2 en las células, y gB, junto con el heterodímero gH/gL, parece mediar la fusión de la membrana. Por tanto, estas cuatro glicoproteínas de envoltura son elecciones excelentes como inmunógenos para la inclusión en una vacuna ya que los anticuerpos obtenidos para estas glicoproteínas de envoltura pueden incluir anticuerpos neutralizantes. Alternativamente, o en adición, las glicoproteínas de envolturas implicadas en la propagación del virus son también candidatos como inmunógenos para la inclusión en una vacuna.

La mayoría de las proteínas estructurales del VHS-2 distintas a las proteínas de envoltura se encuentran en la cápside y en el tegumento. El tegumento ocupa el espacio entre la cápside y la envoltura. Existen aproximadamente 20 proteínas virales que se encuentran en el tegumento. Las proteínas del tegumento son importantes para una variedad de funciones virales, que incluyen la modulación inmunológica, el ensamble viral y la salida final. Las proteínas de la cápside forman una estructura que rodea el ácido nucleico genómico del virión. VP5, el producto de UL19 es la principal proteína de la cápside. A menudo una respuesta celular se produce para proteínas estructurales y para una variedad de proteínas de VHS (Hosken et al., J Virol 80:5509-5515, 2006). Generalmente, la respuesta celular implica tanto a las células T CD4 como a las CD8, tipos celulares que juegan un papel en la lucha frente a infecciones por VHS.

La composición farmacéutica inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) descrita en la presente memoria comprende como inmunógenos dos o más proteínas estructurales, una de las cuales es una glicoproteína de envoltura y otra de ellas es distinta a una glicoproteína de envoltura. Aunque se puede emplear cualquiera de las proteínas estructurales, la elección se debe dirigir por la facilidad de la producción, capacidad para formularse en una composición farmacéutica, información sobre la estructura proteica, y altos niveles de expresión. Debido a que las respuestas de células T se restringen normalmente por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés), una vacuna contiene generalmente proteínas o péptidos que responden a el mayor número de tipos de MHC, y pueden contener también múltiples proteínas o péptidos para incrementar el número de individuos que responderán.

Las composiciones farmacéuticas inmunogénicas son preferiblemente estériles, libres o libres sustancialmente de otros contaminantes virales, y libres o libres sustancialmente de sustancias pirogénicas tales como LPS. Tales composiciones son para usar como vacunas.

Las proteínas estructurales de envoltura y de no envoltura para usar en una vacuna como inmunógenos son normalmente de extensión completa, pero puede ser también una proteína precursora, fragmento, o parte de una proteína de fusión. Una proteína de extensión completa se refiere a una proteína madura; por ejemplo, en el caso de una proteína de envoltura, una proteína madura es la forma de encontrarse en la envoltura (por ejemplo, que carece de un péptido líder). Una proteína precursora (pre-proteína) es la proteína emergente, traducida antes de que ocurra

cualquier proceso, o una proteína procesada parcialmente. Como parte de una proteína de fusión, la proteína de VHS-2 puede presentarse como un precursor o proteína de longitud completa o como un fragmento proteico. Un fragmento de una proteína deberá ser inmunogénico, que contenga uno o más epítopos que provoquen una respuesta inmunológica.

- 5 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) descrita en la presente memoria comprende como inmunógenos (i) un producto genético de VHS-2 del grupo α , o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (ii) un producto genético de VHS-2 del grupo β_1 , o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (iii) un producto genético de VHS-2 del grupo β_2 , o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (iv) un producto genético de VHS-2 del grupo γ_1 , o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (v) un producto genético de VHS-2 del grupo γ_2 , o un fragmento inmunológico del mismo. Los genes α , β_1 , β_2 , γ_1 , y γ_2 son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Herpesviruses and Their Replication* in FUNDAMENTAL VIROLOGY, Capítulo 29, 1986.

15 Por tanto, cualquier uso del término "inmunógeno" en la presente memoria se refiere a un grupo entero de polipéptidos que son: (1) antígeno de longitud completa, (2) fragmentos inmunogénicos del antígeno, (3) variantes inmunogénicas del antígeno de longitud completa o variantes de un fragmento inmunogénico, (4) fusiones quiméricas de los mismos que comprenden porciones de un polipéptido diferente, y (5) conjugados de los mismos. En varias realizaciones, las proteínas estructurales de envoltura y de no envoltura para usar en una vacuna incluyen a un polipéptido que comprende cualquier fragmento inmunogénico de los mismos o una variante de los mismos capaz de inducir una respuesta inmunológica específica para la proteína.

20 Por ejemplo, las variantes inmunogénicas retienen al menos el 90% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 10 aminoácidos contiguos del antígeno, o al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 15 aminoácidos contiguos del antígeno (por ejemplo una proteína de envoltura o una proteína estructural de no envoltura). Otros ejemplos incluyen al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad sobre al menos 50 aminoácidos contiguos del antígeno, o sobre al menos 100 aminoácidos contiguos del antígeno. En una realización, una variante inmunogénica tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad sobre la extensión completa de un antígeno particular. En algunas realizaciones, la variante es una variante que aparece de manera natural.

30 Como otro ejemplo, los fragmentos inmunogénicos, y variantes de los mismos, comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos contiguos del antígeno. El fragmento inmunogénico puede comprender cualquier número de aminoácidos contiguos entre los anteriormente mencionados tal que, por ejemplo, un fragmento inmunogénico está entre aproximadamente 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, o más aminoácidos contiguos de un polipéptido inmunogénico.

35 Fragmentos cortos, a menudo llamados péptidos, se eligen para acomplejarse con moléculas MHC para unirse a los receptores de células T y son generalmente de hasta aproximadamente 30 aminoácidos de largos, o hasta aproximadamente 25 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 20 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 15 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 12 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 9 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 8 aminoácidos de largo. En general, los péptidos más cortos se unen o asocian con moléculas MHC de Clase I, y los péptidos mayores se unen o asocian con moléculas MHC de Clase II. Los péptidos adecuados se pueden predecir empleando cualquiera de los programas bioinformáticos y se pueden ensayar empleando métodos bien conocidos. Los fragmentos cortos, también llamados en la presente memoria "péptidos" son normalmente de 15-100 aminoácidos de largo; los fragmentos más largos son normalmente de 100 aminoácidos hasta aminoácidos de extensión completa, si bien los intervalos de longitud para los péptidos (fragmentos cortos) y fragmentos más largos, no son rígidos.

45 Como se divulga en la presente memoria, las proteínas adecuadas incluyen a proteínas precursoras, proteínas maduras, fragmentos, proteínas de fusión y péptidos. En las composiciones, las proteínas se pueden presentar en la misma forma o como una mezcla de estas formas. Por ejemplo, una glicoproteína de envoltura se puede presentar como una proteína madura y una proteína estructural como un fragmento o una glicoproteína de envoltura se puede se presentar como un fragmento y una proteína estructural como un fragmento. Para la producción celular de la glicoproteína, un péptido señal puede ser parte de la proteína precursora. Los péptidos señal incluyen la secuencia de glicoproteína D nativa u otras conocidas en la técnica. También es deseable usar una proteína sin una región transmembrana o intracelular o sin ambas.

55 Como se discute en la presente memoria, una o más porciones de una glicoproteína de envoltura, también llamadas fragmentos, se eligen por contener uno o más epítopos que se unen a anticuerpos neutralizantes. Las porciones que contienen epítopos se pueden identificar mediante un ensayo, tal como la inhibición de anticuerpos neutralizantes en la infección viral de células. En resumen, las porciones de solapamiento de la glicoproteína de envoltura del VHS-2 se mezclan con los anticuerpos neutralizantes (por ejemplo, suero a partir del animal o ser humano infectado), y la mezcla se añade a VHS-2 y a una línea celular tolerante. Si una porción tienen un epítipo que se une a anticuerpos, la línea celular se infectará con VHS-2. Si la porción no tienen un epítipo, la línea celular no se infectará.

Las composiciones que comprenden al menos un fragmento inmunogénico de un polipéptido VHS-2 inmunogénico se pueden usar como inmunógenos. En algunas realizaciones, el fragmento inmunogénico se codifica mediante vectores de expresión recombinante descritos en la presente memoria. El fragmento inmunogénico puede consistir en al menos 6, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más aminoácidos contiguos de un polipéptido inmunogénico. El fragmento inmunogénico puede comprender cualquier número de aminoácidos contiguos entre los anteriormente mencionados, tal que, por ejemplo, un fragmento inmunogénico está entre aproximadamente 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, o más aminoácidos contiguos de un polipéptido inmunogénico. Los fragmentos inmunogénicos pueden comprender de un número suficiente de aminoácidos contiguos que formen un epítipo lineal y/o pueden comprender de un número suficiente de aminoácidos contiguos que permitan al fragmento plegarse en la misma (o suficientemente similar) conformación tri-dimensional que el polipéptido de extensión completa del que se deriva el fragmento, para presentar un epítipo o epítipos no lineales (también referidos en la técnica como epítipos conformacionales). Los ensayos para ensayar si el fragmento inmunogénico se pliega en una conformación comparable a la del polipéptido de extensión completa incluyen, por ejemplo, la capacidad de la proteína para reaccionar con anticuerpos mono- o policlonales que son específicos de epítipos nativos o desplegados, la retención de otras funciones de unión al ligando, y la sensibilidad o resistencia del fragmento polipeptídico para la digestión con proteasas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición., Cold. Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)). Por consiguiente, a modo de ejemplo, la conformación tri-dimensional de un fragmento de polipéptido es suficientemente similar al del polipéptido de extensión completa cuando la capacidad de unirse y el nivel de unión de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de extensión completa es sustancialmente la misma para el fragmento que para el polipéptido de extensión completa (es decir, el nivel de unión se ha mantenido hasta un grado suficiente estadística, clínica y/o biológicamente en comparación con la inmunogenicidad del antígeno de ejemplo o de tipo salvaje de extensión completa).

Los fragmentos que se evaluaron en un ensayo, tal como los que se describen anteriormente, son generalmente cortos. En general, la extensión de un fragmento candidato es hasta aproximadamente 40 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 25 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 20 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 15 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 12 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 9 aminoácidos de largo, o hasta aproximadamente 8 aminoácidos de largo. Los fragmentos que se usan para el cribado son normalmente de solapamiento. Por ejemplo, un conjunto de fragmentos podría comprender fragmentos de 20 aminoácidos de longitud que se solapan por 16 aminoácidos (es decir, escalonados cada 4 aminoácidos). Normalmente, los conjuntos de solapamiento comienzan en el N-terminal de una glicoproteína sin procesar, es decir, contiene una secuencia líder, y termina en el aminoácido C-terminal del dominio extracelular.

Los fragmentos que se unen al anticuerpo neutralizante se escogen y se pueden usar en una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria. Los fragmentos se pueden usar "tal como están" o con un diseño adicional o en combinación con otros fragmentos. Los fragmentos que son demasiado grandes y demasiado complejos para ser inmunogénicos, se pueden emplear en composiciones farmacéuticas. Fragmentos menores de aproximadamente 100 MW son probablemente no inmunogénicos, si bien la complejidad puede jugar también un papel en si un fragmento es inmunogénico. Por ejemplo, los homopolímeros que consisten en unidades repetidas de un único aminoácido son malos inmunógenos independientemente de su tamaño, mientras que los co-polímeros de 2 ó 3 aminoácidos pueden ser buenos inmunógenos. Un co-polímero de ácido glutámico y lisina necesita al menos tener aproximadamente 30-40.000 MW para ser inmunogénico. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas incrementan la inmunogenicidad, tal que un fragmento de sólo aproximadamente 4000 MW que comprende tirosina y fenilalanina puede ser inmunogénico. Los fragmentos que son demasiado cortos o no lo suficientemente complejos para ser inmunogénicos se pueden conjugar a una proteína transportadora, tal como KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura), ovoalbúmina, albúmina de suero bovino, u otra proteína que es extraña para el sujeto que recibe la composición farmacéutica, o los fragmentos se pueden acoplar juntos para crear una proteína inmunogénica. En un animal se puede determinar si un fragmento es o no inmunogénico. Por ejemplo, el fragmento se puede administrar a un animal en un régimen de cebado-refuerzo, y evaluar, por ejemplo, mediante ELISA, los anticuerpos para el fragmento empleando el suero extraído 7-10 días después del refuerzo. Una señal detectable indica que el fragmento es inmunogénico. Son deseables señales altas. Otros ensayos para la inmunogenicidad son bien conocidos por un experto ordinario.

En algunas realizaciones, los fragmentos usados en la composición son péptidos largos sintéticos. "Péptido largo sintético" (SLP) se refiere a una secuencia proteica producida ex vivo que tiene una longitud tan corta como de aproximadamente 25 aminoácidos y tan larga como de aproximadamente 100 aminoácidos. Un SLP debe ser lo suficientemente largo como para ser tomado y procesado por las células dendríticas durante la presentación de su superficie celular con las moléculas MHC de clase I o de clase II. Los SLPs son péptidos derivados de proteínas contra las que se desea una respuesta inmunológica. En una realización, la respuesta inmunológica es una respuesta de células T. Las proteínas pueden ser antígenos conocidos o, en el caso de algunas proteínas, pueden ser antígenos candidatos.

Un SLP comprende al menos un epítipo CD4 o al menos un epítipo CD8 o al menos un epítipo CD4 o al menos un epítipo CD8. Un epítipo CD4 se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une a un MHC de clase II y un epítipo CD8 se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une a un MHC de clase I. Las secuencias del epítipo se derivan de la secuencia de aminoácidos de un inmunógeno; in vivo, en resumen, el inmunógeno se toma

o sintetiza mediante las células que procesan el antígeno (por ejemplo, células dendríticas) y se degradan en péptidos, que se asocian con moléculas MHC y se presentan sobre la superficie celular como un complejo MHC-péptido. Los péptidos acomplejados con las moléculas MHC de clase I interactúan con el receptor del antígeno de células T y el CD8 en las células T CD8+, estos péptidos se denominan epítomos CD8; los péptidos acomplejados con las moléculas MHC de clase II interactúan con el receptor del antígeno de células T y el CD4 en las células T CD4+, estos péptidos se denominan epítomos CD4. Las células T CD8+ activadas se vuelven células T citotóxicas, las cuales reconocen y matan a las células diana mostrando a los epítomos CD8-MHC de clase I. A menudo, las células diana se infectan o son células tumorales. Las células T CD4+ activadas se vuelven células T helper, y dependiendo de su subtipo, las células B helper producen anticuerpos o activan a células natural killer, fagocitos y células T CD8+. La activación de ambas células T CD4+ y células T CD8+ contribuye a una respuesta inmunológica celular global.

Como se divulga anteriormente, un SLP debe ser lo suficientemente largo como para ser tomado y procesado por células dendríticas y presentarse en su superficie celular con moléculas MHC. Los péptidos acomplejados con moléculas MHC de clase I son generalmente de 8-11 aminoácidos de longitud, y los péptidos acomplejados con moléculas MHC de clase II son generalmente de 13-17 aminoácidos de longitud, aunque son comunes longitudes mayores o menores. Como tal, un SLP tendrá normalmente al menos 25 aminoácidos de longitud y hasta 100 aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 30 aa, al menos 35 aa, al menos 40 aa, al menos 45 aa, al menos 50 aa, al menos 55 aa, al menos 60, al menos 65 aa, al menos 70 aa, al menos 75 aa, al menos 80 aa, al menos 85 aa, al menos 90 aa, al menos 95 aa). La longitud de un SLP tendrá generalmente aproximadamente 45 aa o aproximadamente 50 aa de longitud.

Los epítomos pueden ser secuencias conocidas o secuencias desconocidas. Se ha mapeado una multitud de proteínas para los epítomos CD4 y CD8. Para los SLPs, que comprenden uno o más de estos epítomos, la longitud será normalmente de aproximadamente 45 aa. Por otra parte, el epítomo puede estar flanqueado por aproximadamente 15 aa en los laterales del N-terminal y del C-terminal. Las secuencias que flanquean son normalmente las secuencias que flanquean la secuencia del epítomo en la proteína nativa. Como se discutió anteriormente, un SLP puede comprender más de un epítomo, los epítomos múltiples pueden ser todos epítomos CD4 o CD8 o una mezcla de epítomos CD4 y CD8. Además, los epítomos se pueden solapar en la secuencia (Véase el Ejemplo 1 para algunos ejemplos de SLPs que comprenden epítomos de solapamiento). El número total de SLPs empleado puede ser tal que se representen todos los epítomos CD4 y CD8 conocidos.

Los SLPs se pueden sintetizar mediante una variedad de métodos (véase Corradin et al., *Sci Translational Med* 2:1, 2010 para una discusión general de los métodos de síntesis). Están disponibles comercialmente sintetizadores de péptidos automatizados, y muchas compañías proporcionan servicios de síntesis (por ejemplo, Abbiotec, American Peptide Company, AnaSpec, Bachem, Covance Research Products, Invitrogen). Tras la síntesis, los péptidos se purifican, normalmente mediante HPLC, aunque se pueden emplear métodos de purificación de alternativos, tal como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de filtración en gel. Una pureza aceptable es de al menos el 90% o al menos el 95% o al menos el 98% como se ensaya mediante HPLC analítico.

Cuando una proteína no se ha mapeado para los epítomos CD4 o los epítomos CD8 o ambos, se puede sintetizar la secuencia proteica completa que comprende el conjunto de SLPs. Normalmente cada SLP tendrá aproximadamente 50 aa, y los SLPs consecutivos se pueden solapar en la secuencia mediante aproximadamente 25 aa. Alternativamente, o además de, se pueden emplear algoritmos y programas informáticos para predecir secuencias que se unirán a moléculas MHC de clase I o de clase II. Tales programas están disponibles fácilmente, por ejemplo, RANKPEP (Reche et al., *Human Immunol* 63:701, 2002), EpiPredict (Jung et al., *Biologicals* 29: 179, 2001) y MHCpred (Guan et al. *Nucl Acids Res* 31:3621, 2003 y Guan et al., *Appl Bioinformatics* 5:55, 2006), EpiMatrix (EpiVax, Inc.).

La secuencia de un SLP se puede ajustar lo necesario para una producción óptima. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de los extremos de un péptido derivado de una secuencia nativa se pueden omitir para mejorar la solubilidad o la estabilidad, o para incrementar o disminuir la carga global. Como un ejemplo específico, una secuencia peptídica con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos puede ser difícil de solubilizar. Como referencia, el contenido hidrofóbico ideal es menor del 50%. Los péptidos que contienen restos de cisteína, metionina, o triptófano, especialmente restos múltiples de Cys, Met, o Trp, pueden ser difíciles de sintetizar. La sustitución de otro aminoácido, bien un aminoácido estándar o no estándar, tal como hidroxiprolina, ácido gamma-aminobutírico, norleucina puede mejorar la eficacia o pureza de la síntesis. Otras consideraciones en el diseño de un SLP incluyen prolongar la formación de la lámina- β , del aminoácido N-terminal (por ejemplo, se puede ciclar un Gln N-terminal), minimizando los restos de Ser y Pro adyacentes.

Algunas proteínas estructurales que son especialmente útiles para la inclusión en una composición farmacéutica incluyen UL19 (SEQ ID NO:4), Fragmento de Dominio Superior UL19 (SEQ ID NO:12), UL25 (SEQ ID NO:5) y UL47 (SEQ ID NO:6). La estructura de proteínas virales se puede encontrar en MMDB (Molecular Modeling Database) de NCBI. Está disponible información estructural molecular para UL25 (MMDB ID: 37706, Bowman et al. *J. Virol.* 80:2309, 2006, incorporado en su totalidad), VP5 (producto de UL19) (MMDB ID: 26005, Bowman et al., *EMBO J.* 22: 757-765, 2003, incorporado en su totalidad), VP13/14 (producto de UL47) (MMDB ID: 6022), y la proteína de envoltura gD2 (MMDB ID:36244, Krummenacher et al. *EMBO J* 24:4144-4153, 2005, incorporado en su totalidad),

ICP34.5, así como cualquier otra proteína VHS-2. Además, son conocidos algunos epítomos de células T de proteínas virales (Koelle et al., J. Virol 74:10930-10938, 200; Muller et al., J Gen Virol 90:1153-1163, 2009; Koelle et al., J Immunol 166:4049-4058, 2001; BenMohamed et al., J Virol 77:9463-9473, 2003; U.S. Pat. N° 6.855.317; P.C.T. Pub. N° WO 2004/009021).

5 Se contemplan específicamente para el uso en las composiciones inmunogénicas de la presente memoria fragmentos inmunogénicos, variantes y proteínas de fusión de cualquiera de estas proteínas, especialmente UL19, Fragmento del Dominio Superior UL19, UL25 y UL47. Por tanto, la divulgación incluye fragmentos o variantes de cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, ó 12 que retengan al menos el 90% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 10 aminoácidos contiguos de la misma, o al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 15 aminoácidos contiguos de la misma. Como otro ejemplo, la divulgación incluye fragmentos inmunogénicos que comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos contiguos de la secuencia, o entre aproximadamente 6-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, o más aminoácidos contiguos de la secuencia. La divulgación contiene también variantes que tienen al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la identidad sobre al menos 50 aminoácidos contiguos de la secuencia, o sobre al menos 100 aminoácidos contiguos de la secuencia. En algunas realizaciones, la variante aparece de manera natural, preferiblemente una que hibrida bajo estrictas condiciones para un polinucleótido que codifica cualquier SEQ ID NO:4, 5, 6 ó 12.

20 Como se divulga en la presente memoria, los fragmentos inmunogénicos, incluyendo péptidos, de una proteína estructural de no envoltura (por ejemplo, péptidos UL19 como se establecen en SEQ ID NOS: 9 y 10 y péptidos UL25 como se establecen en SEQ ID NO:11) y de una proteína de envoltura (por ejemplo, gD2 SEQ ID NOS 7 y 8) se pueden emplear o pueden ser parte de una secuencia mayor (es decir, fragmento) derivado de la proteína. Péptidos, como se emplea en la presente memoria, se refiere a secuencias cortas de aminoácidos, generalmente de al menos 15 restos y generalmente a aproximadamente 100 restos, o de aproximadamente 20 restos a aproximadamente 80 restos, o de aproximadamente 30 restos a aproximadamente 70 restos. Fragmentos, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un polipéptido de cualquier longitud menor a la proteína completa y es generalmente de al menos 100 aminoácidos de largo, aunque el intervalo del tamaño de los fragmentos se puede solapar con el intervalo del tamaño de los péptidos (por ejemplo, fragmentos de aproximadamente 50 restos de longitud). En particular, un Fragmento de Dominio Superior UL19 desaparece en al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o todos los restos de 1-450 y los restos 1055-1374 de UL19. Como tal, el Fragmento de Dominio Superior puede comenzar, por ejemplo, en cualquiera de los restos 337-451, y terminar en cualquiera de los restos 1055-1294 (y carece de al menos de los aminoácidos 1-336 y 1295-1374 de SEQ ID NO:4). Por ejemplo, un fragmento de UL19 puede ser de aproximadamente 451 restos a aproximadamente 1054 (SEQ ID NO:12). Un Fragmento de Dominio Superior UL19 puede comprender aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, ó 500 aminoácidos o más de SEQ ID NO:12. Además, los péptidos y fragmentos de la presente memoria se pueden fusionar a péptidos heterólogos. Ejemplos de péptidos heterólogos incluyen secuencias de otras proteínas (por ejemplo, en el caso del UL19, un Fragmento de Dominio Superior UL19 se puede fusionar a una secuencia a partir de otra proteína que no es UL19), o secuencias marcadoras, tales como hexa-histidina, que generalmente se localizarán bien en el N-terminal o bien en el C-terminal. Por tanto, los fragmentos inmunogénicos o variantes descritos en la presente memoria se pueden fusionar a otro péptido que mejora la inmunogenicidad, otro péptido que sirve como un indicador o marcador, u otro péptido a partir de otra proteína estructural de VHS-2. Como tal, un polipéptido inmunogénico puede comprender un fragmento que consiste en un fragmento determinado de una proteína estructural de VHS-2. En un ejemplo, un polipéptido inmunogénico comprende un fragmento de UL19 que consiste en SEQ ID NO:12 o un fragmento de SEQ ID NO:12, fusionado opcionalmente a un péptido que no es UL19. En otro ejemplo, un polipéptido inmunogénico comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% o 90% idéntico sobre 50 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:12, fusionado opcionalmente a un péptido que no es UL19.

50 Sorprendentemente, los ejemplos de la presente memoria muestran que un Fragmento de Dominio Superior UL19 tiene la capacidad de obtener anticuerpos protectores frente a la infección por VHS-2, tal que el resto de la proteína UL19 no se necesita como inmunógeno. Este sorprendente descubrimiento fue fortuito como intento por expresar que el UL19 de longitud completa había resultado complejo. Por ejemplo, la expresión de UL19 de longitud completa en *E. coli* y otros sistemas de expresión, y la posterior purificación de UL19 de longitud completa soluble, resultó ser difícil.

55 Normalmente las proteínas en una composición farmacéutica serán diferentes a una proteína precursora ya que la expresión en una célula eucariota dará normalmente como resultado una proteína, que carece de la secuencia líder (también conocida como péptido señal). La secuencia líder de gD2 abarca aproximadamente de 1-25 restos. La secuencia líder de gB abarca aproximadamente de 1-22 restos. La glicoproteína D (SEQ ID NO:2) es una proteína de 393 aminoácidos y tienen una región extracelular que se extiende aproximadamente de 26-340 restos, una región transmembrana que se extiende aproximadamente de 341-361 aminoácidos y una región citoplasmática que se extiende aproximadamente de 362-393 restos, y un número de sitios de glicosilación unidos por N en los restos 119, 146, 287 (UniProtKB/Swiss-Prot número de acceso Q69467, versión 49 de entrada y versión 1 de secuencia). Un ejemplo de un fragmento gD (en la presente memoria referido alternativamente como gD2) comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, los fragmentos inmunogénicos y antigénicos a partir de glicoproteínas de envoltura pueden comprender toda o parte de una secuencia líder, que a veces se denomina péptido señal. Normalmente la secuencia líder es de aproximadamente 15-20 aminoácidos, y en procesos celulares normales, se puede escindir mediante aparatos celulares, sin embargo, alguna de las proteínas en virus intactos pueden tener la secuencia líder.

5 Las secuencias líderes generalmente tienen algunos aminoácidos polares en el N-terminal y los aminoácidos internos son normalmente hidrofóbicos. Como se discutió anteriormente, se han determinado las secuencias líder para algunas glicoproteínas de envoltura de VHS-2. Para otras glicoproteínas de envoltura de VHS-2, se han empleado programas informáticos para predecir el péptido señal. Algunos de estos programas incluyen el SIG-Pred (bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/signal.html), PrediSi (www.predisi.de), OCTOPUS (octopus.cbr.su.se) y sigcleave (embosss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/sigcleave.html).

Se puede emplear una variedad de técnicas para inhibir la separación del péptido señal durante la producción celular de un fragmento antigénico o inmunogénico que contiene la secuencia líder para usar en las composiciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden alterar uno o más aminoácidos que flanquean el lugar de separación a un aminoácido diferente, dando como resultado una secuencia que no se reconoce o se separa por el aparato celular. Para este método, se han diseñado alteraciones en base a los sitios de separación conocidos en la técnica: preferiblemente no se emplea glicina en ninguna de las posiciones, tirosina, rara vez se encuentra en las primeras cinco posiciones después de los sitios de separación, mientras que prolina se encuentra a menudo en muchas posiciones de separación excepto en la posición +1, y glutamina se encuentra normalmente en el resto +1 (Zhang y Henzel, *Protein Sci.* 13: 219, 2004). La secuencia propuesta se puede evaluar con un programa de predicción para determinar si es posible inhibir la separación. Si la separación es factible, se realizan a continuación alteraciones adicionales y se re-evalúa la nueva secuencia propuesta. Otras técnicas para inhibir la separación de un péptido señal incluye la adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de reconocimiento y separación, la adición en el N-terminal de un péptido señal y una secuencia de reconocimiento, tal que el péptido señal añadido se separa preferiblemente, y la producción en una célula huésped carece de la maquinaria para separar el péptido señal.

En determinadas realizaciones, un fragmento comprende una glicoproteína de VHS-2, incluyendo la secuencia líder. En otras realizaciones, un fragmento comprende una porción de una glicoproteína de VHS-2 que incluye la secuencia líder al comienzo del dominio transmembrana. En otras realizaciones, un fragmento comprende una porción de una glicoproteína de VHS-2 que incluye la secuencia líder al final del dominio extracelular. En otras realizaciones, un fragmento comprende porciones no contiguas de una glicoproteína de VHS-2, en la que una de las porciones comprende un epítipo antigénico en la secuencia líder. En otras realizaciones, un fragmento comprende porciones no contiguas de una glicoproteína de VHS-2, en la que las porciones comprenden un epítipo o comprende porciones de diferentes glicoproteínas de VHS-2, en las que las porciones comprenden un epítipo.

La glicoproteína B (SEQ ID NO:1) tiene una región extracelular que se extiende aproximadamente 23-771 restos, una región transmembrana que se extiende aproximadamente 772-792 restos y una región citoplasmática que se extiende aproximadamente 793-904 restos, y un número de sitios de glicosilación unidos por N en los restos 82, 136, 393, 425, 486, 671 (UniProtKB/Swiss-Prot número de acceso P08666, versión 60 de entrada y versión 2 de secuencia). La glicoproteína K es una proteína de 338 aminoácidos con 30 aminoácidos de secuencia líder en su extremo N-terminal (Ramaswamy y Holland, *Virology* 186:579-587, 1992). La glicoproteína C tiene una secuencia líder determinada de 27 aminoácidos, la glicoproteína E tiene una secuencia líder determinada de 23 aminoácidos, y la glicoproteína L tiene una secuencia líder determinada de 16 aminoácidos (Signal Peptide Resource, proline.bic.nus.edu.sg, acceso 06 Octubre 2011).

Las proteínas o fragmentos de proteínas son preferiblemente inmunogénicos. Un "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica. Secuencias peptídicas inmunogénicas se reconocen generalmente por células T (por ejemplo, células T CD4 o CD8) en al menos algunos sujetos seropositivos. Las secuencias peptídicas se pueden identificar mediante el cribado de péptidos derivados de la secuencia completa, generalmente empleando una serie de péptidos de solapamiento. Se puede emplear una variedad de ensayos para determinar si las células T reconocen y responden a un péptido. Por ejemplo, entre los ensayos adecuados está el ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo (Kim et al., *J Immunol* 181:6604-6615, 2008, incorporado para su protocolo de ensayo), el ensayo ELISPOT, la tinción de citoquinas intracelulares y la tinción multímera MHC (Novak et al. *J Clin Invest* 104:R63-R67, 1999; Altmal et al., *Science* 274:94-96, 1996). En algunos casos el fragmento o fragmentos comprenden secuencias peptídicas inmunodominantes. Se han identificado para las glicoproteínas de VHS-2 y proteínas estructurales algunos epítopos inmunodominantes (por ejemplo, Kim et al. *J Immunol* 181:6604-6615, 2008; Chentoufi et al., *J Virol.* 82:11792-11802; Koelle et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 100: 12899-12904, 2003). Los péptidos inmunogénicos se pueden predecir también mediante un programa bioinformático (Flower, *Methods in Molecular Biology* vol. 409, 2007). Algunos ejemplos de programas y bases de datos incluyen FRED (Feldhahn et al. *Bioinformatics* 15:2758-9, 2009), SVMHC (Dönnies y Kohlbacher, *Nucleic Acids Res* 34:W1940197, 2006). Antígeno DB (Ansari et al., *Nucleic Acids* 38:D847-853, 2010), TEPITOPE (Bian and Hammer *Methods* 34:468-475, 2004).

Se pueden incorporar como parte de una proteína de fusión cualquiera de las proteínas de VHS-2, incluyendo proteínas precursoras, proteínas maduras y fragmentos, incluyendo péptidos. La fusión asociada o asociadas puede ser de cualquier proteína de VHS-2 o una secuencia de proteína de VHS-2. Algunas razones comunes para emplear proteínas de fusión son la de mejorar la expresión o ayudar en la purificación de la proteína resultante. Por ejemplo,

una secuencia de un péptido señal adaptado para un sistema de expresión de una célula huésped se puede unir a una proteína de VHS-2 o a una secuencia marcadora para usar en la purificación proteica, y posteriormente separarla si se incorpora también una secuencia de separación. Se pueden fusionar epítopos de múltiples péptidos a partir de una o más proteínas o se pueden fusionar fragmentos de una o más proteínas. Por ejemplo, se pueden unir proteínas estructurales o fragmentos de proteínas estructurales, tal como una proteína de fusión de VP13/14 (UL47) y una proteína de cápside principal (UL19) o UL25 y UL47 o UL25 y UL19. Los segmentos de una proteína de fusión pueden estar en cualquier orden, esto es, para una fusión de UL19 y UL47, cada proteína puede estar en el N-terminal. De forma similar, los múltiples epítopos peptídicos pueden estar en cualquier orden.

La producción de proteínas de VHS-2, incluyendo a las proteínas precursoras, fragmentos, y proteínas de fusión, se logra generalmente mediante la expresión en células cultivadas o mediante síntesis química. ("Proteínas de VHS-2" se emplea en la presente memoria para incluir todas estas formas). Los fragmentos cortos se sintetizan normalmente de forma química, bien empleando una máquina (muchas están disponibles comercialmente) o bien de forma manual. Si se producen mediante células, se conoce y se puede emplear una variedad de sistemas de expresión adecuados tanto para sistemas procariontes como eucariontes. Células hospedadoras que se emplean a menudo para la producción adecuada de proteínas incluyen a *E. coli*, levaduras, insectos, y mamíferos. Los vectores de expresión y las células hospedadoras están disponibles comercialmente (por ejemplo, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EE.UU.) o se pueden construir. Un ejemplo de vector comprende un promotor y un sitio de clonación para la secuencia que codifica una proteína de interés tal que el promotor y la secuencia se unen de manera operativa. Se pueden presentar otros elementos, tal como una secuencia señal de secreción (a veces llamada una secuencia líder), una secuencia marcadora (por ejemplo, hexa-His), una señal de terminación de la transcripción, un origen de replicación, específicamente si el vector se replica extra-cromosómicamente, y una secuencia que codifica un producto seleccionable. Métodos y procedimientos para la transfección de células hospedadoras son bien conocidos.

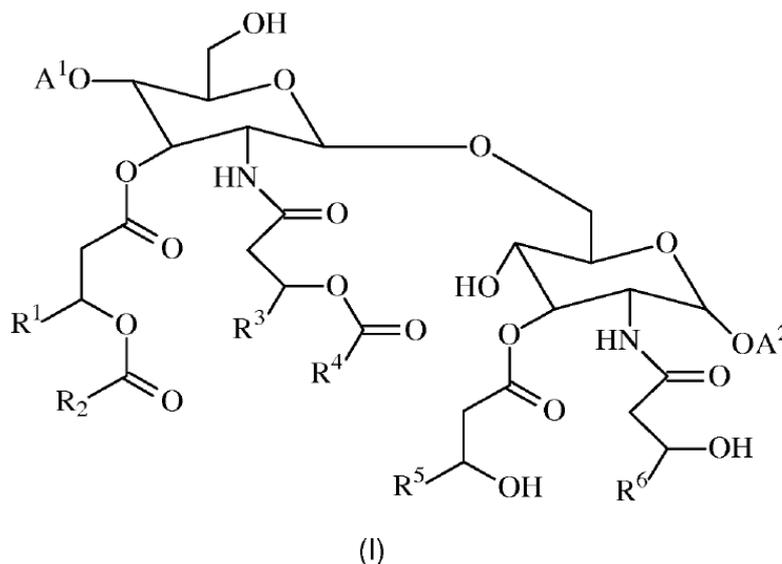
Las proteínas expresadas se recogen y se pueden emplear "como tal" o más normalmente, se analiza y además se purifica. Los procedimientos típicos para determinar la pureza o cantidad incluyen la electroforesis en gel, el Western blot, espectrometría de masas, y ELISA. La actividad de las proteínas se ensaya generalmente en un ensayo biológico, tal como los descritos en los Ejemplos. Si es necesario o se desea, las proteínas se pueden purificar además. Muchos métodos de purificación son bien conocidos e incluyen cromatografía por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de afinidad, precipitación, y precipitación inmunológica. El uso previsto de la proteína determinará normalmente el grado de la purificación, el uso en seres humanos requiere probablemente el nivel más alto de pureza.

B. Agentes que activan la inmunidad innata

El sistema de inmunidad innata comprende células que proporcionan protección de una manera específica a la infección por otros organismos. La inmunidad innata es una protección inmediata pero no es tan prolongada o protectora contra amenazas futuras. Las células del sistema inmunológico que tienen normalmente un papel en la inmunidad innata son los fagocitos, tal como macrófagos y células dendríticas. El sistema inmunológico innato interactúa con el sistema inmunológico adaptativo (también llamado adquirido) en una variedad de formas. Las células del sistema inmunológico innato pueden participar en la presentación del antígeno a las células del sistema inmunológico adaptativo, que incluye la expresión de linfocinas que activan a otras células, emitiendo moléculas quimiotácticas que atraen a células que pueden ser específicas para el invasor, y que secretan citoquinas que reclutan y activan células del sistema inmunológico adaptativo. Las composiciones farmacéuticas inmunogénicas descritas en la presente memoria incluyen un agente que activa la inmunidad innata para mejorar la eficacia de la composición. Muchos tipos de agentes pueden activar la inmunidad innata. Organismos, como bacterias y virus, pueden activar la inmunidad innata, como también componentes de organismos, químicos tales como 2'-5' oligo A, endotoxinas bacterianas, duplos de ADN, ARN monocatenario y otras moléculas. Muchos de los agentes actúan a través de una familia de moléculas – los receptores de tipo peaje (TLRs, de sus siglas en inglés). La participación de un TLR puede conducir también a la producción de citoquinas y quimioquinas y a la activación y maduración de células dendríticas, componentes implicados en el desarrollo de la inmunidad adquirida. La familia de los TLR puede responder a una variedad de agentes, que incluyen la lipoproteína, peptidoglicano, flagelina, imidazoquinolinas, ADN CpG, lipopolisacárido y ARN de cadena doble (Akira et al. *Biochemical Soc Transactions* 31: 637-642, 2003). Estos tipos de agentes se denominan a menudo patógeno (o microbio) asociado a patrones moleculares.

En un aspecto, se incluyen en la composición uno o más adyuvantes, para proporcionar un agente o agentes que activan la inmunidad innata. Un adyuvante es una sustancia que se incorpora o administra simultáneamente con el antígeno que incrementa la respuesta inmunológica. Se ha proporcionado una variedad de mecanismos para explicar cómo funcionan los diferentes adyuvantes (por ejemplo, depósitos de antígeno, activadores de células dendríticas, macrófagos). Sin querer vincularlo a la teoría, un mecanismo implica activar el sistema inmunológico innato, dando como resultado la producción de quimioquinas y citoquinas, que activan a su vez la respuesta inmunológica adaptativa (adquirida). En particular, algunos adyuvantes activan a células dendríticas a través de TLRs. Por tanto, un adyuvante es un tipo de agente que activa el sistema inmunológico innato que puede usarse en una vacuna para el VHS-2. Un adyuvante puede actuar para mejorar una respuesta inmunológica adquirida también de otras maneras. El adyuvante preferiblemente es un agonista TLR4.

Un adyuvante que se puede emplear en las composiciones descritas en la presente memoria es una molécula de tipo lípido A monoácido (MALA, de sus siglas en inglés). Un ejemplo de un adyuvante MALA es el MLP® como se describe en, por ejemplo, Ulrich J.T. y Myers, K.R., "Monophosphoryl Lipid A as an Adjuvant" Capítulo 21 en Diseño de Vacunas, the Subunit and Adjuvant Approach, Powell, M.F. y Newman, M.J., eds. Plenum Press, NY 1995. Otro ejemplo de MALA es el que se describe mediante la fórmula química (I):



en donde las partes A¹ y A² se seleccionan independientemente del grupo de hidrógeno, fosfato, sales fosfato, carboxilato, sales carboxilato, sulfato, sales sulfato, sulfito, sales sulfito, aspartato, sales aspartato, succinato, sales succinato, carboximetilfosfato y sales carboximetilfosfato. Sodio y potasio son ejemplos de contraiones para sales de fosfato y carboxilato. Al menos uno de A¹ o A² es hidrógeno. Las partes R¹, R², R³, R⁴, R⁵, y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbonilo que tiene de 3 a 23 carbonos, preferiblemente un alquilo de cadena lineal, representada por C₃-C₂₃. Para mayor claridad se explicará que cuando una parte se selecciona "independientemente de" un grupo especificado que tiene múltiples miembros, se deberá entender que el miembro elegido para la primera parte no tiene impacto o limita de ninguna manera la elección del miembro seleccionado para la segunda parte. Los átomos de carbono unidos a R¹, R³, R⁵ y R⁶ son asimétricos, y por tanto, pueden encontrarse bien en estereoquímica R o S. En una realización todos los átomos de carbono están en la estereoquímica R, mientras que en otra realización todos estos átomos de carbono están en la estereoquímica S.

"Hidrocarbonilo" o "alquilo" se refiere a una parte química formada completamente a partir de hidrógeno y carbono, donde la disposición de los átomos de carbono puede ser una cadena lineal o ramificada, cíclica o no cíclica, y la unión entre los átomos de carbono adyacentes puede ser completamente por uniones sencillas, es decir, para proporcionar un hidrocarbonilo saturado, o pueden presentar enlaces dobles o triples entre cualquiera de los dos átomos de carbono adyacentes, es decir, para proporcionar un hidrocarbonilo insaturado, y el número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbonilo está entre 3 y 24 átomos de carbono. El hidrocarbonilo puede ser un alquilo, donde alquilos de cadena lineal representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc; mientras que los alquilos ramificados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo, y similares. Hidrocarbonilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares; mientras que los hidrocarbonilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los hidrocarbonilos insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre los átomos de carbono adyacentes (referido como un "alquenilo" o "alquinilo", respectivamente, si el hidrocarbonilo no es cíclico, y cicloalquenilo y cicloalquinilo, respectivamente, si el hidrocarbonilo es al menos cíclico parcialmente). Alquenilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etenilo, propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares; mientras que alquinilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen acetileno, propinilo, 1-butino, 2-butino, 1-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares. Por ejemplo, el "alquilo de C6-11" significa un alquilo como se define anteriormente, que contiene de 6-11 átomos de carbono, respectivamente.

El adyuvante de la fórmula (I) se puede obtener mediante métodos sintéticos conocidos en la técnica, por ejemplo, la metodología sintética descrita en La Publicación Internacional PCT N° WO 2009/035528, así como las publicaciones identificadas en WO 2009/035528. Determinados adyuvantes se pueden obtener también de manera comercial. Un adyuvante preferido es el Producto N° 699800 como se identifica en el catálogo de Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, en donde R¹, R³, R⁵ y R⁶ son undecilo y R² y R⁴ son tridecilo.

En varias realizaciones de la invención, el adyuvante tiene la estructura química de fórmula (I) pero las fracciones A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 y R6 se seleccionan siendo A1 fosfato o sal fosfato y A2 hidrógeno; y R1, R3, R5 y R6 se seleccionan a partir de un alquilo C7-C15; y R2 y R4 se seleccionan a partir de un hidrocarbonilo C9-C17. En una realización preferida de la invención, el GLA empleado en los ejemplos en la presente memoria tiene la fórmula establecida en la Figura 1, en donde R1, R3, R5 y R6 son undecilo y R2 y R4 son tridecilo. Los adyuvantes MALA descritos anteriormente son una clase de adyuvante preferido para emplear en composiciones farmacéuticas inmunogénicas descritas en la presente memoria. Sin embargo, en la formulación con la composición farmacéutica inmunogénica se puede emplear cualquiera de los siguientes adyuvantes en solitario, o en combinación con un adyuvante MALA.

El adyuvante puede ser alumbre, aunque este término se refiere a sales de aluminio, tal como fosfato de aluminio (AlPO₄) e hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). Cuando se emplea alumbre como el adyuvante o como un co-adyuvante, el alumbre se puede presentar, en una dosis de la composición farmacéutica inmunogénica en una cantidad de aproximadamente 100 a 1.000 µg, o de 200 a 800 µg, o de 300 a 700 µg o de 400 a 600 µg. Si el adyuvante de la fórmula (I) se co-formula con alumbre, el adyuvante de fórmula (I) se presenta normalmente en una cantidad inferior a la cantidad de alumbre, en varios aspectos el adyuvante de la fórmula (I), en función del peso, se presenta en 0,1-1%, o 1-5%, o 1-10%, o 1-100% relativo al peso de alumbre. En un aspecto de la invención, la composición excluye la presencia de alumbre.

El adyuvante puede ser una emulsión que tiene propiedades adyuvantes a la vacuna. Tales emulsiones incluyen emulsiones de aceite en agua. El adyuvante incompleto de Freund (IFA) es uno de tales adyuvantes. Otra emulsión de aceite en agua adecuada es el adyuvante MF-59TM que contienen escualeno, monooleato de sorbitán polixietileno (también conocido como tensioactivo TweenTM 80) y trioleato de sorbitán. El escualeno es un compuesto orgánico natural que se obtiene de manera original a partir del aceite de hígado de tiburón, aunque también está disponible a partir de fuentes vegetales (aceites vegetales principalmente), que incluyen la semilla de amaranto, el salvado de arroz, germen de trigo, y olivas. Otros adyuvantes de emulsión adecuados son los adyuvantes MontanideTM (Seppic Inc., Fairfield NJ) que incluyen MontanideTM ISA 50V que es un adyuvante basado en un aceite mineral, MontanideTM ISA 206, y MontanideTM IMS 1312. Aunque el aceite mineral se puede presentar en el adyuvante, en una realización, el componente o componentes oleosos de las composiciones de la presente invención son todos aceites metabolizables.

El adyuvante puede ser adyuvante AS02TM o adyuvante AS04TM. El adyuvante AS02TM es una emulsión de aceite en agua que contienen tanto el adyuvante MPLTM como el adyuvante QS-21TM (una saponina adyuvante discutida en otra parte en la presente memoria). El adyuvante AS04TM contiene el adyuvante MPLTM y alumbre. El adyuvante puede ser adyuvante Matrix- MTM.

El adyuvante puede ser una saponina tal como las que se derivan de la corteza de las especies de árbol de Quillaja saponaria, o una saponina modificada, véase, por ejemplo, las Patentes U.S. N^{os} 5.057.540; 5.273.965; 5.352.449; 5.443.829; y 5.560.398. El adyuvante producto QS-21TM vendido por Antigenics, Inc. Lexington, MA es un ejemplo de co-adyuvante que contiene saponina que se puede usar con el adyuvante de fórmula (I). La familia de adyuvantes ISCOMTM relacionada con las saponinas, se desarrollaron de manera original por Iscotec (Suecia) y normalmente se forman a partir de saponinas derivadas de Quillaja saponaria o análogos sintéticos, colesterol, y fosfolípido, todos en forma de una estructura similar al panal de abeja.

El adyuvante puede ser una citoquina que funcione como un adyuvante, véase, por ejemplo, Lin R. et al. Clin: Infec. Dis. 21(6):1439-1449 (1995); Taylor, C.E., Infect. Immun. 63(9):3241-3244 (1995); y Egilmez, N.K., Capítulo 14 en Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, John Wiley e Hijos, Inc. (2007). En varias realizaciones, la citoquina puede ser. Por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); véase, por ejemplo, Change D.Z. et al. Hematology 9(3):207-215 (2004), Dranoff, G. Immunol. Rev. 188:147-154 (2002), la Patente U.S. 5.679.356; o un interferón, tal como un interferón de tipo I, por ejemplo, interferón-α (IFN-α) o interferón-β (IFN-β), o un interferón tipo II, por ejemplo, interferón-γ (IFN-γ), véase, por ejemplo, Boehm, U. et al. Ann. Rev. Immunol. 15:749-795 (1997); y Theofilopoulos, A.N. et al. Ann. Rev. Immunol. 23:307-336 (2005); una interleuquina, incluyendo específicamente interleuquina-1α (IL-1α), interleuquina-1β (IL-1β), interleuquina-2 (IL-2); véase, por ejemplo, Nelson, B.H., J. Immunol. 172(7):3983-3988 (2004); interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-12 (IL-12); véase, por ejemplo, Portielje, J.E., et al., Cancer Immunol. Immunother. 52(3):133-144 (2003) y Trinchieri, G. Nat. Rev. Immunol. 3(2):133-146 (2003); interleuquina-15 (IL-15), interleuquina-18 (IL-18); ligando 3 tirosina quinasa de hígado fetal (Flt3L), o factor α de necrosis tumoral (TNFα).

El adyuvante pueden ser dinucleótidos CpG sin metilar, conjugados opcionalmente a los antígenos descritos en la presente memoria.

Ejemplos de inmunopotenciadores que se pueden usar en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria como co-adyuvantes incluyen: MPLTM, MDP y derivados; oligonucleótidos; ARN de cadena doble; modelos moleculares asociados a un patógeno alternativo (PAMPs); saponinas; potenciadores inmunológicos de pequeñas moléculas (SMIPs); citoquinas; y quimioquinas.

En varias realizaciones, el co-adyuvante es el adyuvante MPL™, que está disponible comercialmente en GlaxoSmithKline (desarrollado originalmente por Ribic ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, MT). Véase, por ejemplo, Ulrich y Myers, Capítulo 21 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell y Newman, eds. Plenum Press, Nueva York (1995). Adyuvantes relacionados con MPL™, y otros co-adyuvantes adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, son el adyuvante AS02™ y el adyuvante AS04™. El adyuvante AS02™ es una emulsión de aceite en agua que contiene tanto el adyuvante MPL™ como el adyuvante QS-21™ (una saponina adyuvante que se discute en otra parte en la presente memoria). El adyuvante AS04™ contiene el adyuvante MPL™ y alumbre. El adyuvante MPL™ se prepara a partir de lipopolisacárido (LPS) de Salmonella minnesota R595 mediante tratamiento de LPS con un ácido medio e hidrólisis básica seguido de la purificación del LPS modificado.

Cuando se utilizan dos adyuvantes en combinación, las cantidades relativas de los dos adyuvantes se pueden seleccionar para conseguir las propiedades de rendimiento deseadas para la composición que contienen los adyuvantes, en relación al antígeno en solitario. Por ejemplo, la combinación de adyuvantes se puede seleccionar para mejorar la respuesta del antígeno al anticuerpo, y/o para mejorar la respuesta del sistema inmunológico innato del sujeto. La activación del sistema inmunológico innato da como resultado la producción de quimioquinas y citoquinas, que pueden activar a su vez una respuesta inmunológica adaptativa (adquirida). Un consecuencia importante de la activación de la respuesta inmunológica adaptativa es la formación de células inmunológicas de memoria para que cuando el hospedador se reencuentra con el antígeno, la respuesta inmunológica aparezca más rápido y generalmente con mayor calidad.

El adyuvante o adyuvantes se pueden pre-formular antes de su combinación con las proteínas de VHS-2. En una realización, un adyuvante se puede proporcionar como una suspensión acuosa estable de menos de 0,2 µm y puede comprender al menos un componente que se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados, y similares. El adyuvante o adyuvantes se pueden formular en una emulsión de aceite en agua en la que el adyuvante se incorpora en la fase oleosa. Para el uso en seres humanos, el aceite es metabolizable preferiblemente. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético; el aceite no deberá ser tóxico para el receptor y debe ser capaz de transformarse mediante el metabolismo. Fuentes comunes de aceites vegetales son los frutos secos (tal como el aceite de cacahuete), semillas, y granos. Aceites metabolizables adecuados particularmente incluyen escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano), un aceite insaturado que se encuentra en muchos aceites diferentes, y en altas cantidades en el aceite de hígado de tiburón. El escualeno es un intermediario en la biosíntesis del colesterol. Además, las emulsiones de aceite en agua comprenden normalmente un antioxidante, tal como alfa-tocoferol (vitamina E, US 5.650.155, US 6.623.739). Se pueden añadir estabilizadores, tal como un triglicérido, ingredientes que confieren isotonicidad y otros ingredientes. Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua empleando escualeno se conoce como "SE" y comprende escualeno, glicerol, fosfatidilcolina o lecitina u otro co-polímero en bloque como un tensioactivo en un tampón fosfato de amonio, pH 5,1, con alfa-tocoferol.

El método para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido por un experto en la técnica. Normalmente, el método comprende mezclar la fase oleosa con un tensioactivo, tal como fosfatidilcolina, poloxámero, co-polímero de bloque o una disolución de TWEEN80®, seguido de la homogeneización empleando un homogeneizador. Por ejemplo, un método que comprende hacer pasar la mezcla una, dos, o más veces a través de una aguja de una jeringa es adecuado para homogeneizar volúmenes pequeños de líquido. Igualmente, el proceso de emulsificación en un microfluidificador (máquina microfluídica M110S, máximo de 50 pasos, durante un período de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) se puede adaptar para producir pequeños o grandes volúmenes de emulsión. Esta adaptación se puede conseguir mediante experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se consigue una preparación con gotas de aceite del diámetro deseado. Se pueden usar otros equipos o parámetros para generar una emulsión. Divulgaciones de composiciones de emulsión, y métodos para su preparación, se pueden encontrar en, por ejemplo, las Patentes U.S. N^{os} 5.650.155; 5.667.784; 5.718.904; 5.961.970; 5.976.538; 6.572.861; y 6.630.161.

C. Composiciones farmacéuticas y usos

1. Formulación

Una composición farmacéutica reivindicada comprende una glicoproteína de VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la misma, una proteína estructural de VHS-2 diferente a una glicoproteína de envoltura o un fragmento inmunogénico de la misma, un agente que es un agonista del sistema inmunológico innato, y un transportador aceptable farmacéuticamente. La composición puede comprender más de una glicoproteína (o fragmento), más de una proteína estructural (o fragmento) o más de un agente.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende una porción antigénica de una glicoproteína de VHS-2, un transportador aceptable farmacéuticamente, y opcionalmente un agente que es un agonista del sistema inmunológico innato. La composición puede comprender más de una porción de glicoproteína y uno o más de un agente. El transportador puede tener opcionalmente propiedades adyuvantes, por ejemplo, algunos transportadores

de emulsión tienen propiedades adyuvantes. Aunque en la presente memoria las glicoproteínas de VHS que se discuten son principalmente de VHS-2, también se pueden usar glicoproteínas de VHS-1.

En determinadas realizaciones, la glicoproteína o la proteína estructural o ambas pueden ser una proteína precursora, una proteína madura, un fragmento, una proteína de fusión, o un péptido. La glicoproteína y los elementos proteicos estructurales pueden ser parte de las mismas o diferentes proteínas de fusión. De manera similar, si hay más de una glicoproteína o más de una proteína estructural, pueden ser parte de una proteína de fusión única o partes de proteínas de fusión separadas. Si hay más de una glicoproteína o más de una proteína estructural, cada una de las proteínas puede ser una proteína precursora, una proteína madura, un fragmento, etc., esto es, por ejemplo, dos glicoproteínas pueden comprender un fragmento y un péptido o, por ejemplo, dos fragmentos diferentes de la misma glicoproteína o, por ejemplo, dos fragmentos de diferentes glicoproteínas.

La cantidad de cada una de las proteínas o fragmentos inmunológicos en cada dosis de la vacuna oscila normalmente de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg, o aproximadamente 0,5 µg, aproximadamente 1,0 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 100 µg, o aproximadamente 150µg o aproximadamente 200 µg o aproximadamente 250 µg o cualquier otra cantidad adecuada que determinaran proporcionar eficacia frente al VHS-2. Las proteínas o fragmentos inmunológicos se pueden presentar en una variedad de proporciones, incluyendo proporciones equimolares, que proporcionan representación de epítopos iguales, y proporciones iguales en masa, que proporcionan masas iguales de cada proteína individual. Las proporciones equimolares e iguales en masas que están dentro de aproximadamente el 20% (por ejemplo, 0,8:1,2), o dentro de aproximadamente el 10% (por ejemplo, 0,9:1,1) o dentro de aproximadamente 5% (por ejemplo, 0,95:1,05) de equivalencia se consideran ser equimolares o iguales en masa. La dosis se determinará normalmente mediante la actividad farmacológica de la composición, el propósito (terapéutico o profiláctico), y el tamaño y condición del sujeto.

Las proteínas se pueden suministrar como una disolución, pero también se pueden desecar (secar), en cuyo caso, el usuario añade el líquido necesario. Normalmente, se presentarán también aditivos tales como tampones, estabilizadores, agentes tonificantes, tensioactivos, conservadores, transportadores, y otros ingredientes no activos. Los aditivos son normalmente aceptables farmacéuticamente y bio-compatibles. Preferiblemente, los aditivos, inmunógenos, agentes etc., están libres sustancialmente de otras endotoxinas, compuestos tóxicos, y contaminantes que puedan causar efectos adversos indeseados. Las formulaciones pueden variar según la vía de administración. Por ejemplo, una formulación para administración mediante inyección i.m. será generalmente acuosa e isotónica, mientras que una formulación para administración oral se puede encapsular como una forma de liberación lenta o contener saborizantes. Las formulaciones para la administración por aerosol se envasarán generalmente bajo presión y contendrán un propolente.

El agente, que puede ser un adyuvante, se puede proporcionar como una disolución, desecada, o emulsionada, generalmente como una emulsión estable de aceite en agua. En una realización, un agente, se puede proporcionar como una suspensión acuosa estable de menos de 0,2 µm y puede comprender además al menos un componente que se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados, y similares. Tal formulación acuosa estable puede ser una formulación micelar. En otra realización, el agente se puede formular de una manera que pueda ser en aerosol, bien como una formulación en polvo o líquida.

Cualquiera de estas formulaciones pueden comprender también tampones, estabilizantes, conservadores, transportadores, u otros ingredientes no activos. Los aditivos son normalmente aceptables farmacéuticamente y bio-compatibles. Se pueden presentar más de un agente, y uno, algunos o todos los agentes pueden ser también un adyuvante o co-adyuvante. Además, se puede proporcionar también un adyuvante, o co-adyuvante que no sea tampoco un agente. Se pueden presentar también depósitos de antígeno, tal como aceites o al menos alguna emulsión oleosa.

La cantidad de un agente adyuvante, tal como GLA u otro adyuvante MALA es normalmente de aproximadamente 0,5 µg, aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 7,5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg o aproximadamente 25 µg. Una emulsión, tal como SE, se puede presentar en aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1,0%, aproximadamente el 1,5%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 2,5%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 7,5% o aproximadamente el 10%.

El agente y las proteínas se pueden proporcionar en recipientes separados y mezclados in situ o pre-mezclados. Además, las proteínas se pueden presentar en recipientes separados o combinados en un único recipiente. El agente y las proteínas se pueden proporcionar de una forma concentrada y provistos con un diluyente. Diluyentes adecuados incluyen solución salina y PBS. Un recipiente puede ser un vial, ampolla, tubo, pocillo o dispositivo multipocillo, reservorio, jeringa o cualquier otro tipo de recipiente. El recipiente o recipientes se pueden proporcionar como un kit. Si uno o más de los recipientes comprenden ingredientes desecados se pueden proporcionar en el kit los líquidos para la reconstitución así como proporcionarse por el usuario. La cantidad de disolución en cada

recipiente o que se añade a cada recipiente es compatible con la vía de administración y de cuántas dosis haya en cada recipiente. Una vacuna proporcionada mediante inyección es normalmente de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2,0 ml, mientras que una vacuna que se proporciona oralmente puede ser un volumen mayor, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, por ejemplo. Los volúmenes adecuados pueden variar también según el tamaño y la edad del sujeto.

2. Administración

La composición se puede usar para el tratamiento en sujetos con una infección por VHS-2. Como se emplea en la presente memoria, "tratamiento" es una intervención clínica que puede ser terapéutica o profiláctica. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene una infección por VHS-2. La composición se proporciona en una cantidad suficiente para generar (inducir) una respuesta inmunológica que puede curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un sujeto susceptible de, o que corre el riesgo de, una infección por VHS-2, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunológica que inhibirá la infección o reducirá el riesgo o retrasará el inicio de la enfermedad o aliviará uno o más de los efectos de la infección. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como una dosis eficaz terapéutica o farmacéuticamente. Tal cantidad se puede administrar como una dosis única o se puede administrar según un régimen, a través del cual es eficaz. La cantidad puede curar una enfermedad pero, normalmente, se administra para mejorar los síntomas de una enfermedad, o para ejercer un efecto de profilaxis frente al desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Tanto en los regímenes terapéuticos como profilácticos, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se haya alcanzado una respuesta inmunológica suficiente. Normalmente, la respuesta inmunológica se monitorea y se proporcionan dosis repetidas si la respuesta inmunológica comienza a desaparecer. El tratamiento no tiene que eliminar completamente la enfermedad, ni tienen que prevenir completamente a un sujeto de que enferme con la enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, se administra sólo una única dosis. Más a menudo, se administrarán múltiples dosis. Generalmente, la primera dosis se llama dosis de "cebado" y la segunda y posteriores dosis se llaman dosis de "refuerzo". Las dosis múltiples pueden consistir en dos administraciones, en tres administraciones, en cuatro administraciones, y a veces, en cinco o más administraciones. Idealmente, el número es una o dos administraciones. Cuando se proporcionan administraciones múltiples, el plazo de la segunda y posteriores administraciones, será generalmente al menos dos semanas después de la última administración, y puede ser de al menos un mes, dos meses, tres meses, seis meses, o 1 año después de la última administración. Idealmente, se monitorea una respuesta inmunológica para determinar si serían ventajosas múltiples dosis. Las dosis múltiples pueden contener cantidades equivalentes de inmunógenos y agonistas o pueden contener diferentes cantidades de estos ingredientes. Por ejemplo, una dosis de refuerzo puede comprender menores cantidades de inmunógenos. Además, los aditivos pueden ser diferentes entre las distintas dosis.

En algunas realizaciones, la composición de cebado que se administra al sujeto es un virus vivo atenuado de VHS-2 y la composición de refuerzo que se administra al sujeto es cualquier composición reivindicada o descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición de cebado que se administra al sujeto es cualquier composición que se reivindica o describe en la presente memoria y la composición de refuerzo que se administra al sujeto es un virus vivo atenuado de VHS-2.

Si se usa como un profiláctico o como un terapéutico, la administración alcanza preferiblemente una respuesta inmunológica para VHS-2. La respuesta inmunológica puede ser humoral (mediada por anticuerpo) o celular (normalmente, aunque no exclusivamente, mediada por células T) o ambas. El sujeto inmunizado puede activar también monocitos, macrófagos, células NK, células dendríticas, y otros tipos de células inmunológicas innatas. Se describen en la presente memoria ensayos para una respuesta inmunológica y son bien conocidos por un experto en la técnica.

La vacuna se administra a una dosis suficiente para efectuar una respuesta inmunológica beneficiosa (dosis eficaz terapéuticamente), por ejemplo, una respuesta inmunológica eficaz para mejorar, aliviar, curar, o mejorar parcialmente los síntomas de una enfermedad o infección, o una respuesta profiláctica, por ejemplo, para prevenir los síntomas de una enfermedad o infección. Indicadores de una respuesta terapéutica beneficiosa son pocas lesiones por herpes en cualquier brote proporcionado o un menor número de lesiones de media, o brotes menos frecuentes. Otros indicadores incluyen lesiones más pequeñas, lesiones que cicatrizan más rápidamente, lo que redundará en menos dolor. Otros indicadores son el desarrollo de anticuerpos a componentes de la vacuna de VHS-2, en particular la presencia de anticuerpos para glicoproteínas de envoltura de VHS-2, por ejemplo, anticuerpos para gD2, y también el desarrollo en particular de anticuerpos neutralizantes. Existen muchos procedimientos bien conocidos para detectar y cuantificar anticuerpos, que incluyen ELISA y ensayos de inhibición de la infección por virus (neutralización). En una realización, el ensayo ELISA se realiza mediante recubrimiento de los pocillos de una placa multi-pocillo con proteína gD2, que captura anticuerpos específicos de gD2 a partir del suero de las placas, detectando el anticuerpo específico de gD2 con el anticuerpo anti-humano marcado, seguido de una lectura del marcador. El marcador puede ser radioactivo, pero normalmente es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante, que convierte a un sustrato en uno que se puede detectar colorimétricamente. Un ejemplo de ensayo de neutralización de VHS se basa en un ensayo de placa en el que el anticuerpo neutralizante se detecta mediante

inhibición de la formación de placa. Otros indicadores incluyen una cantidad o función o frecuencia aumentada de células T CD8 o CD4 sensibles a VHS-2, una reducción en la transmisión viral a la pareja sexual, y reducción del tamaño o frecuencia o de ambas en las lesiones sintomáticas.

5 Ensayos para la función de células T incluyen IFN- γ ELISPOT y ICS (tinción de citoquina intracelular). El ensayo ELISPOT que detecta interferón-gamma es muy utilizado para cuantificar respuestas de células T CD4 y CD8 para vacunas candidatas. El ensayo ELISPOT se basa en el principio de que el ensayo ELISA detecta la secreción inducida por el antígeno de citoquinas atrapadas por un anticuerpo inmovilizado y es visualizado mediante un segundo anticuerpo acoplado a una enzima. El ICS es un método habitual para cuantificar la citotoxicidad de células T como consecuencia de la expresión de citoquinas después de la estimulación con agonistas, tal como anticuerpos para moléculas de superficie de células T o péptidos que se unen a moléculas de Clase MHC. A continuación se describen ejemplos de procedimientos de ICS y ELISPOT. Los sujetos que reciben la vacuna incluye tanto a individuos VHS-2 seropositivos como VHS-2 seronegativos. Para los individuos seropositivos, la vacuna está destinada a ser terapéutica. Para los individuos seronegativos, la vacuna está destinada a ser profiláctica. En algunos casos, los sujetos son seropositivos para VHS-1 y en otros casos, son seronegativos para VHS-1, independientemente del estado para VHS-2. Esto es, los sujetos pueden incluir aquellos que son seropositivos para VHS-1/seropositivos para VHS-2, seronegativos para VHS-1/seropositivos para VHS-2, seropositivos para VHS-1/seronegativos para VHS-2, seronegativos para VHS-1/ seronegativos para VHS-2. Por otra parte, los sujetos incluyen a seres humanos y otros sujetos mamíferos que se pueden infectar por VHS-2.

20 La vacuna se puede administrar mediante cualquier vía adecuada de suministro, tal como por vía intradérmica, por vía mucosa (por ejemplo, intranasal, oral), intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal, y vaginal. Otras vías de suministro son bien conocidas en la técnica.

25 La vía intramuscular es una vía adecuada para la composición. Dispositivos de suministro i.m. adecuados incluyen una aguja y jeringa, un dispositivo de inyección sin aguja bolígrafo (por ejemplo, Biojector, Bioject, OR EE.UU.), o un dispositivo de bolígrafo inyector, tal como los que se emplean en auto-inyecciones caseras para suministro de insulina o epinefrina. Otras vías adecuadas de suministro son la intradérmica y la subcutánea. Dispositivos adecuados incluyen una jeringa y una aguja, la jeringa con una aguja corta, y dispositivos con un surtidor de inyección.

30 La composición se puede administrar mediante una vía mucosa, por ejemplo, intranasalmente. Muchos dispositivos de suministro intranasal están disponibles y son bien conocidos en la técnica. Los dispositivos en spray son uno de tales dispositivos. La administración oral puede ser tan sencillo como proporcionar una disolución para que se trague el sujeto.

35 La vacuna se puede administrar en un único sitio o en múltiples sitios. Si se administra en múltiples sitios, la vía de administración puede ser la misma en cada sitio, por ejemplo, inyección en diferentes músculos, o puede ser diferente, por ejemplo, inyección en un músculo y spray intranasal. Además, la vacuna se puede administrar en un determinado momento o en múltiples momentos. Generalmente si se administra en múltiples momentos, el tiempo entre las dosis se ha determinado para mejorar la respuesta inmunológica.

Vectores de expresión recombinante, vectores virales, y partículas similares a virus

40 En una realización, se proporcionan vectores de expresión recombinante que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos un inmunógeno de VHS-2 que induce una respuesta inmunológica para el inmunógeno y para su determinado antígeno respectivo. Para obtener una transcripción y traducción eficaz del inmunógeno, las secuencias de polinucleótidos codificantes en cada vector incluyen al menos una secuencia de control de la expresión (también llamada secuencia o factor de expresión reguladora) (por ejemplo, promotor, potenciador, líder), que se describen en mayor detalle en la presente memoria, que se une operativamente a la secuencia o secuencias de polinucleótidos codificantes. Estos vectores de expresión recombinante se proporcionan por tanto, para dirigir la expresión del inmúnogeno o para dirigir la co-expresión de al menos dos inmunógenos en cualquier célula adecuada del hospedador que se ha transformado, transducido, o transfectado con el vector de expresión recombinante o partícula del vector que contiene el vector de expresión recombinante.

50 Los vectores de expresión recombinante descritos en la presente memoria pueden codificar uno o más inmunógenos de VHS-2 (es decir, al menos uno, al menos dos, al menos tres inmunógenos, etc.), cuyos inmunógenos se describen en mayor detalle en la presente memoria. En realizaciones particulares, al menos uno, dos, o tres, o más inmunógenos de VHS-2 se pueden codificar mediante un vector de expresión recombinante. A modo de ejemplo, un inmunógeno puede ser una proteína de VHS-2, tal como UL19 (por ejemplo, Fragmento de Dominio Superior UL19 o un fragmento inmunogénico o variante del mismo) y/o gD, (o un fragmento inmunogénico o variante del mismo) y/o UL47 (o un fragmento inmunogénico o variante del mismo), o puede ser otro fragmento o región inmunogénica de la proteína de VHS-2.

A. Producción de proteína recombinante

Se puede usar para la producción del inmunógeno un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia polinucleótida que codifica un inmunógeno. Vectores de expresión recombinante incluyen al menos una

secuencia de expresión reguladora, tal como un promotor o potenciador, que se une operativamente al polinucleótido que codifica el inmunógeno. Cada uno de los vectores de expresión se puede emplear para transformar, transducir, o transfectar una determinada célula hospedadora para la producción recombinante de un respectivo inmunógeno. Células hospedadoras adecuadas para la producción del inmunógeno incluyen células procariontas, levaduras y células eucariotas superiores (por ejemplo, CHO y COS). El inmunógeno puede estar asilado de la respectiva célula hospedadora o cultivo de células hospedadoras empleando uno de los varios métodos de asilamiento (por ejemplo, filtración, diafiltración, cromatografía (incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión), y electroforesis preparativa) conocidas y practicadas de manera habitual en la técnica proteica. En determinadas realizaciones, como se describe en la presente memoria, el inmunógeno aislado se puede formular a continuación con un excipiente adecuado farmacéuticamente para proporcionar una composición inmunogénica.

Métodos particulares para producir polipéptidos recombinantemente son generalmente bien conocidos y se usan de manera habitual. Por ejemplo, se describen procedimientos de biología molecular por Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; véase también Sambrook et al., 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (2001)). La secuenciación del ADN se puede realizar como se describe en Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 74:5463 (1997)) y el manual de secuenciación plc Amersham International e incluyendo las mejoras correspondientes.

B. Vectores de expresión recombinante para el suministro de proteínas a los sujetos

Se pueden emplear vectores de expresión recombinante para la expresión de uno o más de los inmunógenos descritos en la presente memoria. En realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante se suministra a una determinada célula (por ejemplo, una célula que presenta un antígeno, es decir, una célula que muestra un complejo MHC/péptido en su superficie celular, tal como una célula dendrítica) o tejido (por ejemplo, tejido linfóide) que inducirá la respuesta inmunológica deseada (es decir, una respuesta humoral específica (es decir, respuesta de células B) y/o inducirá una respuesta inmunológica mediada por células específicas, que puede incluir una respuesta de células T CD4 y/o CD8 específica del inmunógeno, cuya respuesta de células T CD8 puede incluir una respuesta de células T citotóxicas (CTL)). Los vectores de expresión recombinante pueden, por lo tanto, incluir también, por ejemplo, elementos reguladores transcripcionales (TRE) específicos del tejido linfóide tal como un linfocito B, linfocito T, o TRE específico de células dendríticas. TRE específicos del tejido linfóide son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12, 1043-53 (1992); Todd et al., J. Exp. Med. 177, 1663-74 (1993); Penix et al., J. Exp. Med. 178:1483-96 (1993)).

En una realización particular, el vector de expresión recombinante es ADN plasmídico o ADN cósmido. El ADN plasmídico o el ADN cósmido que contiene uno o más polinucleótidos que codifican un inmunógeno como se describe en la presente memoria se construye fácilmente empleando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. El vector génico se puede construir normalmente en forma de plásmido que se puede transfectar a continuación en un envase o en una línea de células productora. El plásmido comprende generalmente secuencias útiles para la replicación del plásmido en la bacteria. Tales plásmidos son bien conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un origen de replicación procariótico pueden incluir también un gen cuya expresión confiere un marcador detectable o seleccionable, tal como una resistencia farmacológica. Productos de resistencia farmacológica bacteriana típicos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina. Para el análisis y confirmación de que las secuencias nucleótidas que se incorporan en los plásmidos son correctas, el plásmido se puede replicar en *E. coli*, purificar, y analizar mediante la digestión de endonucleasa de restricción y/o determinar su secuencia de nucleótidos mediante métodos convencionales.

C. Vectores virales

En otras realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante es un vector viral. Ejemplos de vectores virales de expresión recombinante incluyen un vector génico lentiviral, vector génico de poxvirus, vector génico de virus vaccinia, vector génico adenovirus, vector génico del virus asociado a adenovirus, vector génico del virus herpes, y vector génico del virus alfa. Los vectores virales pueden estar vivos, atenuados, condicionados a replicación o de replicación deficiente, y normalmente es un vector viral no patogénico (defectuoso), de replicación competente.

A modo de ejemplo, en una realización específica, cuando el vector viral es un vector génico vaccinia, el polinucleótido que codifica un inmunógeno de interés se puede insertar en un sitio no esencial de un vector viral vaccinia. Tales sitios no esenciales se describen, por ejemplo, en Perkus et al., Virology 152:285 (1986); Hruby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80:3411 (1983); Weir et al., J. Virol. 46:530 (1983). Promotores adecuados para usar con virus vaccinia incluyen, pero no se limitan a, P7.5 (véase, por ejemplo, Cochran et al., J. Virol. 54:30 (1985); P11 (véase, por ejemplo, Bertholet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:2096 (1985)); y CAE-1 (véase, por ejemplo, Patel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:9431 (1998)). Las cepas de vaccinia muy atenuadas son más convenientes para usar en seres humanos e incluyen Lister, NYVAC, que contiene delecciones del genoma específicas (véase, por ejemplo, Guerra et al., J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8:1445-47 (1992)), o MVA (véase, por ejemplo, Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6-14 (1975)). Véase también Hu et al. (J. Virol. 75:10300-308 (2001)), que describe el uso del virus de

la enfermedad similar a Yaba como un vector para terapia cancerosa); Patentes U.S. N^{os} 5.698.530 y 6.998.252. Véase también, por ejemplo, la Patente U.S. N^o 5.443.964. Véanse también las Patentes U.S. N^{os} 7.247.615 y 7.368.116.

5 En determinadas realizaciones, se puede usar un vector de adenovirus o un vector de un virus asociado a adenovirus, para expresar un inmunógeno de interés. Se han descrito varios sistemas de vectores de adenovirus y métodos para administrar los vectores (véase, por ejemplo, Molin et al., *J. Virol.* 72:8358-61 (1998); Narumi et al., *Am J. Respir. Cell Moll. Biol.* 19:936-41 (1998); Mercier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101:6188-93 (2004); Patentes U.S. N^{os} 6.143.290; 6.596.535; 6.855.317; 6.936.257; 7.125.717; 7.378.087; 7.550.296).

10 Genomas del vector retroviral pueden incluir aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), retrovirus ecotrópico, virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y combinaciones (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-39(1992); Johann et al., *J. Virol.* 66:1635-40 (1992), Sommerfelt et al., *Virology* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-78 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-24 (1991); Miller et al., *Mol. Cell Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg, *NIH Res.* 4:43 (1992); Cornetta et al., *Hum. Gene Ther.* 2:215 (1991)).

15 D. Vectores lentivirales

En una realización más específica, el vector viral de expresión recombinante es un vector génico lentiviral. El genoma se puede derivar a partir de un gran número adecuado de vectores, en base al genoma lentiviral disponible, incluyendo a aquellos identificados para aplicaciones de terapia génica humana (véase, por ejemplo, Pfeifer et al., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211 (2001)). Genomas de vectores lentivirales adecuados incluyen aquellos basados en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), VIH-2, virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS), y virus maedi/visna. Una característica deseable de los lentivirus es que sean capaces de infectar tanto a células que se dividen como a las que no se dividen, aunque las células diana no necesitan ser células que se dividen o ser estimuladas para dividirse. Generalmente, el genoma y las proteínas de envoltura se basarán en diferentes virus, tal que la partícula del vector viral resultante está pseudotipada. Se incorporan de manera deseable características de seguridad al vector génico. Características de seguridad incluyen LTR que se auto-inactivan y un genoma no integrante. Ejemplos de vectores que contienen una señal de empaquetado (psi), elemento sensible a Rev (RRE), donador de unión, aceptor de unión, tracto central de la polipurina (cPPT), y elemento WPRE. En determinadas realizaciones ejemplarizantes, el vector génico viral comprende secuencias a partir del genoma de lentivirus, tal como el genoma de VIH-1 o el genoma VIS. El constructo del genoma viral puede comprender secuencias a partir de los LTRs 5' y 3' de un lentivirus, y en particular pueden comprender secuencias R y U5 a partir del LTR 5' de un lentivirus y un LTR 3' inactivado o que se auto-inactiva a partir de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR a partir de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, VIS, VIF o VIB (virus de inmunodeficiencia bovina). Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR de VIH.

35 El vector génico puede tener un LTR 3' inactivado o que se auto-inactiva (véase, por ejemplo, Zufferey et al., *J. Virol.* 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., *J. Virol.* 72:8150, 1998; ambos de los cuales se incorporan en su totalidad). Un vector que se auto-inactiva tiene generalmente una delección de las secuencias potenciadora y promotora a partir de la repetición terminal larga (LTR) 3', que se copia en el LTR 5' durante la incorporación del vector. En un caso, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una delección de su secuencia potenciadora, la caja TATA, Sp1 y sitios NF-Kappa B. Como un resultado de la auto-inactivación de la LTR 3', el provirus que se genera después de la entrada y de la transcripción inversa comprenderá una LTR 5' inactivada. El fundamento es proporcionar seguridad mediante la reducción del riesgo de movilización del vector génico y de la influencia de la LTR sobre los promotores celulares cercanos. La auto-activación de la LTR 3' se puede construir mediante cualquier método conocido en la técnica.

45 Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentiviral se puede reemplazar por una secuencia promotora en el constructo viral, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede incrementar el título del virus recubierto de la línea celular de empaquetamiento. Se puede incluir también una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que incremente la expresión del genoma de ARN viral en la línea celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se usa una secuencia CMV potenciadora/promotora (véase, por ejemplo, las Patentes U.S. N^{os} 5.385.839 y 5.168.062).

50 En determinadas realizaciones, el riesgo de inserción de una mutagénesis se minimiza mediante la construcción del vector génico lentiviral para que sea defectuoso en la incorporación. Se puede aplicar una gran variedad de métodos para producir un vector génico que no se incorpore. Estos métodos implican una mutación o mutaciones mediante ingeniería en el componente enzimático integrasa del gen pol, tal que codifica una proteína con una integrasa inactiva. El propio vector génico se puede modificar para prevenir la incorporación mediante, por ejemplo, la mutación o delección de uno o ambos sitios de acoplamiento, o haciendo que el tracto de polipurina (PPT) proximal a la LTR 3' no sea funcional a través de la delección o modificación. Además, están disponibles estrategias no genéticas; estas incluyen agentes farmacológicos que inhiben uno o más funciones de la integrasa. Las estrategias no son excluyentes entre sí, esto es, se pueden usar más de una de ellas a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden ser no funcionales, o la integrasa y el sitio del PPT pueden ser no funcionales, o los sitios de unión y el sitio PPT pueden ser no funcionales, o todos ellos pueden ser no funcionales.

La integrasa está implicada en la separación del ADN de punta roma de la cadena doble viral y en la unión de los extremos 5'-fosfato en las dos cadenas de un sitio diana cromosomal. La integrasa tiene tres dominios funcionales: dominio N-terminal, que contiene un motivo de fijación de zinc (HHCC); el núcleo del dominio central, que contiene el núcleo catalítico y un motivo DD35E conservado (D64, D116, E152 en VIH-1); y un dominio C-terminal, que tiene propiedades de unión al ADN. Las mutaciones puntuales introducidas en la integrasa son suficientes para alterar la función normal. Se han construido y caracterizado muchas mutaciones de la integrasa (véase, por ejemplo, Philpott y Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Apolonia, Tesis presentada por la University College de Londres, Abril 2009, pp, 82-97; Engelman et al., *J. Virol.* 69:2729, 1995; Nightingale et al., *Mol. Therapy*, 13:1121, 2006). La secuencia que codifica la proteína integrasa se puede eliminar o mutar para obtener la proteína inactiva, preferiblemente sin afectar significativamente a la actividad de la transcriptasa inversa o a la diana nuclear, previniendo así sólo la incorporación del provirus en el genoma de la célula diana. Mutaciones convenientes pueden reducir la catálisis de la integrasa, transferencia de hebra, unión a los sitios, unión al ADN cromosomal del hospedador, y otras funciones. Por ejemplo, sustitución de un único ácido aspártico por asparragina en el resto 35 del VIH o de la integrasa del VIS suprime completamente la incorporación al ADN viral. Las deleciones de la integrasa estarán limitadas en el dominio C-terminal. La deleción de la secuencia que codifica para los restos 235-288 darán como resultado una integrasa útil no funcional (véase, por ejemplo, Engelman et al., *J. Virol.* 69:2729, 1995). Como en otros ejemplos, se pueden generar mutaciones, por ejemplo, Asp64 (los números de los restos se proporcionan para el VIH-1, los correspondientes al número de restos para la integrasa a partir de otros lentivirus o retrovirus se pueden determinar fácilmente por un experto habitual en la técnica) (por ejemplo, D64E, D64V), Asp116 (por ejemplo, D116N), Asn120 (por ejemplo, N120K), Glu152, Gln148 (por ejemplo, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (por ejemplo, W235E), Lys264 (por ejemplo, K264R), Lys266 (por ejemplo, K266R), Lys273 (por ejemplo, K273R). Se pueden construir y ensayar otras mutaciones para la incorporación, expresión transgénica, y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son bien conocidos. Las mutaciones se pueden generar mediante cualquiera del gran número de técnicas, que incluyen la mutagénesis dirigida al sitio y la síntesis química de la secuencia de ácido nucleico. Se puede producir una mutación o pueden presentarse más de una de estas mutaciones en la integrasa. Por ejemplo, una integrasa puede tener mutaciones en dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, etcétera.

Alternativamente o en combinación con el uso de una mutación o mutaciones de la integrasa, los sitios de unión (att) en U3 y U5 pueden mutarse también. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido terminal 3' se separa en ambos extremos del vector génico. Un dinucleótido CA se localiza en el extremo 3' empotrado; el CA se requiere para procesar la mutación de los bloques de nucleótidos en la incorporación en el cromosoma del hospedador. El A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para la incorporación, y las mutaciones en ambos extremos del genoma proporcionarán los mejores resultados (véase, por ejemplo, Brown et al., *J. Virol.* 73:9011 (1999)). En un ejemplo, el CA en cada extremo se cambia por TG. En otros ejemplos, el CA en cada extremo se cambia por TG en un extremo y por GT en el otro extremo. En otro ejemplo, el CA en cada extremo se suprime; y en otros ejemplos, el A del CA se elimina en cada extremo.

La incorporación se pueden inhibir también mediante la mutación o eliminación del tracto de polipurina (PPT) (véase, por ejemplo, WO 2009/076524), localizado proximalmente al LTR 3'. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que pueden servir como un primer sitio de unión para la síntesis de una cadena de ADN más. En este caso, las mutaciones o deleciones de PPT se dirigen al proceso de transcripción inversa. Sin querer vincularlo a un mecanismo en particular, mediante la mutación o eliminación del PPT, se reduce radicalmente la producción de ADN lineal, y se producen círculos de ADN sólo en 1-LTR esencialmente. La incorporación requiere de un vector génico de ADN de doble hebra lineal, y la incorporación se elimina esencialmente sin él. Como se indica en la presente memoria, un PPT se puede hacer no funcional mediante mutación o deleción. Normalmente, se suprime el PPT entero de aproximadamente 15 nt, aunque en algunas realizaciones, se pueden realizar deleciones más cortas de 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt y 2 nt. Cuando se realizan mutaciones, normalmente se realizan mutaciones múltiples, especialmente en la mitad 5' del PPT (véase, por ejemplo, McWilliams et al., *J. Virol.* 77:11150, 2003), aunque mutaciones simples y dobles en las primeras cuatro bases aún reducen la transcripción. Las mutaciones producidas en el extremo 3' de la PPT tienen generalmente un efecto más drástico (véase, por ejemplo, Powell et al., *J. Virol.* 70:5288, 1996).

La región U3 puede comprender una secuencia PPT (tracto de polipurina) ascendente inmediatamente. En determinadas realizaciones específicas, se puede incluir en el vector lentiviral cualquiera de una de las tres regiones distintas de U3 (en el extremo 3') (véase SEQ ID NOS:13-15). Los constructos contienen deleciones en las regiones U3. El constructo SIN tiene una deleción de aproximadamente 130 nucleótidos (véase, por ejemplo, Miyoshi, et al. *J. Virol.* 72: 8150, 1998; Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83: 3194, 1986), que elimina la caja TATA, suprimiendo así la actividad promotora de LTR. Las deleciones en los constructos 703 y 704 incrementan la expresión a partir de vectores de lentivirus (véase, por ejemplo, Bayer et al., *Mol. Therapy* 16:1968, 2008). Además, el constructo 704 contiene una deleción del PPT 3', el cual reduce la incorporación del vector (véase, por ejemplo, WO 2009/076524). Véase también la Solicitud de Patente U.S. N° 12/842.609 y la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2011/011584 (Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US10/042870).

Estas diferentes estrategias para producir un vector génico que no se incorpore se pueden emplear de manera individual o en combinación. Emplear más de un método se puede utilizar para construir un vector de seguridad a través de mecanismos redundantes. Por tanto, las mutaciones o deleciones de PPT se pueden combinar con sitios

de mutación o delección o con mutaciones de la Integrasa o con mutaciones o delecciones de PPT que se pueden combinar tanto con sitios con mutaciones o delecciones como con mutaciones en la Integrasa. De manera similar, los sitios de las mutaciones o delecciones, y las mutaciones de la Integrasa se pueden combinar unas con otras o con mutaciones o delecciones de PPT.

- 5 Como se describe en la presente memoria, los constructos del vector lentiviral pueden contener también un promotor para la expresión en células mamíferas. Promotores, que se discuten en mayor detalle en la presente memoria, incluyen, por ejemplo, el promotor C de ubiquitina humana (UbiC), el promotor temprano inmediato de citomagalovirus (CMV), y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).

E. Partículas similares a virus

- 10 En varias realizaciones, se proporcionan partículas similares a virus (VLP) que comprenden al menos un inmunógeno de VHS-2 que induce una respuesta inmunológica para el inmunógeno y para su antígeno designado respectivo.

15 Se puede preparar una partícula similar al virus de VHS-1 o VHS-2 al permitir a la VP5, VP19, VP23, VP22a, y a la proteasa madurativa (producto del gen UL26) auto-ensamblarse in vitro. Véase, por ejemplo, Newcomb et al., *J. Virol*, Sept. 1994, 6059-6063.; Newcomb et al., *J. Mol. Biol.*, 263; 432-446 (1996); Thomsen et al., *J. Virol*, Abril 1994, 2442-2457. Las partículas similares a virus descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más inmunógenos de VHS-2 (es decir, al menos uno, al menos dos, al menos tres inmunógenos, etc.), cuyos inmunógenos se describen con mayor detalle en la presente memoria. En realizaciones particulares, al menos uno, dos, o tres, o más inmunógenos a partir de VHS-2 se pueden encerrar o asociar con una partícula similar a un virus.

20 A modo de ejemplo, un inmunógeno puede ser una proteína de VHS-2, tal como UL19 (por ejemplo, Un Fragmento de Dominio Superior UL19 o un fragmento inmunogénico o variante de la misma), y/o gD (o un fragmento inmunogénico o variante de la misma) y/o UL47 (o un fragmento inmunogénico o variante de la misma), o puede ser otro fragmento inmunogénico o región de la proteína de VHS-2.

Secuencias de expresión reguladora

- 25 Como se describe en la presente memoria, el vector de expresión recombinante comprende al menos una secuencia de expresión reguladora. En determinadas realizaciones, cuando el vector de expresión recombinante comprende un vector génico viral, se desea la expresión de al menos un inmunógeno en células diana particulares. Normalmente, por ejemplo, en un vector lentiviral la secuencia de polinucleótidos que codifica el inmunógeno se localiza entre las secuencias LTR 5' y LTR 3'. Además, la secuencia o secuencias que codifican nucleótidos se unen preferiblemente
- 30 de manera operativa en una relación funcional con otras secuencias o características genéticas o reguladoras, por ejemplo, secuencias reguladoras de transcripción que incluyen promotores o potenciadores, que regulan la expresión del inmunógeno de una manera particular. En determinados casos, las secuencias reguladoras transcripcionales útiles son aquellas que están muy reguladas con respecto a la actividad, tanto temporal como espacialmente. Los elementos de control de la expresión que se pueden emplear para regular la expresión de
- 35 polipéptidos codificados son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción, potenciadores, y otras secuencias reguladoras.

El polinucleótido que codifica el inmunógeno y cualquier otra secuencia expresable normalmente tiene una relación funcional con las secuencias reguladoras potenciadoras/promotoras internas. Con respecto a los constructos del vector lentiviral, un potenciador/promotor "interno" es uno que se localiza entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' en el

40 vector viral y, se une operativamente a la secuencia de polinucleótidos codificante de interés. El potenciador/promotor puede ser cualquier promotor, potenciador o combinación de promotor/potenciador conocido para incrementar la expresión de un gen con el que tienen una relación funcional. Una "relación funcional" y "unido operativamente" significa, sin limitación, que la secuencia está en la localización y orientación correctas con respecto al potenciador y/o promotor tal que la secuencia de interés se expresará después de que el potenciador y/o promotro

45 entre en contacto con las moléculas adecuadas.

La elección del promotor/potenciador interno se basa en el patrón de expresión deseado del inmunógeno y de las propiedades específicas de los promotores/potenciadores conocidos. Por tanto, el promotor interno puede ser activo constitutivamente. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que se pueden emplear incluyen el promotor para ubiquitina (véase, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5510474; WO 98/32869); CMV (véase, por ejemplo,

50 Thomsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:659, 1984; Patente U.S Nº 5168062); beta-actina (Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:4831-4835); y pgk (véase, por ejemplo, Adra et al. 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417; y Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637).

Alternativamente, el promotor puede ser un promotor tisular específico. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de la célula diana. Las células dendríticas diana pueden mejorar la respuesta inmunológica,

55 particularmente la respuesta citotóxica celular que es útil para la inmunidad del VHS-2. Por ejemplo, el promotor puede ser a partir de cualquier producto expresado por las células dendríticas, que incluyen CD11c, CD103, TLRs, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor manosa, Dectina-1, Clec9A, MHC de clase II. Además, los promotores se pueden seleccionar para permitir la expresión inducible del inmunógeno. Se conoce en la técnica una

gran cantidad de sistemas para la expresión inducible, que incluyen el sistema de respuesta a tetraciclina, el sistema represor-operador lac, así como los promotores de respuesta a una variedad de cambios fisiológicos o medioambientales, que incluyen el choque térmico, iones metálicos, tal como el promotor de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides, tal como progesterona o promotor del receptor de glucocorticoide, radiación, tal como el promotor VEGF. Se puede emplear también una combinación de promotores para obtener la expresión deseada de cada una de las secuencias de polinucleótidos que codifican el inmunógeno. El experto habitual en la técnica será capaz de seleccionar un promotor en base al patrón de expresión deseado de la secuencia de polinucleótido en el organismo o célula diana de interés.

Un vector de expresión recombinante, que incluye un vector genómico viral, puede comprender al menos un promotor de respuesta ARN Polimerasa II o III. Este promotor se puede unir operativamente a la secuencia polinucleótida de interés y se puede unir también a una secuencia de terminación. Además, se pueden incorporar más de un promotor de ARN polimerasa II o III. Los promotores de ARN polimerasa II o III son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se puede encontrar una variedad adecuada de promotores de ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 28, pp 1283-1298 (2000). Promotores de ARN polimerasa II o III incluyen también cualquier fragmento de ADN sintético o modificado por ingeniería que pueda dirigir a las ARN polimerasa II o III hacia la transcripción descendente de secuencias que codifican ARN. Además, el promotor o promotores de ARN polimerasa II o III (Pol II o III) empleados como parte del vector genómico viral, puede ser inducible. Se puede emplear cualquier promotor de Pol II o III inducible con los métodos descritos en la presente memoria. Promotores de Pol II o III particularmente adecuados incluyen a promotores de la respuesta a tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, *Human Gene Therapy*, 11:577-585 (2000) y en Meissner et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:1672-1682 (2001).

Un potenciador interno puede presentarse también en el vector de expresión recombinante, que incluye un vector genómico viral, para incrementar la expresión de la secuencia de polinucleótidos de interés. Por ejemplo, se puede usar el potenciador CMV (véase, por ejemplo, Boshart et al., *Cell* 41:521, 1985). Se han identificado y caracterizado muchos potenciadores en genomas virales, tal como VIH, CMV, y genomas de mamíferos (véase, por ejemplo, bases de datos disponibles públicamente, tales como GenBank). Un potenciador se puede usar en combinación con un promotor heterólogo. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar el potenciador adecuado en base al patrón de expresión deseado.

Cuando el suministro diana del vector de expresión recombinante, que incluye un vector genómico viral, se dirige hacia una célula diana particular, el vector genómico normalmente contendrá un promotor que es reconocido por la célula diana y que se une operativamente a la secuencia de interés, a componentes virales (cuando el vector es un vector viral), y a otras secuencias discutidas en la presente memoria. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ácido nucleico que permite la unión a la ARN polimerasa y que ocurra la transcripción. Los promotores pueden ser inducibles, constitutivos, activos temporalmente o específicos de tejidos. La actividad de los promotores inducibles se induce mediante la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los promotores inducibles pueden ser una herramienta útil en ingeniería genética ya que la expresión de los genes a los que se une operativamente se pueden activar o desactivar en determinadas etapas del desarrollo de un organismo, su producción, o en tejidos particulares. Los promotores inducibles se pueden agrupar como promotores regulados químicamente, y promotores regulados físicamente. Promotores típicos regulados químicamente incluyen, pero no se limitan a, promotores regulados por alcohol (por ejemplo, promotor del gen alcohol deshidrogenasa I (alcA)), promotores regulados por tetraciclina (por ejemplo, promotor de la respuesta a tetraciclina), promotor regulado por esteroide (por ejemplo, promotor basado en el receptor de glucocorticoide de rata (GR), promotor basado en el receptor de estrógeno humano (ER), promotor basado en el receptor de ecdisoma de polilla, y los promotores basados en la superfamilia del receptor de esteroide/retinoide/ tiroideo), promotores regulados por metales (por ejemplo, promotores basados en el gen de metalotioneína), y promotores relacionados con la patogénesis (por ejemplo, promotores basados en la proteína Arabidopsis y la relacionada con el patógeno del maíz (PR)). Promotores típicos regulados físicamente incluyen, pero no se limitan a, promotores regulados por la temperatura (por ejemplo, promotores de choque térmico), y promotores regulados por la luz (por ejemplo, promotor SSU de soja). Otros ejemplos de promotores se describen en otros sitios, por ejemplo, en patentes y solicitudes de patentes publicadas que se pueden identificar mediante la búsqueda de la Patente U.S. y bases de datos en la Oficina de Marcas y Patentes.

Un experto en la técnica será capaz de seleccionar un promotor adecuado en base a las circunstancias específicas. En la técnica se conocen bien muchos promotores diferentes, como son los métodos para la unión de manera operativa del promotor a la secuencia de polinucleótidos a expresar. Se pueden emplear ambas secuencias promotoras nativas y muchos promotores heterólogos para dirigir la expresión en la célula de envasado y la célula diana. Los promotores heterólogos se usan normalmente porque en general permiten una gran transcripción y altos rendimientos de la proteína deseada en comparación con el promotor nativo.

El promotor se puede obtener, por ejemplo, a partir del genoma de virus, tal como virus polioma, virus de la viruela, adenovirus, virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, y virus del simio 40 (SV 40). El promotor puede ser también, por ejemplo, un promotor de mamífero heterólogo, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, un promotor de choque térmico, o el promotor asociado normalmente con la secuencia nativa, proporciona tales promotores que son compatibles con la células

diana. En una realización, el promotor es el promotor viral que aparece de manera natural en un sistema de expresión viral. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de células dendríticas. El promotor específico de células dendríticas puede ser, por ejemplo, el promotor CD11c.

La transcripción se puede incrementar mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector o vectores.

5 Los potenciadores son normalmente elementos de ADN de acción cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pares de bases de longitud, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. En la actualidad se conocen muchas secuencias potenciadoras a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína-alfa, e insulina) y a partir de virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el borde final del origen de replicación (100-270 pares de bases), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el borde final del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede unir en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de polinucleótidos específica del antígeno, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

15 Los vectores de expresión pueden contener también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias se encuentran a menudo en el 5' y, ocasionalmente en 3', regiones sin traducir de ADNs eucariotas o virales de cADNs y, son bien conocidas en la técnica.

Un constructo de expresión recombinante, que incluye un vector génico viral, puede contener también elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que se pueden incluir en el constructo no se limitan de ningún modo y se pueden elegir para alcanzar un resultado particular. Por ejemplo, se puede incluir una señal que facilita la entrada al núcleo del vector de expresión recombinante o del genoma viral en la célula diana. Un ejemplo de tal señal es la señal en la solapa de VIH-1. Se pueden incluir secuencias reguladoras adicionales que faciliten la caracterización del sitio de incorporación del provirus en la célula diana. Por ejemplo, se puede incluir en el constructo una secuencia ARNt supresora ámbra. Se puede incluir también en el constructo del genoma viral una secuencia aislante, por ejemplo, a partir de β -globina de pollo. Este elemento reduce la posibilidad de silenciar un provirus incorporado en la célula diana debido a efectos de metilación y hetero-cromatinización. Además, el aislante puede proteger al potenciador interno, promotor y a las secuencias de polinucleótidos exógenas de efectos posicionales positivos o negativos desde el ADN circundante en el sitio de incorporación en el cromosoma. Además, el constructo recombinante, incluyendo el genoma del vector, puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para mejorar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede localizar en el constructo un elemento de respuesta al virus de la hepatitis de marmota (WRE) (véase, por ejemplo, Zufferey et al. 1999. *J. Virol.* 74:3668-81; Deglon et al., 2000. *Human Gene Ther.* 11:179-90).

35 Cuando el vector de expresión recombinante es un vector génico viral, el vector génico viral se construye normalmente en un plásmido que se puede transfectar en una línea celular productora o de envasado para la producción del constructo del genoma del vector viral. El plásmido comprende generalmente secuencias útiles para la replicación del plásmido en la bacteria. Tales plásmidos son bien conocidos en la técnica. Además, vectores que incluyen un origen de replicación procariota pueden incluir también un gen cuya expresión confiere un marcador detectable o seleccionable, tal como una resistencia farmacológica. Los típicos productos de resistencia farmacológica bacteriana son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina.

En determinadas configuraciones, los vectores de expresión recombinante contienen secuencias de polinucleótidos que codifican factores de maduración/estimulación de células dendríticas (DC). Ejemplos de moléculas estimuladoras incluyen GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, Ligando CD40 (CD40L), CD40 inducible a fármacos (iCD40), y similares. Estos polinucleótidos están normalmente bajo el control de uno o más elementos reguladores que dirigen la expresión de las secuencias codificantes en las células dendríticas. En determinadas realizaciones particulares, un vector de expresión recombinante queda excluido para dirigir la expresión e incluye una secuencia de nucleótidos que codifica tanto el inmunógeno como a GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos y monocitos). La maduración de las células dendríticas contribuye al éxito de la vacunación (véase, por ejemplo, Banchereau et al., *Nat. Rev. Immunol.* 5:296-306 (2005); Schuler et al., *Curr. Opin. Immunol.* 15:138-147 (2003); Figdor et al., *Nat. Med.* 10:475-480 (2004)). La maduración puede transformar las DCs de las células implicadas activamente en la captura de un antígeno en las células especializadas para células T de cebado. Por ejemplo, la participación de CD40 mediante CD40L en células T CD4 helper es una señal crítica para la maduración de DC, dando como resultado una potente activación de las células T CD8+. Tales moléculas estimuladoras se refieren también como factores de maduración o factores estimuladores de maduración. Los puntos de control inmunológicos que representan barreras significativas para la activación de la inmunidad celular funcional en el cáncer, y anticuerpos antagonistas específicos para ligandos inhibidores sobre células T que incluyen CTLA4 y muerte programada 1(PD-1), son ejemplos de agentes diana que se están evaluando en las clínicas. Un mecanismo de tolerancia significativa en infecciones crónicas y en el cáncer es el agotamiento funcional de las células T específicas del antígeno que expresan altos niveles de PD-1. Como se ha demostrado que la potencia de la inmunización terapéutica se mejora significativamente mediante la combinación con el punto de control inmunológico, como ejemplo no limitante, se puede apreciar por los expertos habituales en la técnica que un enfoque alternativo para inhibir la expresión del punto de control inmunológico es inhibir la expresión de los ligandos de muerte programada (PD) uno o dos (PD-L1/L2). Una forma de lograr la inhibición es mediante la expresión de moléculas de ARN, tal como las que se describen en la presente memoria, las cuales suprimen la expresión de PD-L1/L2 en las DCs transducidas con un vector génico viral, tal como el vector génico de lentivirus,

que codifica una o más de las moléculas relevantes. La maduración de DCs o la expresión de elementos particulares tales como los puntos de control inmunológicos, por ejemplo, los ligandos PD-1, se pueden caracterizar mediante análisis por citometría de flujo de regulación al alza de marcadores de superficie, tales como MHC II, y caracterizando las quimioquinas y citoquinas expresadas, por ejemplo, mediante la realización de técnicas y métodos descritos en la presente memoria.

Se puede incluir una secuencia que codifica un producto detectable, normalmente una proteína, para permitir la identificación de células que expresan el inmunógeno deseado. Por ejemplo, se incorpora en el constructo de expresión recombinante una proteína marcadora fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde (GFP), junto con una secuencia de polinucleótidos de interés (es decir, que codifica al menos un inmunógeno). En otras realizaciones, la proteína puede ser detectable mediante un anticuerpo, o la proteína puede ser una enzima que actúa sobre un sustrato para producir un producto detectable, o puede ser un producto proteico que permita la selección de una célula diana transfectada o transducida, por ejemplo, que confiere resistencia farmacológica, tal como resistencia a higromicina. Genes de selección típicos conocidos en la técnica que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas adecuadas para usar en células eucariotas, por ejemplo, neomicina, metotrexato, blasticidina, entre otros, o que complementan deficiencias auxotróficas, o que suministran nutrientes críticos retenidos en el medio. El marcador seleccionable se puede presentar opcionalmente en un plásmido separado e introducirse mediante co-transfección.

Con respecto a las partículas del vector descritas en la presente memoria, se pueden usar una o más unidades de expresión multicistrónicas que incluyen dos o más secuencias de polinucleótidos que codifican un inmunógeno, y una secuencia que codifica una molécula de envoltura como se describe en la presente memoria o uno o más factores de maduración DC necesarios para la producción de la partícula del vector deseado en células de envasado. El empleo de vectores multicistrónicos reduce el número total de moléculas de ácido nucleico requerido y, por tanto, puede prevenir posibles dificultades asociadas con la coordinación de la expresión a partir de vectores génicos múltiples. En un vector multicistrónico los distintos elementos a expresar se unen operativamente a uno o más promotores (y a otros elementos de control de la expresión según sea necesario). En algunas configuraciones, un vector multicistrónico comprende una secuencia que codifica al menos un inmunógeno (es decir, uno o más) de interés, una secuencia que codifica un producto, y una secuencia que codifica uno o más componentes de la partícula del vector. En determinadas realizaciones en las que el constructo recombinante comprende un polinucleótido que codifica un inmunógeno, el constructo codifica opcionalmente un factor de maduración de DC. En determinadas realizaciones, un vector multicistrónico comprende secuencias de polinucleótidos que codifican cada una un inmunógeno, un factor de maduración de DC, y opcionalmente componentes virales cuando el vector de expresión es un vector de expresión viral. En otras realizaciones, los vectores multicistrónicos dirigen la expresión y codifican al menos dos o más inmunógenos.

Se puede separar cada uno de los componentes del vector de expresión multicistrónico, por ejemplo, mediante un elemento IRES (sitio interno de entrada al ribosoma, de sus siglas en inglés) o un elemento 2A viral, para permitir separar la expresión de las diferentes proteínas a partir del mismo promotor. Los elementos IRES y los elementos 2A son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 4.937.190; de Felipe et al. 2004. *Traffic* 5:616-626). En una realización, se emplean oligonucleótidos tales como secuencias de sitio de separación de furin (RAKR) (véase, por ejemplo, Fang et al. 2005 *Nat. Biotech.* 23:584-590) unidos a secuencias similares a 2A a partir de virus de enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV, de sus siglas en inglés); virus A de la rinitis equina (ERAV); y el virus thosa asigna (TaV) (véase, por ejemplo, Szymczak et al. 2004 *Nat. Biotechnol.* 22:589-594) para separar elementos genéticos en un vector multicistrónico. La eficacia de un vector multicistrónico particular se puede ensayar fácilmente mediante la detección de la expresión de cada uno de los genes empleando protocolos estándar.

En un ejemplo específico, un vector génico viral comprende: una secuencia potenciadora/promotora de citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 a partir del LTR5' de VIH; una secuencia de envasado (Ψ); la señal de solapa VIH-1; un potenciador interno; un promotor interno; un gen de interés; el elemento de respuesta al virus de la hepatitis de marmota; una secuencia supresora ARNt ámbar; un elemento U3 con una supresión de su secuencia potenciadora; el aislante de β -globina de pollo; y las secuencias R y U5 a partir del LTR3' de VIH. En algunos ejemplos, el vector génico comprende un LTR 5' lentiviral intacto y un LTR 3' auto-inactivante (véase, por ejemplo, Iwakuma et al. *Virology* 15:120, 1999).

La construcción del vector génico se puede realizar empleando cualquiera de las técnicas de ingeniería genética conocidas en la técnica, que incluyen, sin limitación, las técnicas estándar de digestión, ligación, transformación de la endonucleasa de restricción, purificación plasmídica, y secuenciación del ADN, por ejemplo, como se describen en Sambrook et al. (ediciones 1989 y 2001; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Coffin et al. (*Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)); y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann., Ed., Oxford University Press, (2000)).

Se pueden emplear también vectores construidos para la expresión transitoria de células de mamífero. La expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula hospedadora, tal que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles de un polipéptido codificado mediante el polinucleótido específico del inmunógeno en el vector de expresión. Véase Sambrook et al., anteriormente citado, pp 16.17-16.22, 1989. Otros vectores y métodos adecuados

para la adaptación a la expresión de polipéptidos son bien conocidos en la técnica y se adaptan fácilmente a las circunstancias específicas.

5 Mediante el empleo de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria y el conocimiento en la técnica, un experto en la técnica reconocerá que la eficacia de un sistema de expresión particular se puede ensayar mediante la transfección de las células de envasado con un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína y que mide la expresión empleando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia a partir de un conjugado proteico fluorescente verde. Otros genes adecuados son bien conocidos en la técnica.

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

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Mejora de la inmunogenicidad basada en células T CD4 frente a la proteína gD2 de VHS-2 cuando se formula con el adyuvante GLA-SE tras vacunaciones múltiples en ratones

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de GLA-SE para aumentar las respuestas de células T CD4 después de la inmunización en ratones con una vacuna proteica recombinante.

15 Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c a través de un régimen de inmunización de cebado/refuerzo (cebado d0/refuerzo d21) bien con 0,8, 4, ó 20 µg de proteína gD recombinante en combinación con 0,8, 4, ó 20 µg de GLA-SE (porcentaje de SE del 2% en este y todos los estudios de a continuación), SE en solitario, o PBS, suministrado intramuscularmente en 100 µl (50 µl en cada pata). Los ratones inmunizados con GLA-SE, SE en solitario, o PBS en ausencia de proteína recombinante sirvieron como controles negativos. Se midieron las respuestas de las células T CD4 esplénicas específicas del antígeno en el día 4 después del refuerzo mediante tinción de citoquina intracelular (ICS) para IFN-γ, IFN-α, y IL-2 después de la re-estimulación ex vivo de cultivos de esplenocitos durante 5 horas con péptido gD₂₇₂₋₂₈₅, que se había identificado previamente como un epítipo de células T CD4 en gD2 que se presenta en ratones con el haplotipo H-2d. Como se representa en la Figura 2, se observó una respuesta de células T CD4 a la inmunización con cada una de las dosis de proteína recombinante gD2 sólo cuando se incluyó bien GLA-SE o bien SE como adyuvante. Para cada dosis del antígeno gD2 recombinante y cada dosis de GLA-SE, la magnitud de la respuesta de células T CD4 específicas para gD2 se incrementó sobre la respuesta observada para la misma cantidad de antígeno gD2 recombinante formulado con SE en solitario. Además, se midió la calidad de la respuesta de la población de células T CD4 específicas del antígeno mediante la frecuencia de IFN-γ+, TNF-α+, y IL-2+ de células T CD4 (triple positivo) dentro de la respuesta de la población de células T CD4 en cada dosis de proteína gD2 recombinante y en cada dosis de GLA sobre la observada cuando se formuló con SE en solitario. Los datos a partir de este estudio indican que la formulación del adyuvante GLA-SE con el antígeno de la proteína VHS-2 recombinante aumenta sustancialmente el rendimiento de la vacuna sobre el que se alcanza mediante la inmunización con la proteína recombinante en solitario o la proteína recombinante formulada con SE en solitario, tanto en la magnitud como en la calidad de la respuesta inmunológica celular.

35 Ejemplo 2

GLA aumenta la respuesta de células T CD8 en ratones

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de GLA-SE para aumentar las respuestas de células T CD8 después de la inmunización en ratones con una vacuna proteica recombinante.

40 Se usó ovoalbúmina como proteína modelo. A ratones hembra C57B1/6 se les inyectó s.c. con una ovoalbúmina que codifica lentivirus ("LV-OVA" en las Figuras 3 y 4) y en el día 21 se reforzó mediante inyección i.m. con ovoalbúmina recombinante adyuvada con varias dosis de GLA-SE ("OVA+GLA/SE" en las Figuras 3 y 4). Cuatro días después, se midieron las respuestas de las células T esplénicas mediante la tinción de citoquina intracelular (ICS) para los siguientes estimulantes in vitro: péptidos 55-62 y 257-264 MHC Clase I OVA y péptidos 323-339 MHC Clase II, o anticuerpos para CD3 y CD28. Las células T CD8 se identificaron como aquellas que secretan cualquier citoquina, IFN-γ, IL-2, y TNF-α.

45 Como se muestra en la Figura 3, había un mayor porcentaje de células T CD8 en los ratones que recibieron un refuerzo del antígeno, con los porcentajes más altos en los ratones que recibieron GLA-SE con el antígeno en el refuerzo. La Figura 4 proporciona un detalle experimental de las proporciones de cuatro subgrupos de células T CD8. Por lo tanto, una vacuna i.m. 'de refuerzo' con proteína OVA recombinante + GLA-SE reforzó a las células T CD8 pre-existentes que se habían generado a través de la vacunación LV anterior. Las dosis medias (4 µg) y bajas (0,8 µg) de GLA proporcionaron el incremento más alto de células T CD8 bajo estos contextos experimentales. Por lo tanto, estos datos muestran que la proteína adyuvada con GLA se puede emplear para reforzar una respuesta específica para la proteína de células T CD8 de memoria pre-existentes. La activación de células de memoria CD8 se considera que es una propiedad deseable en una vacuna terapéutica frente a VHS-2 para el tratamiento de individuos infectados, recalcando las mayores propiedades que la proteína adyuvada con GLA puede conferir a una vacuna para el VHS-2.

Ejemplo 3

Inmunogenicidad basada en células T CD4 frente a las proteínas individuales, gD2, UL19, y UL25 de VHS-2 tras vacunaciones múltiples en ratones

5 El objetivo de este grupo de estudios era identificar una cepa de ratón simple en la que se pudiera evaluar la inmunogenicidad basada en células T CD4 frente a cada subunidad proteica de la vacuna. Para este fin, se realizó una serie de experimentos en ratones para identificar epítomos de células T CD4 individuales dentro de cada antígeno de VHS-2 (es decir, gD2, UL19, y UL25) en el contexto de diferentes haplotipos de MHC (es decir, BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b), y CB6F1 (H-2^d + 2^b)). La estrategia experimental consistió en la inmunización de ratones sin tratamiento previo con 5 µg de cada uno de los antígenos de la proteína recombinante como un inmunógeno monovalente formulado con 5 µg de GLA-SE inyectado intramuscularmente en 100 µl (50 µl en cada pata) en el contexto de un régimen de inmunización de cebado/refuerzo (d0 cebado/d21 refuerzo). Se analizaron las respuestas de las células T CD4 específicas para el antígeno 4 días después del refuerzo empleando bibliotecas de péptidos de 15 mer (superposición de 11 aa entre péptidos) cuyas secuencias se derivaban a partir de la secuencia de aminoácidos del inmunógeno monovalente correspondiente. En los cribados primarios, se analizaron las células CD4 esplénicas para la producción de IFN-γ, TNF-α, y IL-2 en respuesta a la estimulación ex vivo de cultivos de esplenocitos con agrupaciones de péptidos de 15-mer a partir de la biblioteca de péptidos que corresponde al antígeno que codifica el VHS-2 individual. Las respuestas de las células T CD4 observadas en las agrupaciones de péptidos se consideraron resultados positivos, y posteriormente se realizaron cribados secundarios (y en algunos casos terciarios) con una inmunización idéntica y estrategias de análisis empleando bien péptidos individuales dentro de las agrupaciones positivas a partir del cribado previo como estimulantes ex vivo, o bien péptidos en las agrupaciones positivas a partir del cribado re-agrupado anterior en diferentes combinaciones. Como se muestra en las Figuras 5A-B, estos estudios identificaron péptidos 15-mer individuales frente a los que se pudo observar una respuesta de células T CD4 específica del antígeno para cada una de las proteínas individuales de VHS-2 recombinantes dentro de la vacuna (es decir, gD2, UL19, y UL25) dentro del contexto del haplotipo H-2b de MHC (ratones C57BL/6).

Ejemplo 4

Inmunogenicidad basada en células B y células T CD4 frente a cada una de las subunidades individuales de la proteína de VHS-2 tras vacunaciones múltiples de una formulación trivalente en ratones

30 Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad basada en células B y en células T CD4 frente a cada una de las subunidades individuales de la proteína recombinante dentro de la vacuna cuando se suministran juntas como una formulación trivalente con GLA-SE en ratones C57BL/6. La estrategia experimental consiste en usar dos grupos de cinco ratones C57BL/6. Un grupo se inmunizó a través de un régimen de inmunización de cebado/refuerzo (cebado d0/refuerzo d21) con proteínas gD2, UL19 y UL25 de VHS-2 recombinante suministradas en combinación y formuladas en una base equi-molar (0,8, 3,3, y 1,4 µg de proteína, respectivamente) en combinación con 5,5 µg de GLA-SE suministrada intramuscularmente en 100 µl (50 µl en cada pata). En el segundo grupo se simuló la inmunización con el vehículo (PBS). Los animales se sacrificaron el día 4 después del refuerzo para recoger los bazo y la sangre periférica (a través de una punción cardíaca). Se midieron las repuestas de las células T CD4 esplénicas específicas del antígeno mediante ICS para IFN-γ, TNF-α, y IL-2 después de la re-estimulación ex vivo de los cultivos de esplenocitos con péptidos de 15-mer identificados previamente por contener epítomos de células T CD4 para cada uno de los inmunógenos de la proteína recombinante dentro de la vacuna trivalente (véase el Ejemplo 3). Se analizó el suero de cada uno de los ratones con la simulación de la vacuna y vacunados para la presencia de anticuerpos específicos del antígeno de la subclase IgG1 frente a cada uno de los inmunógenos de la proteína recombinante dentro de la vacuna trivalente mediante ELISA directa. Como se muestran en las Figuras 6A-B, se observaron respuestas del anticuerpo y de células T CD4 específicas para el antígeno para cada uno de los antígenos de la proteína recombinante de VHS-2 cuando se suministran juntos como una formulación trivalente con GLA-SE. Estos datos apoyan la significativa inmunogenicidad de la vacuna trivalente y su capacidad para obtener una respuesta inmunológica general (tanto humoral como celular) frente a proteínas de VHS-2. Inesperadamente, la magnitud de las respuestas inmunológicas generadas fueron mayores para el antígeno UL19. UL19 no se ha incluido nunca como componente para ninguna de las vacunas basada en subunidades recombinantes para el tratamiento o prevención de la infección por VHS-2 en seres humanos. Estos datos proporcionan la evidencia de que las vacunas reivindicadas presentan mejores propiedades que las vacunas de la técnica anterior.

Ejemplo 5

Respuestas de células T CD4 específicas del antígeno tras inmunizaciones simples y múltiples de UL19 de VHS-2 con GLA-SE en ratones

55 Este ejemplo muestra la inmunogenicidad basada en células T CD4 generada mediante inmunizaciones simples y repetidas de UL19 de VHS-2 formulada con GLA-SE en ratones. Para este estudio, dos grupos de cinco ratones C57BL/6 recibieron una inmunización y dos grupos de cinco ratones C57BL/6 recibieron dos inmunizaciones (separadas por 21 días) con 5 µg del antígeno de la proteína UL19 recombinante como un inmunógeno monovalente con 5 µg de GLA-SE. Los grupos de ratones se sacrificaron bien a los 4 o a los 10 días después de la inmunización

final para el análisis de las respuestas de células T CD4 específicas del antígeno. Las inmunizaciones que recibieron los grupos de análisis respectivos se escalonaron en el tiempo tal que los cuatro grupos de ratones se sacrificaron el mismo día para el análisis de la respuesta de células T CD4 específicas del antígeno. Se midió la respuesta de células T CD4 específicas del antígeno para el inmunógeno mediante la producción de IFN- γ , TNF- α , y IL-2 en respuesta a la estimulación ex vivo de los esplenocitos con los péptidos 15-mer de UL19 individuales números 250 y 297 que se había identificado previamente por contener epítopos de células T CD4 específicos para UL19 (véase el Ejemplo 3). Como se representa en las Figuras 7A-B, el día 4 después de la última inmunización se detectaron respuestas de células T CD4 específicas de UL19 sólo en los animales que recibieron dos inmunizaciones, mientras que las respuestas de células T CD4 específicas para UL19 se detectaron a los 10 días después de la inmunización dentro tanto del cebado como con el cebado/refuerzo del experimento. El día 10 después de la inmunización, la magnitud de la respuesta había aumentado considerablemente (~2,5 veces) en los animales que recibieron dos inmunizaciones en comparación con los que recibieron sólo una única inmunización. Estos descubrimientos muestran que la administración repetida de una vacuna que contienen una proteína recombinante de VHS-2 + GLA-SE es un mejor protocolo para incrementar la respuesta y la magnitud de la respuesta resultante de células T CD4 específica del antígeno.

Para evaluar la dependencia del incremento de la respuesta de células T CD4 después de la administración repetida de la vacuna en GLA-SE, se realizó un experimento similar cuyos grupos de ratones se inmunizaron con la proteína UL19 en solitario o con la proteína formulada con SE en solitario, o con GLA-SE. Los grupos de ratones se sacrificaron bien a los 5 ó 10 días después de la inmunización final para el análisis de las respuestas de células T CD4 específicas del antígeno. La respuesta de células T CD4 específicas del antígeno hacia el inmunógeno se midió mediante la producción de IFN- γ , TNF- α , y IL-2 en respuesta a la estimulación ex vivo de los esplenocitos con los péptidos 15-mer de UL19 individuales números 250 y 297 que se había identificado previamente por contener epítopos de células T CD4 específicos para UL19 (véase el Ejemplo 3). Como se representa en las Figuras 8A-B, los animales que recibieron dos inmunizaciones mostraron un incremento significativo de la respuesta de células T CD4 en comparación con los que recibieron sólo una única inmunización, confirmando los resultados del experimento anterior. Es importante que este experimento fuera dependiente del adyuvante GLA-SE, en los ratones que recibían dos inmunizaciones no mostraron respuestas significativas de las células T CD4 cuando el inmunógeno se administró en solitario o con SE en ausencia de GLA.

Ejemplo 6

Respuestas de células T CD4 específicas del antígeno tras la inmunización con vacuna trivalente de VHS formulada con GLA-SE en ratones

Este Ejemplo muestra que las respuestas de células T CD4 se pueden generar frente a cada una de las subunidades de una vacuna trivalente que comprende los antígenos gD2, UL19, y UL25 formulados en GLA-SE cuando las proteínas recombinantes se formulan sobre una base equi-molar así como equivalente en masa. Se inmunizaron grupos de ratones hembra C57BL/6 (5 ratones/grupo) con una vacuna trivalente en donde la proteína total era bien de 5 μ g ó 15 μ g sobre una base equi-molar o de masa equivalente. Los ratones recibieron una segunda inmunización con una formulación homóloga en el día 21 y se midieron las respuestas de las células T después de la re-estimulación ex vivo con un péptido adecuado mediante ICS cinco días después de la última inmunización. Como se muestra en la Figura 9, se generaron respuestas de células T CD4 específicas del epítipo frente a cada uno de los componentes individuales de las subunidades de la vacuna de VHS-2. Se observaron respuestas positivas tanto si los componentes de la proteína recombinante se formulaban sobre una base equi-molar como si se formulaban sobre una base de masa equivalente, indicando que las respuestas no se impactaban o alteraban significativamente en base a la composición de la proteína relativa a la vacuna.

Ejemplo 7

Mejora de la inmunogenicidad basada en anticuerpo frente a la proteína gD2 de VHS-2 cuando se formula con el adyuvante GLA-SE tras vacunaciones múltiples en ratones

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de GLA-SE para aumentar las respuestas de células T CD4 tras la inmunización de ratones con una vacuna de proteína recombinante.

Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c a través de un régimen de inmunización de cebado/refuerzo (cebado d0/refuerzo d21) con 4 μ g de proteína gD recombinante en combinación con bien 4 μ g de GLA-SE, SE en solitario, o vehículo PBS, suministrados intramuscularmente en 100 μ l (50 μ l por pata). Se midieron por ELISA los anticuerpos específicos para gD2 de VHS-2 de IgG, IgG1, y los isotipos IgG2a. Como se representa en la Figura 10, el adyuvante GLA-SE mejoró la respuesta de IgG total frente a gD2 de VHS-2, redujo la producción de IgG1 específico del antígeno, e incrementó la producción de IgG2a específico del antígeno.

Ejemplo 8

Mejora de la inmunogenicidad basada en células T CD8 frente a la proteína UL19 de VHS-2 cuando se formula con el adyuvante GLA-SE

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de GLA-SE para inducir las respuestas de células T CD8 específica de UL-19 de VHS-2 funcional tras la inmunización de ratones con una vacuna trivalente que contiene el dominio superior de UL19, gD2 de VHS-2 (UL19ud; SEQ ID NO:12), y UL25.

5 A grupos de cinco ratones C57BL/6 se les proporcionó una inmunización intramuscular única de vacuna trivalente que consiste en 5 µg cada uno de gD2 recombinante, UL19ud, y UL25 en combinación con bien 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5%. Los ratones inmunizados sólo con el vehículo sirvieron como controles negativos. Se midieron las respuestas de las células T CD4 y CD8 esplénicas específicas del antígeno en el día 6 después de la inmunización mediante tinción de citoquina intracelular (ICS) para IFN-γ, TNF-α, y IL-2 en respuesta a la re-estimulación ex vivo de los cultivos de esplenocitos con los péptidos gD2, UL19, o UL25, durante 5 horas. Como se representa en la Figura 11, panel A, se observó una respuesta de células T CD4 para cada componente de la vacuna trivalente (gD2, UL19, y UL25) cuando se incluyó GLA-SE como adyuvante. Especialmente, como se representa en la Figura 11, panel B, se observó una respuesta de células T CD8 frente al antígeno UL19ud cuando se proporciona con GLA-SE. Para confirmar que estas células T CD8 eran funcionales, a los ratones que no se inmunizaron o que se inmunizaron cuatro semanas antes con la vacuna trivalente con GLA-SE se les administró subcutáneamente virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-) y se midieron las respuestas de las células T CD8 mediante ICS. Como se representa en la Figura 11, panel C, la magnitud de la respuesta de células T CD8 en el reto viral fue mayor en los ratones previamente inmunizados con la vacuna.

Ejemplo 9

20 Mejora de la eficacia antiviral profiláctica de la vacuna proteica de VHS-2 cuando se formula con el adyuvante GLA-SE

En este ejemplo, se ensayó la eficacia de GLA-SE para mejorar la capacidad de una vacuna de proteína VHS-2 bivalente recombinante para proteger frente a un desafío letal de VHS-2.

25 A grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, separadas por 28 días, de una vacuna bivalente que consiste en 5 µg cada componente de gD2 recombinante y UL19ud en combinación con bien 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5%. Los ratones inmunizados con 5 µg de GLA-SE en solitario sirvieron como controles negativos. A los 22 días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona depot y seis días después se les administró intravaginalmente una dosis 50xLD₅₀ de VHS-2 de tipo salvaje. Los ratones se monitorearon a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. En los días 1, 3, y 5 después de la infección, se recogieron muestras vaginales para la cuantificación mediante PCR del ADN de VHS-2. Aproximadamente dos meses después de la infección, se recogieron los ganglios de la raíz dorsal de los ratones supervivientes y se cuantificó mediante PCR el ADN de VHS-2 latente. Como se representa en la Figura 12, panel A, los ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE redujeron drásticamente la formación de lesiones e incrementaron la supervivencia en comparación con los ratones inmunizados bien con gD2 y UL19ud en solitario o GLA-SE en solitario. Asimismo, como se representa en la Figura 12, panel B, 9 de cada 10 ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE, no tenían ADN de VHS-2 detectable a los 5 días, mientras que los ratones de cualquier grupo de control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina a lo largo del día 5. Como se representa en la Figura 12, panel C, aunque había tres supervivientes en el grupo sólo con GLA-SE, 2 de cada 3 de estos ratones mostraban niveles significativos de VHS-2 latente en los ganglios de la raíz dorsal, los ratones inmunizados con gD2 y UL19ud con GLA-SE mostraron títulos pequeños o no detectables en los ganglios.

Ejemplo 10

Mejora de la expansión de células T CD8 de memoria pre-existentes mediante la vacuna proteica de VHS-2 recombinante cuando se formula con el adyuvante GLA-SE

45 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de GLA-SE para mejorar la capacidad de una vacuna de proteína VHS-2 trivalente recombinante para expandir células T CD8 de memoria inducidas previamente por infección de VHS-2.

50 Grupos de cinco ratones C57BL/6 se infectaron subcutáneamente con una dosis subletal de virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-). 28 días después, los ratones infectados o no infectados se inmunizaron con una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente de gD2 recombinante, UL19ud (SEQ ID NO:12), y UL25 en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de 5% de dextrosa. Los grupos de control incluían a los ratones infectados tratados con GLA-SE en solitario o con el vehículo en solitario, así como los ratones sin tratamiento previo tratados sólo con el vehículo. Seis días después de la inmunización se midieron por ICS las respuestas de las células T CD4 y CD8 específicas de UL19. Como se representa en la Figura 13, la frecuencia de las células T CD4 y CD8 específicas de UL19 era mayor después de la inmunización de los ratones previamente infectados, indicando que había un recuerdo de la infección inducida por células T de memoria. Significativamente, la expansión máxima de estas células T de memoria mediante la vacuna proteica recombinante requería la presencia del adyuvante GLA-SE.

Ejemplo 11

Capacidad de la vacuna proteica de VHS-2 recombinante para tratar el VHS-2 recurrente en cerdos de guinea

En este ejemplo, se ensayó la capacidad de una vacuna proteica de VHS-2 recombinante trivalente para reducir la frecuencia de lesiones recurrentes de VHS-2.

5 Se infectaron intravaginalmente grupos de siete cerdos de guinea con una dosis subletal de la cepa 333 del virus VHS-2. En los días 13 y 27 tras la infección, los cerdos de guinea se inmunizaron con una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente gD2 recombinante, UL19ud (véase, SEQ ID NO:12), y UL25 en combinación con 5 µg de GLA-SE. Los cerdos de guinea infectados tratados con GLA-SE en solitario sirvieron como controles negativos. Los animales se monitorearon a diario para observar las lesiones vaginales y se asignaron puntuaciones de 0-4 para cada lesión diaria. Se tomaron las medias de las puntuaciones de las lesiones diarias y se trazaron frente al tiempo. Como se representa en la Figura 14, los animales tratados con la vacuna trivalente más GLA-SE tenían aproximadamente un 50% de reducción en las lesiones recurrentes en comparación con los animales tratados con GLA-SE en solitario.

Ejemplo 12

15 Construcción de la proteína inmunogénica derivada de la glicoproteína de envoltura de VHS-2 y que contiene una secuencia líder

En este ejemplo, se construye una proteína inmunogénica a partir de secuencias de gD2 y que comprende la secuencia líder gD2.

20 La secuencia líder de gD2 tiene 40 aminoácidos de longitud (1-40 restos en SEQ ID NO:1). Se inserta en un vector de expresión una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de 100 aminoácidos (1-100 restos). Se usa la mutagénesis dirigida al sitio para cambiar los restos 38-42 de CysAlaLysTyr (SEQ ID NO:16) a GlyLeuAlaVal (SEQ ID NO:17) u otra secuencia que no se separe durante la síntesis proteica. Las células CHO (células derivadas de ovario de hámster chino, de sus siglas en inglés) se transformaron con el vector que contiene la secuencia alterada y se aisló la proteína gD2. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se inserta en un vector de expresión de baculovirus y se aísla la proteína a partir de células Sf9. La verificación de que la secuencia líder está presente se obtienen mediante análisis HPLC.

Ejemplo 13

Eficacia protectora de la vacuna proteica trivalente recombinante más GLA-SE frente al reto con VHS-2 virulento letal

30 En este ejemplo, se ensayó la capacidad de la vacuna de proteína de VHS-2 recombinante trivalente más adyuvante GLA para proteger frente a VHS-2 letal.

A grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, separadas por 28 días, de una vacuna trivalente que consiste en 5 µg de cada componente gD2 recombinante, UL19ud (véase, SEQ ID NO:12), y UL25 en combinación con bien 5 µg de GLA-SE o bien un vehículo de dextrosa al 5%. Los ratones inmunizados con 5 µg de GLA-SE en solitario sirvieron como controles negativos. Un grupo control adicional consistió en ratones inmunizados con 5 µg de de GLA-SE y 1 miligramo por ml de Aciclovir (ACV) en el agua de bebida comenzando 24 horas después del reto. Veintidós días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona depot y a continuación se sometieron seis días después a una dosis de 50xLD₅₀ de VHS-2 de tipo salvaje vía intravaginal. Los ratones se monitorearon a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. Los días 1, 3, y 5 después de la infección, se recogieron muestras vaginales para la cuantificación mediante PCR del ADN de VHS-2.

40 Como se representa en la Figura 15, los ratones inmunizados con la vacuna trivalente recombinante de gD2, UL19ud y UL25 con GLA-SE redujeron drásticamente la formación de lesiones (panel A) e incrementaron la supervivencia (panel B) en comparación con los ratones inmunizados bien con la vacuna proteica trivalente en solitario o bien con GLA-SE en solitario. Asimismo, como se representa en la Figura 16, 7 de los 10 ratones inmunizados con gD2/UL19ud/UL25 con GLA-SE no tuvieron ADN de VHS-2 vaginal detectable al día 5, mientras que los ratones en los tres grupos de control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina a lo largo del día 5. Los animales que recibieron aciclovir tenían también las mismas cargas elevadas de ADN de VHS-2 en los días 1, 3, y 5. Los animales que recibieron la vacuna activa de GLA-SE más gD2/UL19ud/UL25 tenían cargas virales notablemente inferiores, con muchos animales esterilizados (es decir, sin cargas virales detectables) el día 5.

50 En resumen, estos experimentos demuestran la eficacia protectora *in vivo* de GLA-SE + la vacuna proteica gD2/UL19ud/UL25 trivalente recombinante contra el desafío letal con VHS-2 virulento.

Ejemplo 14

Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en seres humanos

5 La seguridad y la inmugenicidad de los inmunógenos descritos anteriormente formulados con GLA-SE, o SE en solitario, se pueden evaluar en la fase 1A/1B del diseño experimental empleando sujetos VHS-2 seronegativos (dianas para la vacuna profiláctica) y en sujetos VHS-2 seropositivos (dianas de la vacuna inmunoterapéutica). El diseño del estudio se puede realizar siguiendo la Red de Ensayos de Vacunas contra el VIH (HVTN, de sus siglas en inglés), y se han empleado en 40 seres humanos en ensayos de la fase 1A de la vacuna contra el VIH-1 en los últimos 10 años.

10 El diseño de estos ensayos de Fase 1A consiste en un formato estandarizado de 12 sujetos por grupo (10 con vacuna – 2 placebos) y se basa en la capacidad para determinar un efecto adverso con un 15% de prevalencia. Se determinan también las vacunas que no son inmunogénicas (< de 2 de los 10 sujetos desarrollan inmunidad). En la Fase 1A del estudio del VHS-2, los sujetos reciben 3 inmunizaciones i.m. de 1 µg o 2,5 µg de GLA-SE en intervalos de 4 semanas. En la Fase 1A del ensayo se inmunizan un total de 48 sujetos seronegativos para VHS y seropositivos para el VHS-2 (seropositivos a VHS-1 o seronegativos a VHS-1).

15 Los sujetos VHS-2 seronegativos se determinaron mediante Western Blot en el día 0. Además de los ensayos de seguridad, los sujetos del estudio se pueden monitorear ante una posible vacuna que induce una respuesta inmunológica humoral y celular específica para el VHS-2, y monitorear la frecuencia de recurrencia de úlceras genitales (sólo para sujetos seropositivos a VHS-2). Para la población infectada por VHS-2, se pueden emplear dos momentos de pre-vacunación para establecer el anticuerpo para gD2. La inmunidad celular de proteínas recombinantes para el VHS-2 se puede ensayar mediante IFN-γELISPOT y ICS, y la inmunidad humoral específica para gD2 mediante ELISA y ensayos de anticuerpos neutralizantes.

20 De lo anterior se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas en la presente memoria con propósitos de ilustración, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immune Design Corp. Dubensky, et al.

5 <120> Vacunas para el VSH-2

<130> 31943/47733

10 <150> 61/647,764
<151> 16-05-2012

<150> 61/679,387
<151> 03-08-2012

15 <150> 61/714,158
<151> 15-10-2012

<160> 17

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

25 <213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30

ES 2 673 556 T3

Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln
 165 170 175
 Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val
 180 185 190
 Ile Asp Lys Ile Asn Thr Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr
 195 200 205
 Val Arg Asn Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu
 210 215 220
 Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Lys Val Ala Thr Arg Thr Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala
 245 250 255
 Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp
 260 265 270
 Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp
 275 280 285
 Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr
 290 295 300
 Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ser Pro Thr Thr
 325 330 335
 Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val
 340 345 350
 Pro Lys Arg Pro Ala Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp
 355 360 365
 Glu Met Leu Arg Ala Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp
 370 375 380
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Ser

ES 2 673 556 T3

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

Ser Arg Ala Asp Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile
660 665 670

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

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

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

Arg Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Cys Ala Phe Phe
725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Gly Asp Glu Asp Glu Leu
900

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 2

5

ES 2 673 556 T3

Met Gly Arg Leu Thr Ser Gly Val Gly Thr Ala Ala Leu Leu Val Val
 1 5 10 15

Ala Val Gly Leu Arg Val Val Cys Ala Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro
 20 25 30

Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro
 35 40 45

Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Lys Arg Val Tyr His
 50 55 60

Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile
 65 70 75 80

Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu
 85 90 95

His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu
 100 105 110

Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly
 115 120 125

Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro
 130 135 140

Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp
 145 150 155 160

Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe
 165 170 175

Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu
 180 185 190

Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His
 195 200 205

ES 2 673 556 T3

Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro
 210 215 220

Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
 225 230 235 240

Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val
 245 250 255

Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Pro Pro
 260 265 270

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala
 275 280 285

Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
 290 295 300

Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
 305 310 315 320

Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro His His Ala Pro Ala Ala Pro
 325 330 335

Ser Asn Pro Gly Leu Ile Ile Gly Ala Leu Ala Gly Ser Thr Leu Ala
 340 345 350

Val Leu Val Ile Gly Gly Ile Ala Phe Trp Val Arg Arg Arg Ala Gln
 355 360 365

Met Ala Pro Lys Arg Leu Arg Leu Pro His Ile Arg Asp Asp Ala
 370 375 380

Pro Pro Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
 385 390

<210> 3

<211> 306

<212> PRT

5 <213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 3

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
 1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
 20 25 30

10

ES 2 673 556 T3

Gly Val Lys Arg Val Tyr His Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe
 35 40 45

Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
 50 55 60

Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
 65 70 75 80

Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr
 85 90 95

Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val
 100 105 110

Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro
 115 120 125

Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val
 130 135 140

Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
 145 150 155 160

Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile
 165 170 175

Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala
 180 185 190

Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr
 195 200 205

Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile
 210 215 220

Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
 225 230 235 240

Trp His Gly Pro Lys Pro Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu
 245 250 255

Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser
 275 280 285

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro
 290 295 300

His His
 305

5 <210> 4
 <211> 1374
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

ES 2 673 556 T3

<400> 4

Met Ala Ala Pro Ala Arg Asp Pro Pro Gly Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Met Val Pro Thr Gly Ser Ile Leu Ser Thr Ile Glu Val Ala Ser His
 20 25 30

Arg Arg Leu Phe Asp Phe Phe Ala Arg Val Arg Ser Asp Glu Asn Ser
 35 40 45

Leu Tyr Asp Val Glu Phe Asp Ala Leu Leu Gly Ser Tyr Cys Asn Thr
 50 55 60

Leu Ser Leu Val Arg Phe Leu Glu Leu Gly Leu Ser Val Ala Cys Val
 65 70 75 80

Cys Thr Lys Phe Pro Glu Leu Ala Tyr Met Asn Glu Gly Arg Val Gln
 85 90 95

Phe Glu Val His Gln Pro Leu Ile Ala Arg Asp Gly Pro His Pro Val
 100 105 110

Glu Gln Pro Val His Asn Tyr Met Thr Lys Val Ile Asp Arg Arg Ala
 115 120 125

Leu Asn Ala Ala Phe Ser Leu Ala Thr Glu Ala Ile Ala Leu Leu Thr
 130 135 140

Gly Glu Ala Leu Asp Gly Thr Gly Ile Ser Leu His Arg Gln Leu Arg
 145 150 155 160

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

Glu Arg Gly Thr Ala Asp Gln Met Leu His Val Leu Leu Glu Lys Ala
 180 185 190

5

ES 2 673 556 T3

Pro Pro Leu Ala Leu Leu Leu Pro Met Gln Arg Tyr Leu Asp Asn Gly
 195 200 205

Arg Leu Ala Thr Arg Val Ala Arg Ala Thr Leu Val Ala Glu Leu Lys
 210 215 220

Arg Ser Phe Cys Asp Thr Ser Phe Phe Leu Gly Lys Ala Gly His Arg
 225 230 235 240

Arg Glu Ala Ile Glu Ala Trp Leu Val Asp Leu Thr Thr Ala Thr Gln
 245 250 255

Pro Ser Val Ala Val Pro Arg Leu Thr His Ala Asp Thr Arg Gly Arg
 260 265 270

Pro Val Asp Gly Val Leu Val Thr Thr Ala Ala Ile Lys Gln Arg Leu
 275 280 285

Leu Gln Ser Phe Leu Lys Val Glu Asp Thr Glu Ala Asp Val Pro Val
 290 295 300

Thr Tyr Gly Glu Met Val Leu Asn Gly Ala Asn Leu Val Thr Ala Leu
 305 310 315 320

Val Met Gly Lys Ala Val Arg Ser Leu Asp Asp Val Gly Arg His Leu
 325 330 335

Leu Glu Met Gln Glu Glu Gln Leu Glu Ala Asn Arg Glu Thr Leu Asp
 340 345 350

Glu Leu Glu Ser Ala Pro Gln Thr Thr Arg Val Arg Ala Asp Leu Val
 355 360 365

Ala Ile Gly Asp Arg Leu Val Phe Leu Glu Ala Leu Glu Lys Arg Ile
 370 375 380

Tyr Ala Ala Thr Asn Val Pro Tyr Pro Leu Val Gly Ala Met Asp Leu
 385 390 395 400

Thr Phe Val Leu Pro Leu Gly Leu Phe Asn Pro Ala Met Glu Arg Phe
 405 410 415

Ala Ala His Ala Gly Asp Leu Val Pro Ala Pro Gly His Pro Glu Pro
 420 425 430

Arg Ala Phe Pro Pro Arg Gln Leu Phe Phe Trp Gly Lys Asp His Gln

ES 2 673 556 T3

Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala His Val Glu Ala Leu Ala Gln Leu Val
690 695 700

Asp Asp Phe Thr Leu Pro Gly Pro Glu Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ala
705 710 715 720

Glu Leu Asn His Leu Met Arg Asp Pro Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val
725 730 735

Trp Asp Cys Asp Gly Leu Met Arg His Ala Ala Leu Asp Arg His Arg
740 745 750

Asp Cys Arg Ile Asp Ala Gly Gly His Glu Pro Val Tyr Ala Ala Ala
755 760 765

Cys Asn Val Ala Thr Ala Asp Phe Asn Arg Asn Asp Gly Arg Leu Leu
770 775 780

His Asn Thr Gln Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Asp Arg Pro His
785 790 795 800

Arg Pro Ala Asp Trp Thr Val His His Lys Ile Tyr Tyr Tyr Val Leu
805 810 815

Val Pro Ala Phe Ser Arg Gly Arg Cys Cys Thr Ala Gly Val Arg Phe
820 825 830

Asp Arg Val Tyr Ala Thr Leu Gln Asn Met Val Val Pro Glu Ile Ala
835 840 845

Pro Gly Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Val Thr Asp Pro Ala His Pro
850 855 860

Leu His Pro Ala Asn Leu Val Ala Asn Thr Val Asn Ala Met Phe His
865 870 875 880

Asn Gly Arg Val Val Val Asp Gly Pro Ala Met Leu Thr Leu Gln Val
885 890 895

Leu Ala His Asn Met Ala Glu Arg Thr Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala
900 905 910

Ala Pro Asp Ala Gly Ala Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asn Met Arg Ile
915 920 925

Phe Asp Gly Ala Leu His Ala Gly Val Leu Leu Met Ala Pro Gln His
930 935 940

ES 2 673 556 T3

Leu Asp His Thr Ile Gln Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Val Leu Pro Val
 945 950 955 960

 His Ala Leu Phe Ala Gly Ala Asp His Val Ala Asn Ala Pro Asn Phe
 965 970 975

 Pro Pro Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg His Val Pro Leu Val Pro Pro
 980 985 990

 Ala Leu Gly Ala Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln
 995 1000 1005

 His Ala Arg Glu Ser Ala Ala Gly Glu Asn Ala Leu Thr Tyr Ala
 1010 1015 1020

 Leu Met Ala Gly Tyr Phe Lys Met Ser Pro Val Ala Leu Tyr His
 1025 1030 1035

 Gln Leu Lys Thr Gly Leu His Pro Gly Phe Gly Phe Thr Val Val
 1040 1045 1050

 Arg Gln Asp Arg Phe Val Thr Glu Asn Val Leu Phe Ser Glu Arg
 1055 1060 1065

 Ala Ser Glu Ala Tyr Phe Leu Gly Gln Leu Gln Val Ala Arg His
 1070 1075 1080

 Glu Thr Gly Gly Gly Val Ser Phe Thr Leu Thr Gln Pro Arg Gly
 1085 1090 1095

 Asn Val Asp Leu Gly Val Gly Tyr Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala
 1100 1105 1110

 Thr Val Arg Asn Pro Val Thr Asp Met Gly Asn Leu Pro Gln Asn
 1115 1120 1125

 Phe Tyr Leu Gly Arg Gly Ala Pro Pro Leu Leu Asp Asn Ala Ala
 1130 1135 1140

 Ala Val Tyr Leu Arg Asn Ala Val Val Ala Gly Asn Arg Leu Gly
 1145 1150 1155

 Pro Ala Gln Pro Leu Pro Val Phe Gly Cys Ala Gln Val Pro Arg
 1160 1165 1170

 Arg Ala Gly Met Asp His Gly Gln Asp Ala Val Cys Glu Phe Ile
 1175 1180 1185

ES 2 673 556 T3

Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe Arg Arg Pro Cys
 1190 1195 1200

Asn Pro Arg Gly Arg Ala Ala Gly Gly Val Tyr Ala Gly Asp Lys
 1205 1210 1215

Glu Gly Asp Val Ile Ala Leu Met Tyr Asp His Gly Gln Ser Asp
 1220 1225 1230

Pro Ala Arg Pro Phe Ala Ala Thr Ala Asn Pro Trp Ala Ser Gln
 1235 1240 1245

Arg Phe Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Asn Gly Ala Tyr His Leu
 1250 1255 1260

Asn Gly Ala Ser Pro Val Leu Ser Pro Cys Phe Lys Phe Phe Thr
 1265 1270 1275

Ala Ala Asp Ile Thr Ala Lys His Arg Cys Leu Glu Arg Leu Ile
 1280 1285 1290

Val Glu Thr Gly Ser Ala Val Ser Thr Ala Thr Ala Ala Ser Asp
 1295 1300 1305

Val Gln Phe Lys Arg Pro Pro Gly Cys Arg Glu Leu Val Glu Asp
 1310 1315 1320

Pro Cys Gly Leu Phe Gln Glu Ala Tyr Pro Ile Thr Cys Ala Ser
 1325 1330 1335

Asp Pro Ala Leu Leu Arg Ser Ala Arg Asp Gly Glu Ala His Ala
 1340 1345 1350

Arg Glu Thr His Phe Thr Gln Tyr Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Pro
 1355 1360 1365

Leu Lys Gly Leu Ser Leu
 1370

<210> 5

<211> 585

5 <212> PRT

<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 5

10 Met Asp Pro Tyr Tyr Pro Phe Asp Ala Leu Asp Val Trp Glu His Arg
 1 5 10 15

ES 2 673 556 T3

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

ES 2 673 556 T3

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

ES 2 673 556 T3

Asn Arg Thr Arg Thr Asn Thr Thr Pro Val Gly Glu Ile Ile Asn Ala
515 520 525

His Asp Ala Leu Gly Ile Gln Tyr Glu Gln Gly Leu Gly Leu Leu Ala
530 535 540

Gln Gln Ala Arg Ile Gly Leu Ala Ser Asn Ala Lys Arg Phe Ala Thr
545 550 555 560

Phe Asn Val Gly Ser Asp Tyr Asp Leu Leu Tyr Phe Leu Cys Leu Gly
565 570 575

Phe Ile Pro Gln Tyr Leu Ser Val Ala
580 585

<210> 6

<211> 696

5 <212> PRT

<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 6

Met Ser Val Arg Gly His Ala Val Arg Arg Arg Arg Ala Ser Thr Arg
1 5 10 15

Ser His Ala Pro Ser Ala His Arg Ala Asp Ser Pro Val Glu Asp Glu
20 25 30

Pro Glu Gly Gly Gly Gly Gly Leu Met Gly Tyr Leu Arg Ala Val Phe
35 40 45

Asn Val Asp Asp Asp Ser Glu Val Glu Ala Ala Gly Glu Met Ala Ser
50 55 60

Glu Glu Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Glu Ala Arg Gly His Pro Gly
65 70 75 80

Ser Arg Arg Ala Ser Glu Ala Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Arg Ala
85 90 95

Ser Phe Pro Arg Pro Arg Ser Val Thr Ala Arg Ser Gln Ser Val Arg
100 105 110

Gly Arg Arg Asp Ser Ala Ile Thr Arg Ala Pro Arg Gly Gly Tyr Leu
115 120 125

10 Gly Pro Met Asp Pro Arg Asp Val Leu Gly Arg Val Gly Gly Ser Arg
130 135 140

ES 2 673 556 T3

Val Val Pro Ser Pro Leu Phe Leu Asp Glu Leu Ser Tyr Glu Glu Asp
 145 150 155 160

Asp Tyr Pro Ala Ala Val Ala His Asp Asp Gly Ala Gly Ala Arg Pro
 165 170 175

Pro Ala Thr Val Glu Ile Leu Ala Gly Arg Val Ser Gly Pro Glu Leu
 180 185 190

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

Asp Glu Ser Val Arg Ser Ala Leu Ala Leu Gly His Pro Ala Gly Phe
 210 215 220

Tyr Pro Cys Pro Asp Ser Ala Phe Gly Leu Ser Arg Val Gly Val Met
 225 230 235 240

His Phe Ala Ser Pro Ala Asp Pro Lys Val Phe Phe Arg Gln Thr Leu
 245 250 255

Gln Gln Gly Glu Ala Leu Ala Trp Tyr Val Thr Gly Asp Ala Ile Leu
 260 265 270

Asp Leu Thr Asp Arg Arg Ala Lys Thr Ser Pro Ser Arg Ala Met Gly
 275 280 285

Phe Leu Val Asp Ala Ile Val Arg Val Ala Ile Asn Gly Trp Val Cys
 290 295 300

Gly Thr Arg Leu His Thr Glu Gly Arg Gly Ser Glu Leu Asp Asp Arg
 305 310 315 320

Ala Ala Glu Leu Arg Arg Gln Phe Ala Ser Leu Thr Ala Leu Arg Pro
 325 330 335

Val Gly Ala Ala Ala Val Pro Leu Leu Ser Ala Gly Gly Ala Ala Pro
 340 345 350

Pro His Pro Gly Pro Asp Ala Ala Val Phe Arg Ser Ser Leu Gly Ser
 355 360 365

Leu Leu Tyr Trp Pro Gly Val Arg Ala Leu Leu Gly Arg Asp Cys Arg
 370 375 380

Val Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Arg Met Thr Tyr Ile Ala Thr Gly Ala
 385 390 395 400

ES 2 673 556 T3

Leu Leu Ala Arg Phe Asn Pro Gly Ala Val Lys Cys Val Leu Pro Arg
 405 410 415

Glu Ala Ala Phe Ala Gly Arg Val Leu Asp Val Leu Ala Val Leu Ala
 420 425 430

Glu Gln Thr Val Gln Trp Leu Ser Val Val Val Gly Ala Arg Leu His
 435 440 445

Pro His Ser Ala His Pro Ala Phe Ala Asp Val Glu Gln Glu Ala Leu
 450 455 460

Phe Arg Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Gly Val Val Ala Ala Glu His
 465 470 475 480

Glu Ala Leu Gly Asp Thr Ala Ala Arg Arg Leu Leu Ala Thr Ser Gly
 485 490 495

Leu Asn Ala Val Leu Gly Ala Ala Val Tyr Ala Leu His Thr Ala Leu
 500 505 510

Ala Thr Val Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Ala Cys Gly Asp Ala Arg Arg
 515 520 525

Arg Arg Asp Asp Ala Ala Ala Ala Arg Ala Val Leu Ala Thr Gly Leu
 530 535 540

Ile Leu Gln Arg Leu Leu Gly Leu Ala Asp Thr Val Val Ala Cys Val
 545 550 555 560

Ala Leu Ala Ala Phe Asp Gly Gly Ser Thr Ala Pro Glu Val Gly Thr
 565 570 575

Tyr Thr Pro Leu Arg Tyr Ala Cys Val Leu Arg Ala Thr Gln Pro Leu
 580 585 590

Tyr Ala Arg Thr Thr Pro Ala Lys Phe Trp Ala Asp Val Arg Ala Ala
 595 600 605

Ala Glu His Val Asp Leu Arg Pro Ala Ser Ser Ala Pro Arg Ala Pro
 610 615 620

Val Ser Gly Thr Ala Asp Pro Ala Phe Leu Leu Glu Asp Leu Ala Ala
 625 630 635 640

Phe Pro Pro Ala Pro Leu Asn Ser Glu Ser Val Leu Gly Pro Arg Val
 645 650 655

Arg Val Val Asp Ile Met Ala Gln Phe Arg Lys Leu Leu Met Gly Asp
 660 665 670

Glu Glu Thr Ala Ala Leu Arg Ala His Val Ser Gly Arg Arg Ala Thr
 675 680 685

Gly Leu Gly Gly Pro Pro Arg Pro
 690 695

ES 2 673 556 T3

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus 2
 5
 <400> 7

 Gln Pro Arg Trp Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu
 1 5 10 15

 10 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

 15 <400> 8

 Ser Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val
 1 5 10 15

 20 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

 25 <400> 9

 Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln His Ala Arg
 1 5 10 15

 30 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

 <400> 10

 Cys Glu Phe Ile Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe
 35 1 5 10 15

 40 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

 <400> 11

 Met Asp Pro Tyr Tyr Pro Phe Asp Ala Leu Asp Val Trp Glu His
 45 1 5 10 15

 50 <210> 12
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Herpes Simplex Virus 2

 <400> 12

ES 2 673 556 T3

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

ES 2 673 556 T3

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

ES 2 673 556 T3

<212> ADN
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 14

5 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgcct gtactgggtc 240
 tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

<210> 15
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 15

10 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggctaata 180
 tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctctct ggtagacca 240
 gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca ctgottaagc ctcaataaag 300
 cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360
 15 atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

<210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> HSV-2 fragment

<400> 16

Cys Ala Lys Tyr
 1

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> HSV-2 modified fragment

<400> 17

Gly Leu Ala Val
 1

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende:
 - (a) (i) un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 que es un fragmento inmunogénico de al menos 100 aminoácidos del polipéptido UL19 que comprende 451-1054 restos de SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75% de aminoácidos 1-450 de SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75% de aminoácidos 1055-1374 de SEQ ID NO:4; o una variante inmunogénica del mismo que mantenga al menos el 85% de la identidad de aminoácidos sobre al menos 100 aminoácidos contiguos;
 - (ii) una proteína UL25 de VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la misma; y
 - (iii) una proteína gD2 de VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la misma;
 - (b) un lípido monoácido A (MALA) adyuvante; y
 - (c) un transportador aceptable farmacéuticamente.
2. La composición de la reivindicación 1 en donde el fragmento inmunogénico de UL19 tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:12.
3. La composición de la reivindicación 1 ó 2 en donde UL25 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el gD2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:2 ó 3.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el adyuvante MALA es GLA.
6. La composición de la reivindicación 5 en donde GLA está en forma de una emulsión de aceite en agua o está en una forma acuosa.
7. La composición de la reivindicación 6 en donde la emulsión de aceite en agua comprende escualeno.
8. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en un método para tratar una infección de VHS-2 en un sujeto.
9. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en un método para generar una respuesta inmunológica en un sujeto.
10. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en un método para inmunizar a un sujeto frente al VHS-2.
11. La composición para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en donde la composición es para la administración a través de una vía intradérmica, por mucosas, intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal, o vaginal.
12. La composición para usar en un método según cualquiera de las reivindicaciones 8-11 en donde el método comprende además la administración al sujeto de una segunda, tercera o cuarta composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende las proteínas o fragmentos inmunogénicos (a)(i), (a)(ii) y (a)(iii) de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

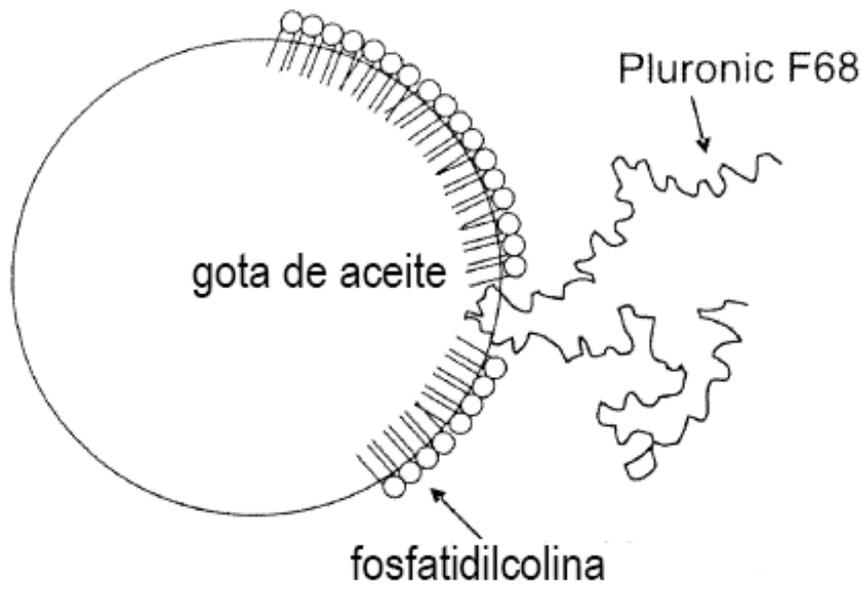
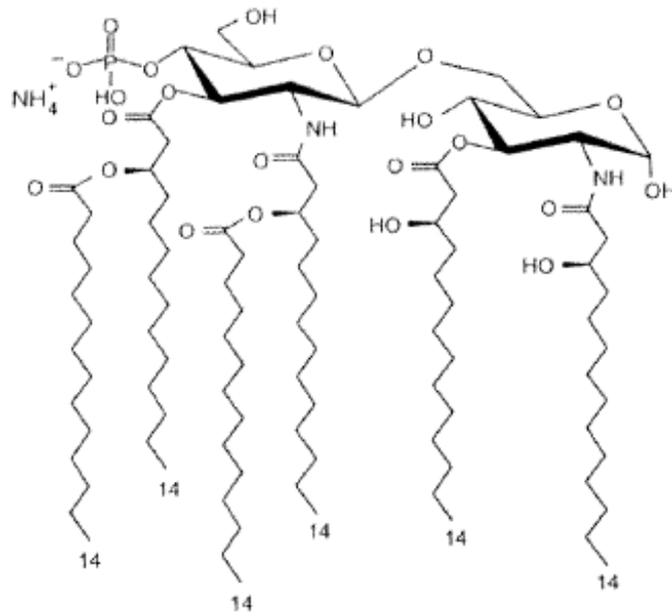


FIG. 1

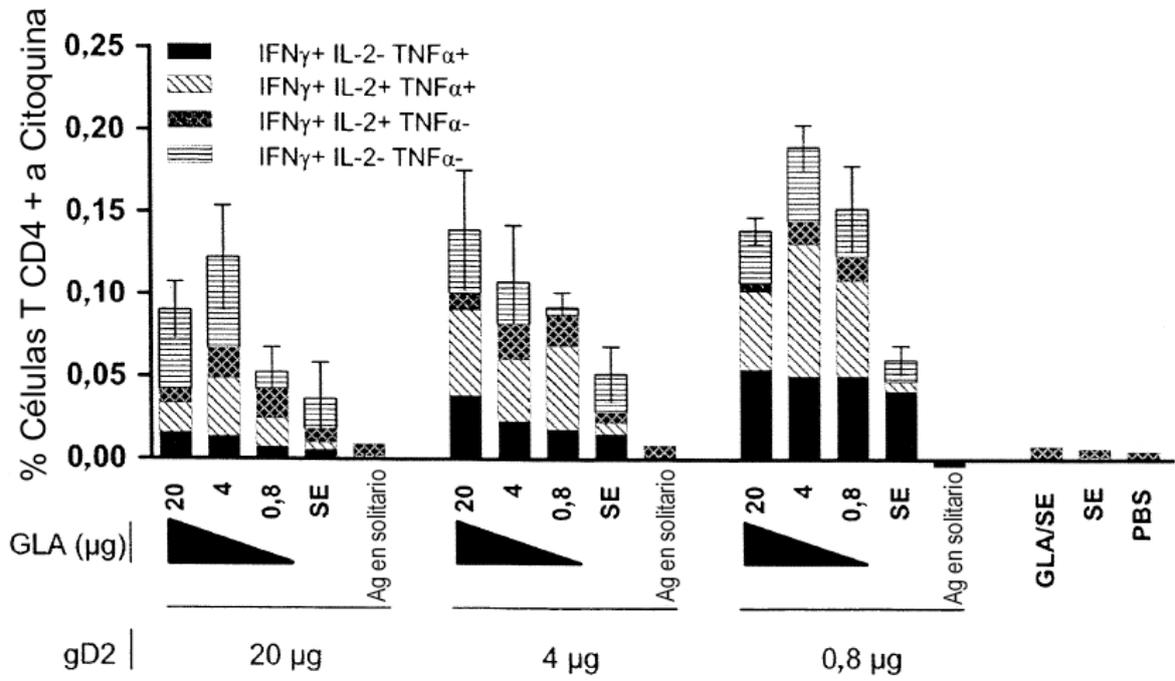


FIG. 2

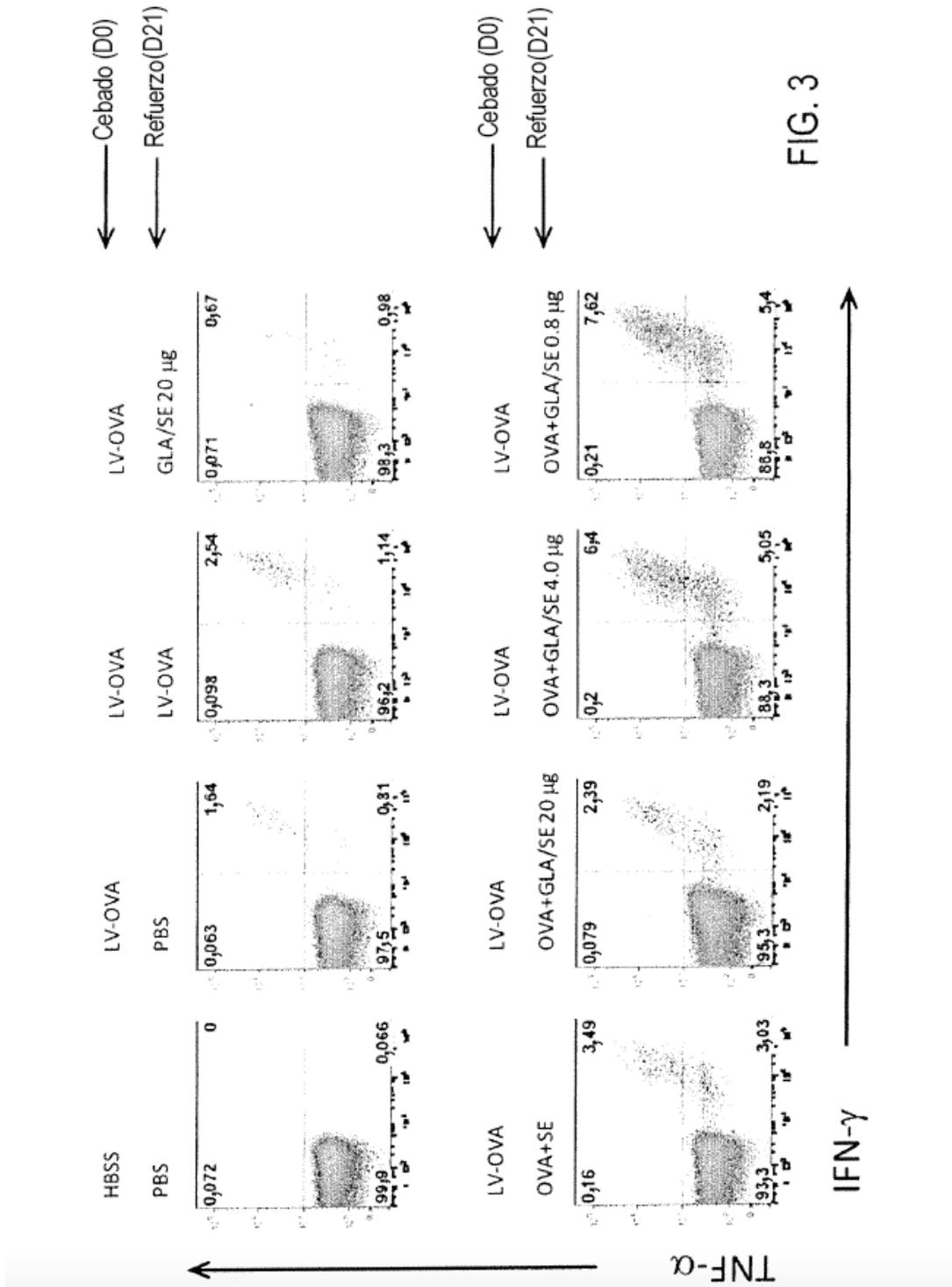


FIG. 3

OVA 257

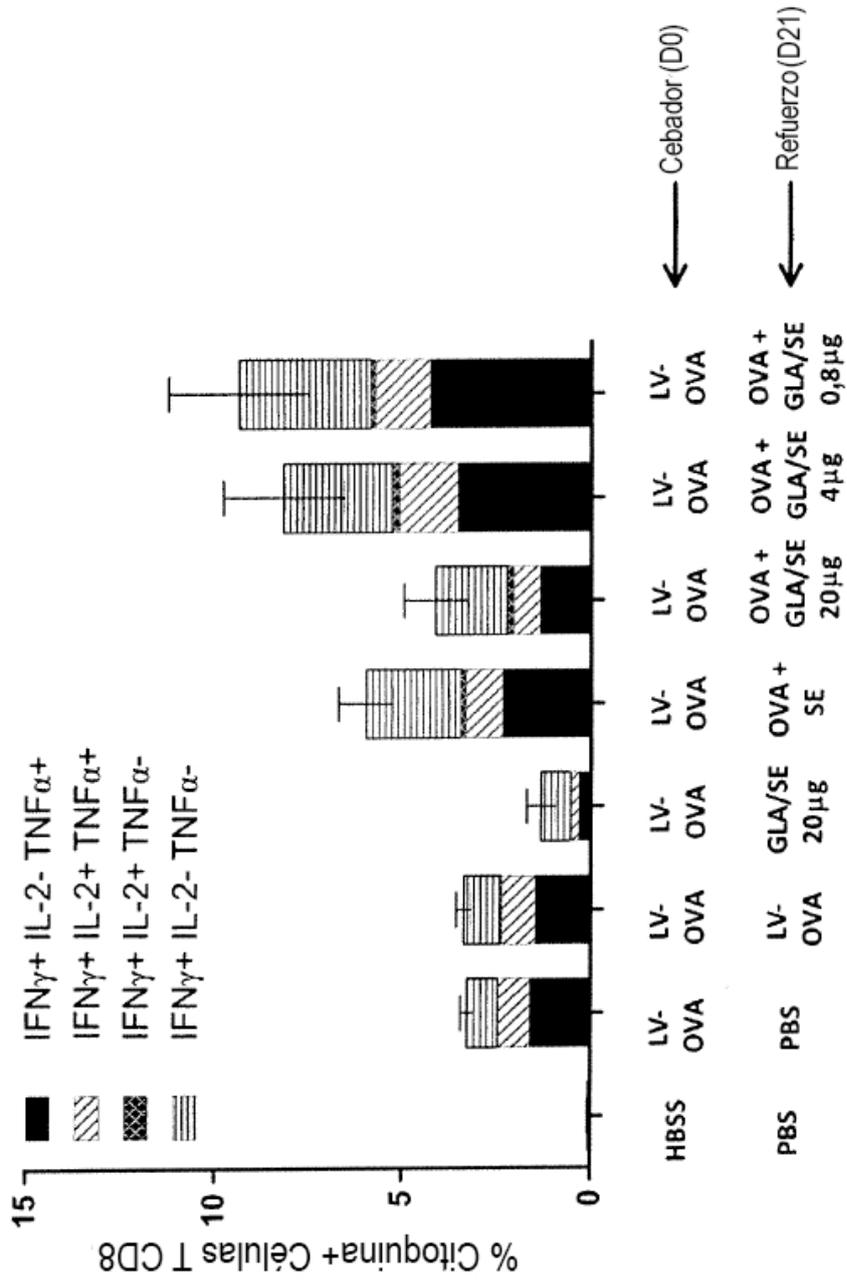


FIG. 4

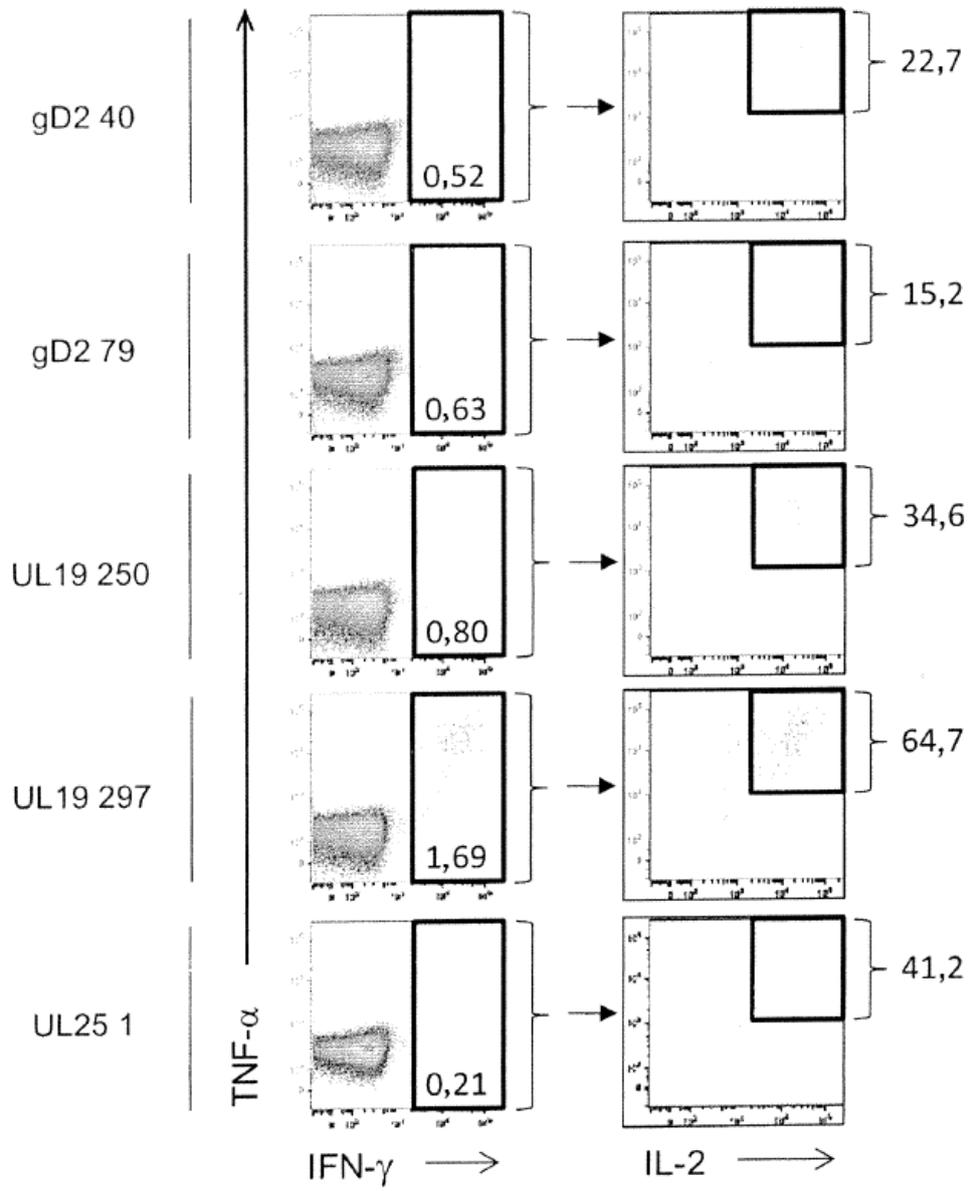


FIG. 5A

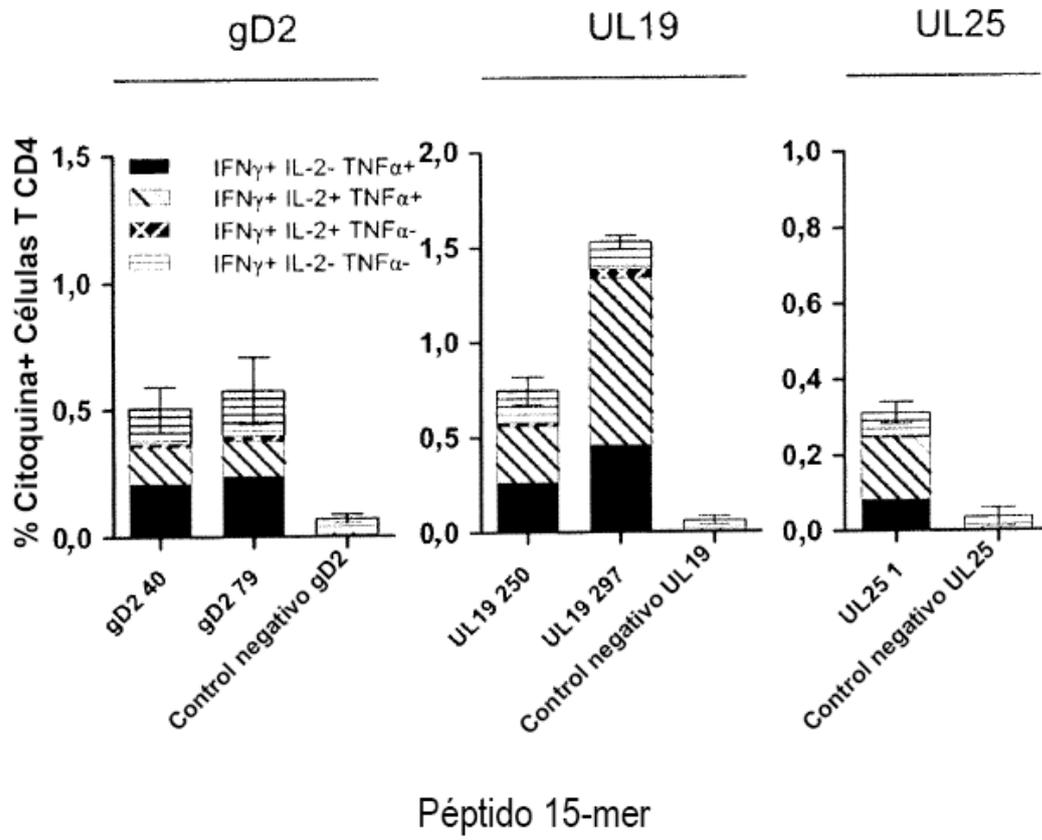
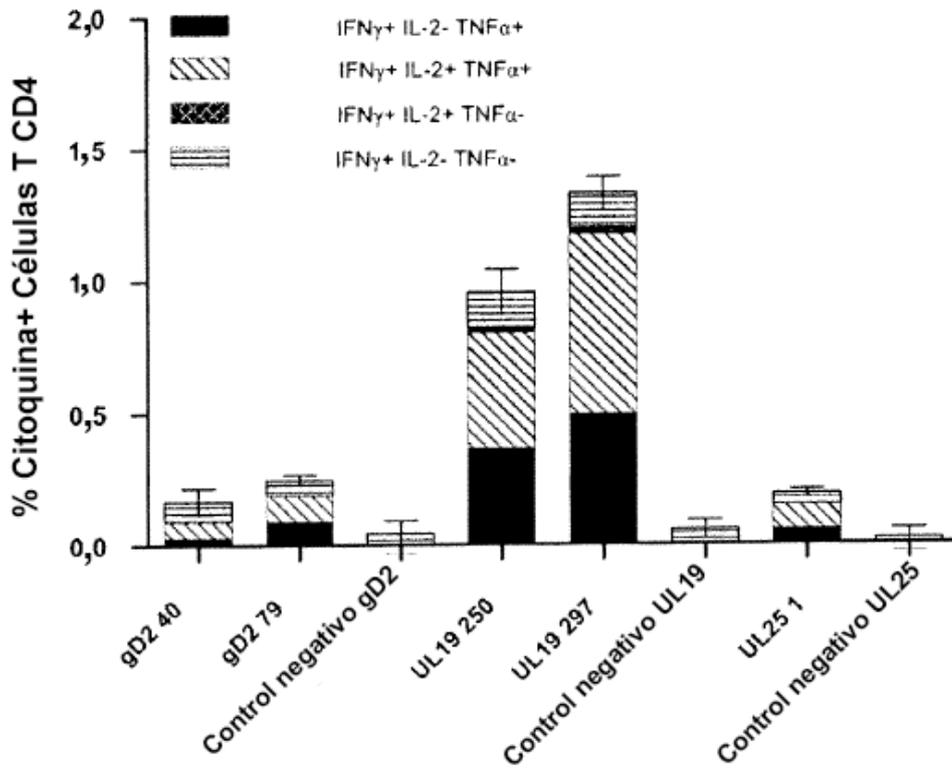


FIG. 5B



Péptido 15-mer

FIG. 6A

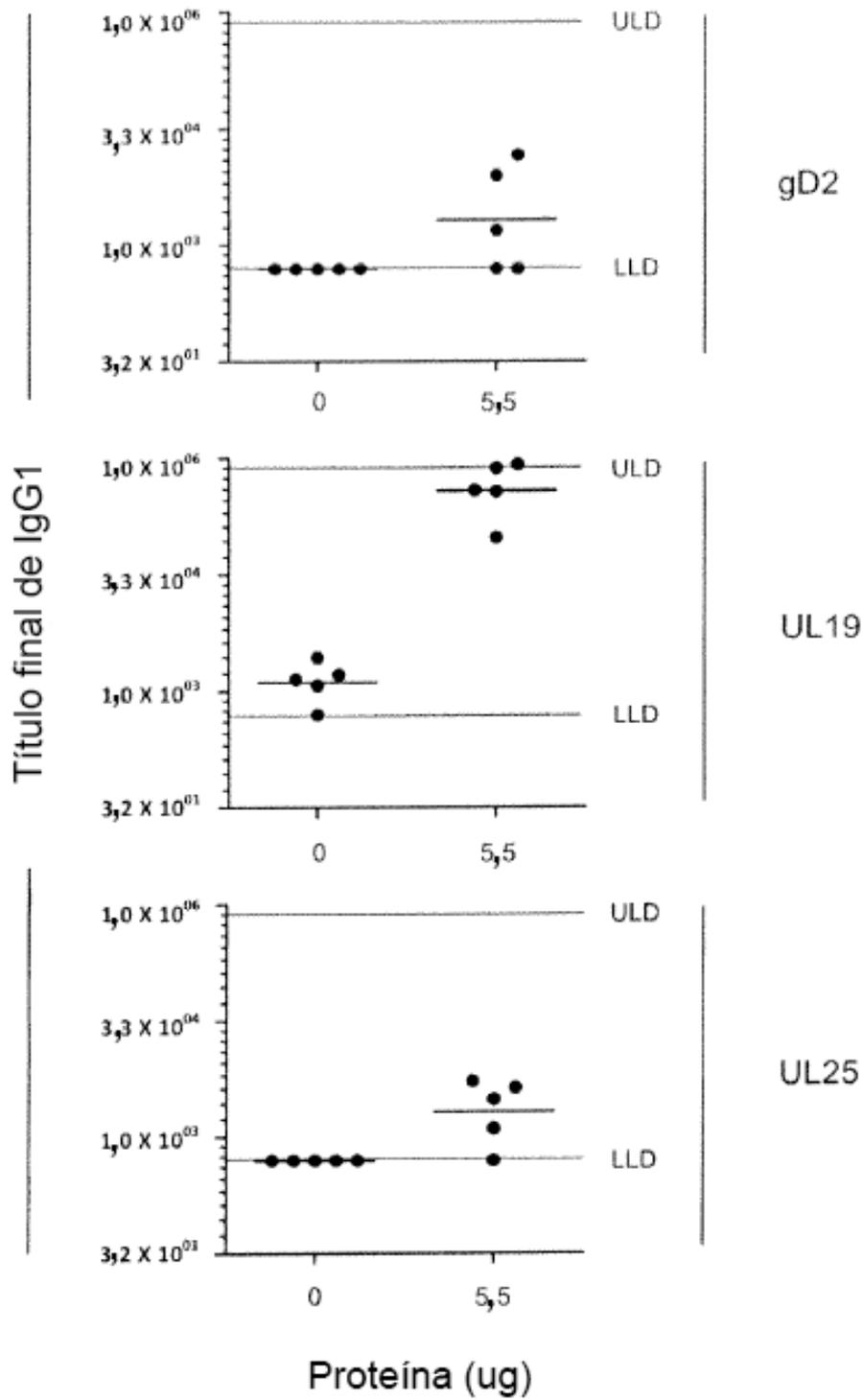


FIG. 6B

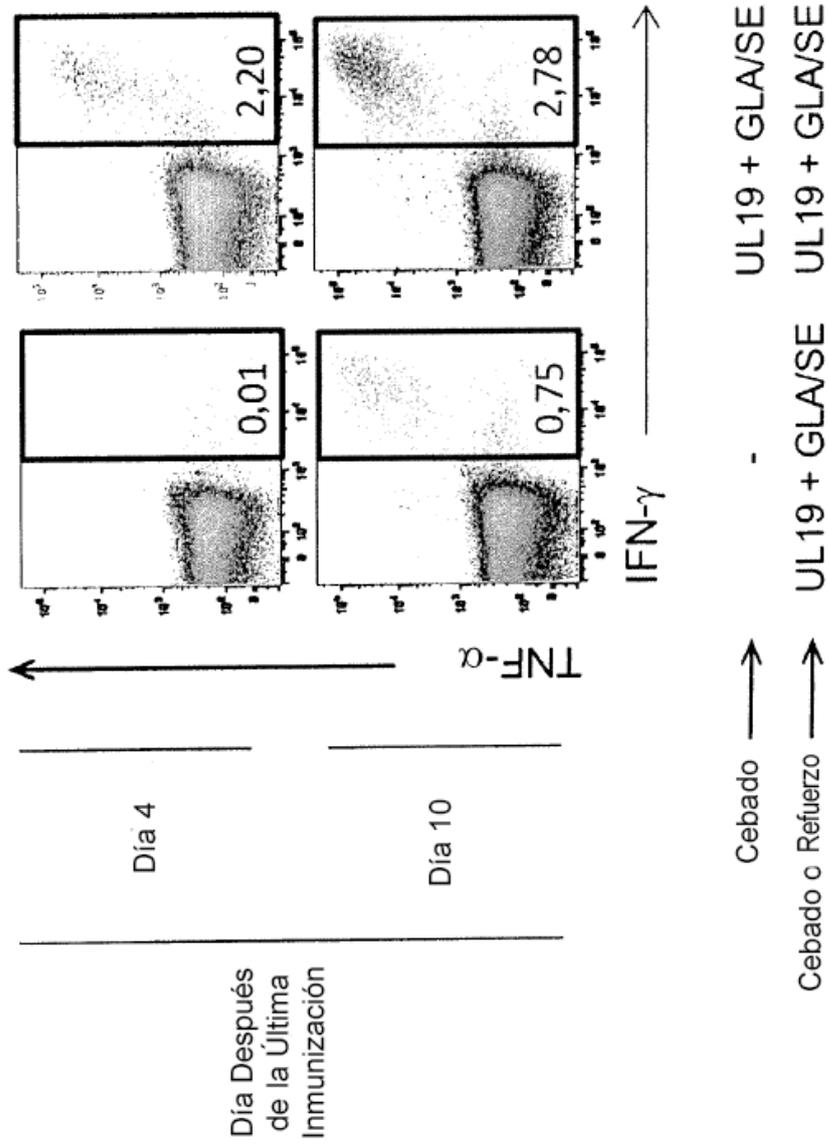


FIG. 7A

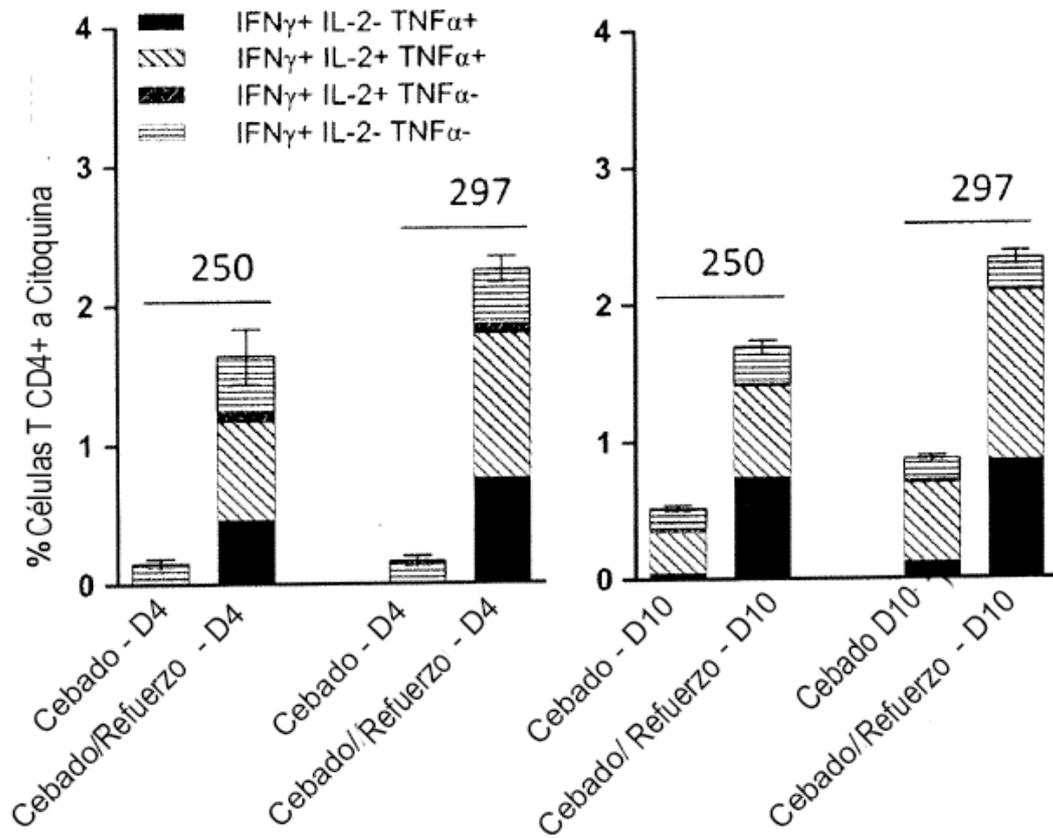


FIG. 7B

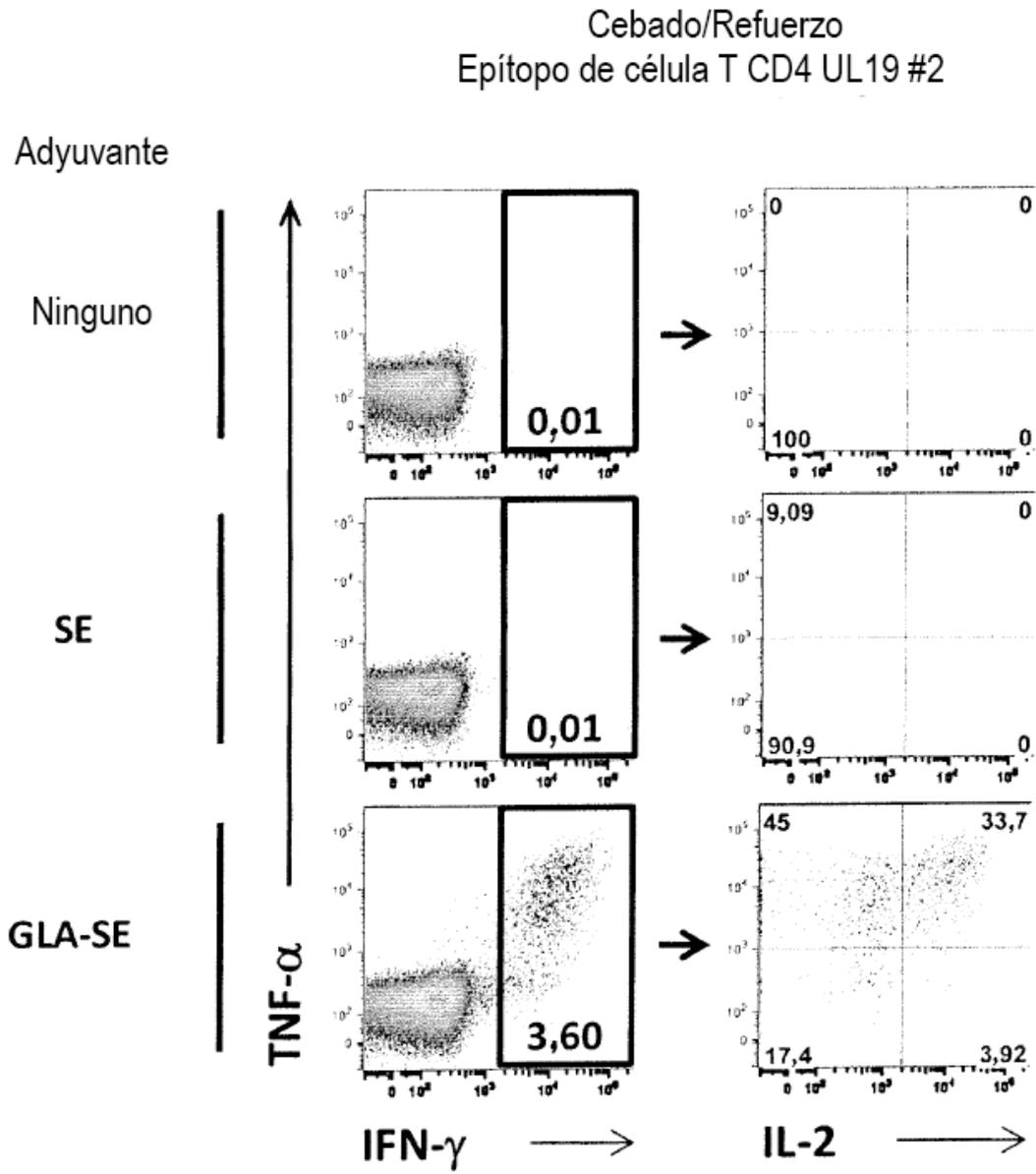


FIG. 8A

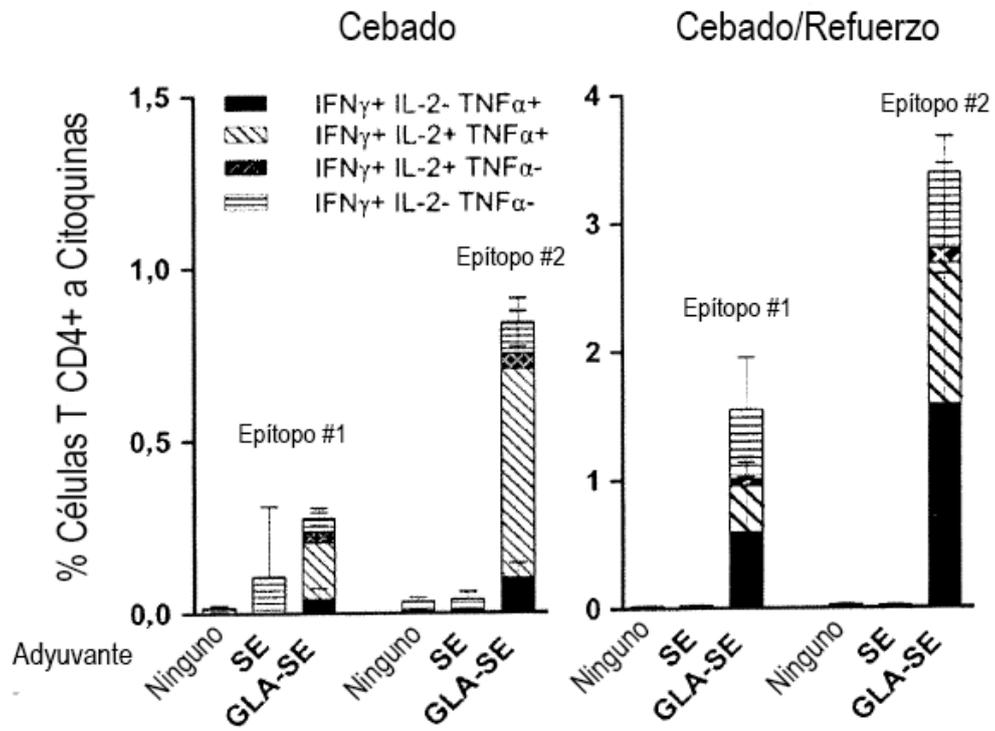
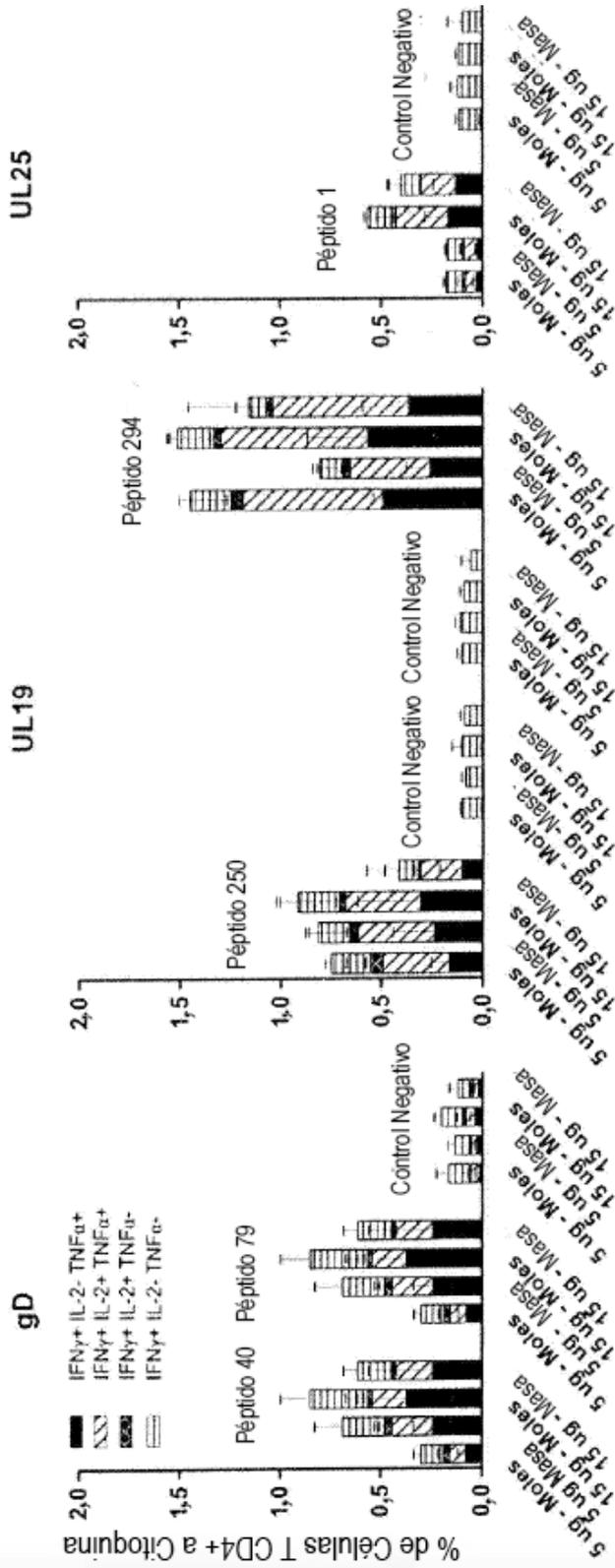


FIG. 8B



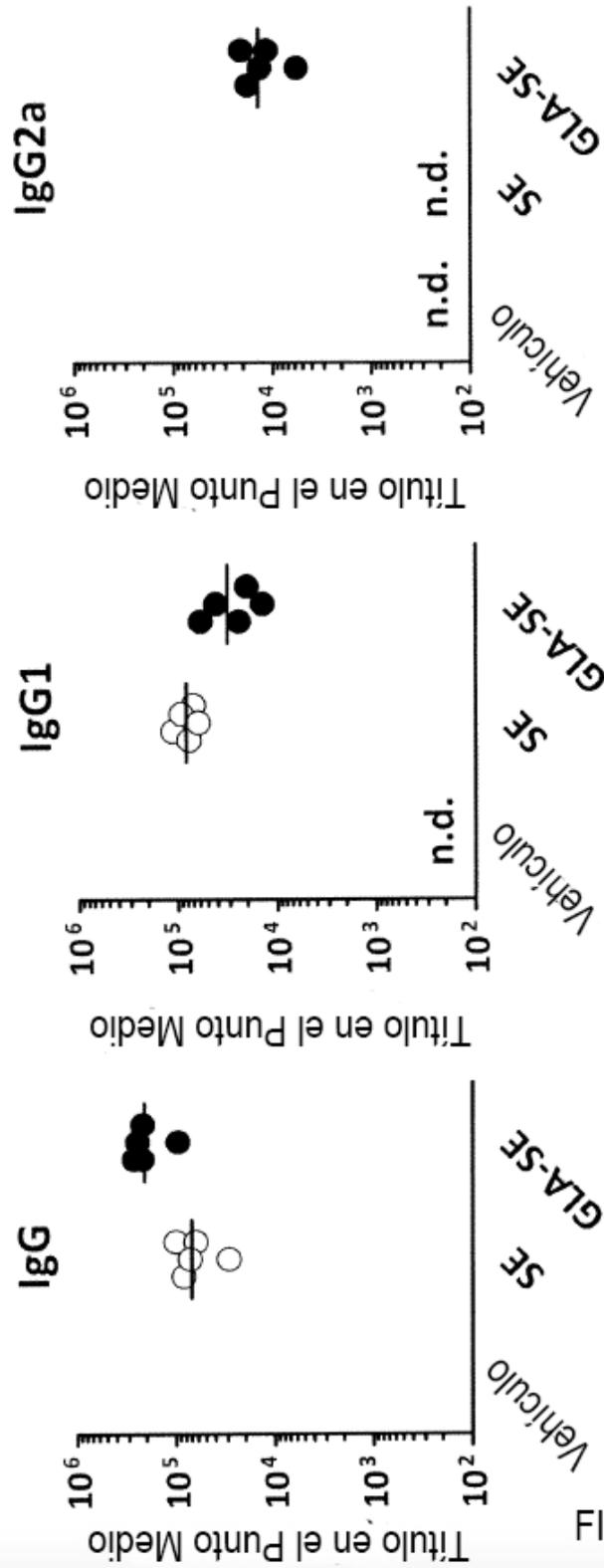


FIG. 10

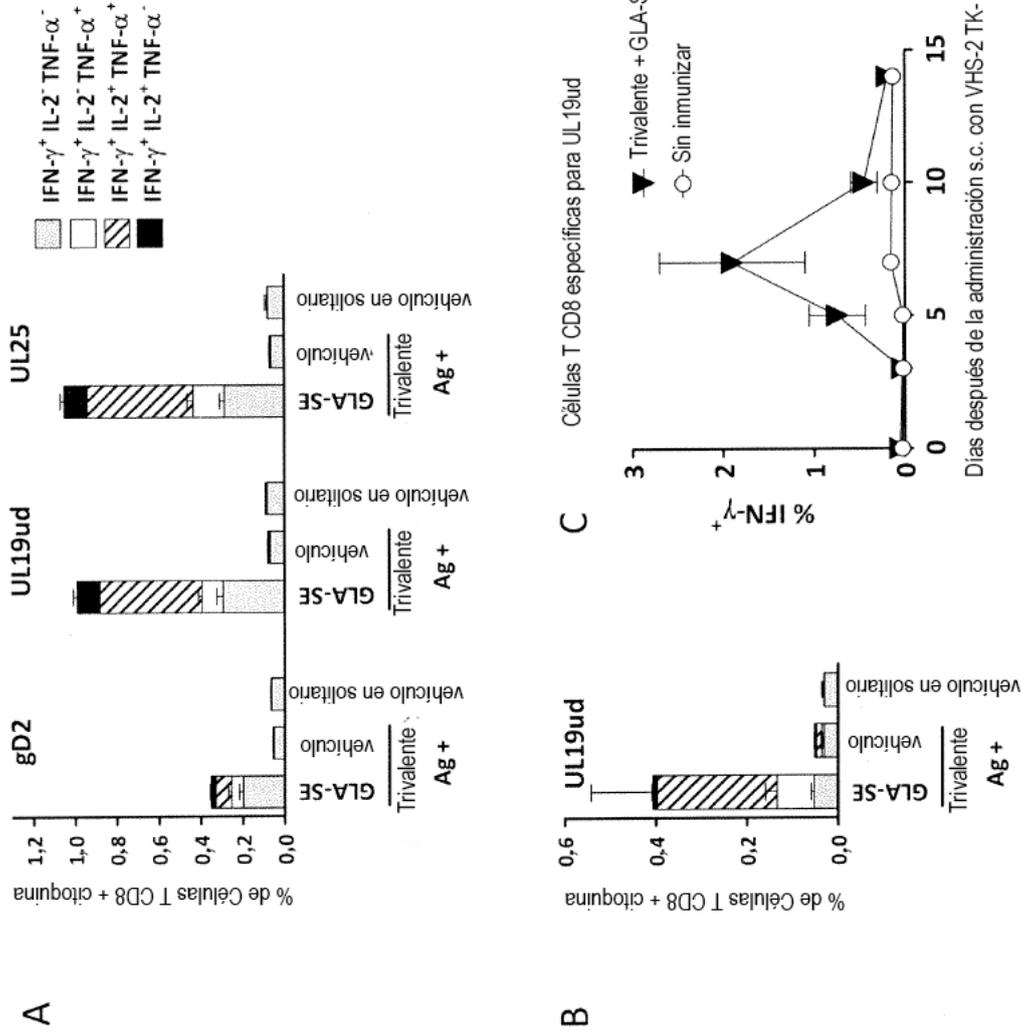


Figura 11

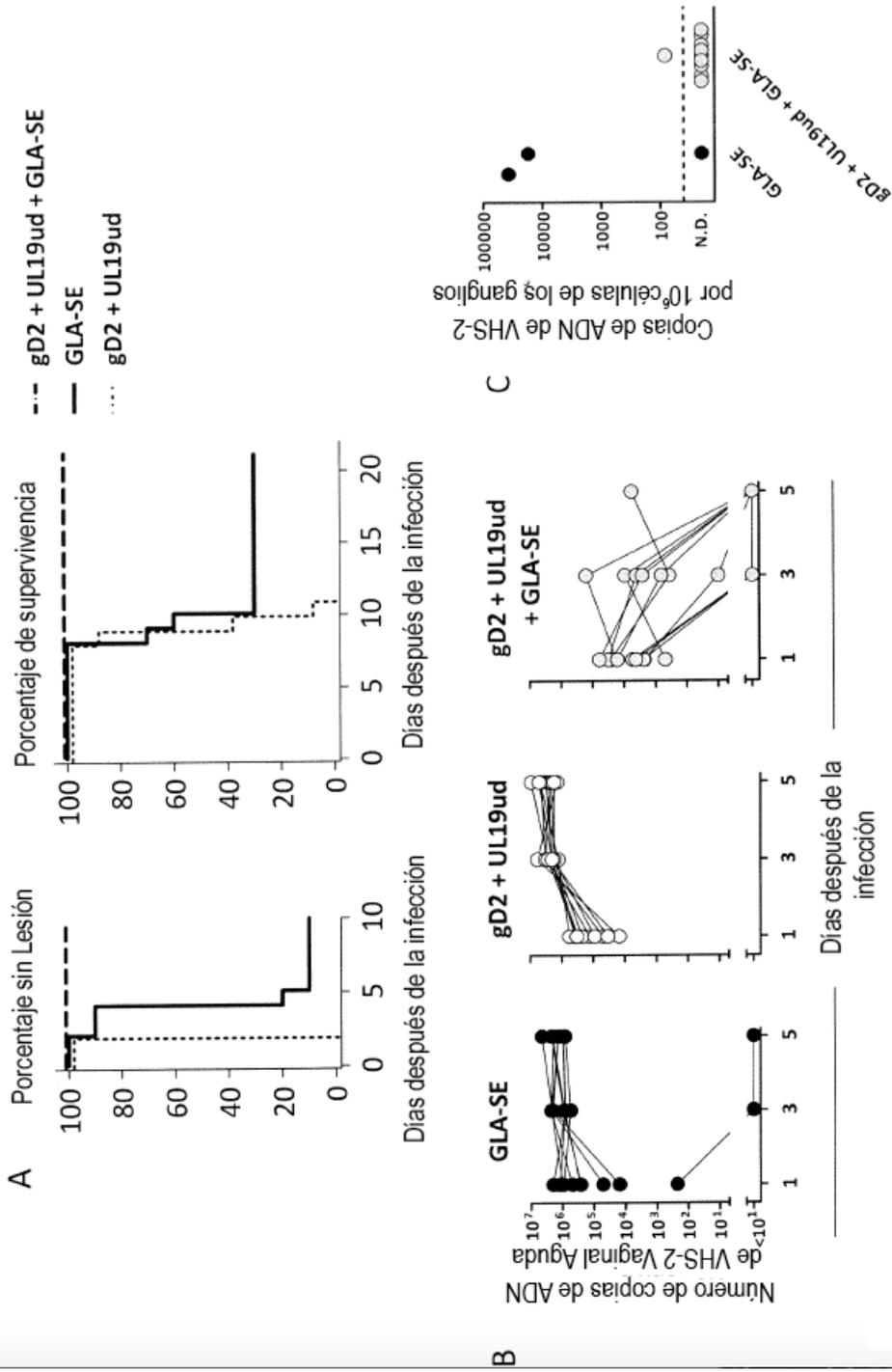


Figura 12

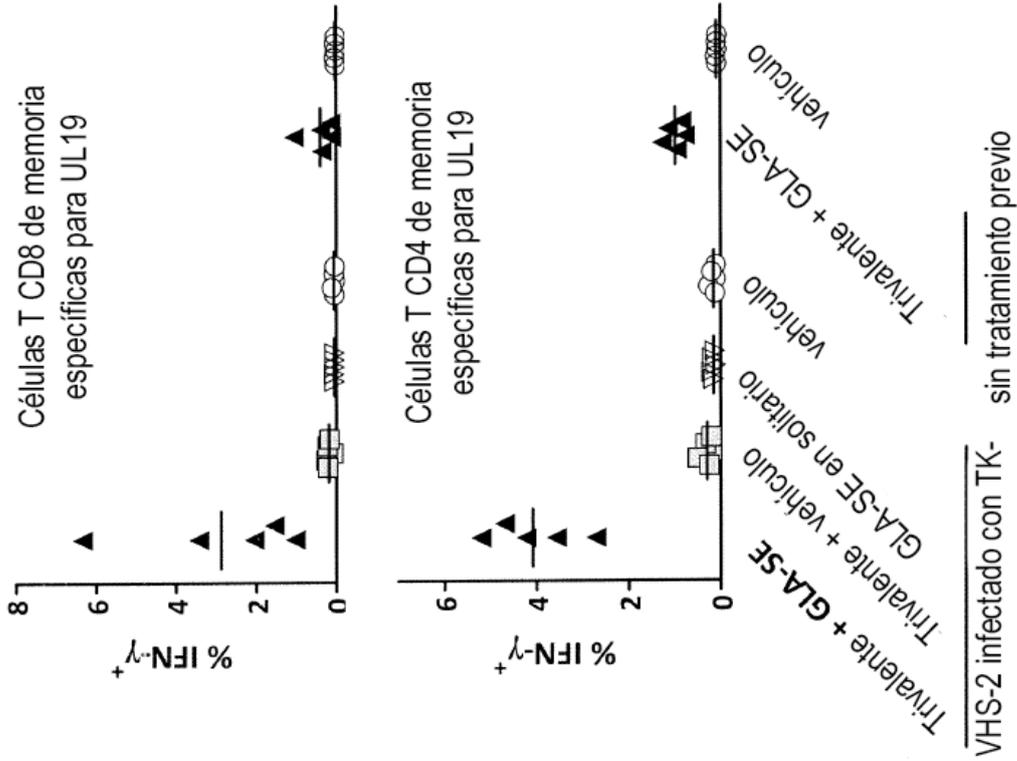


Figura 13

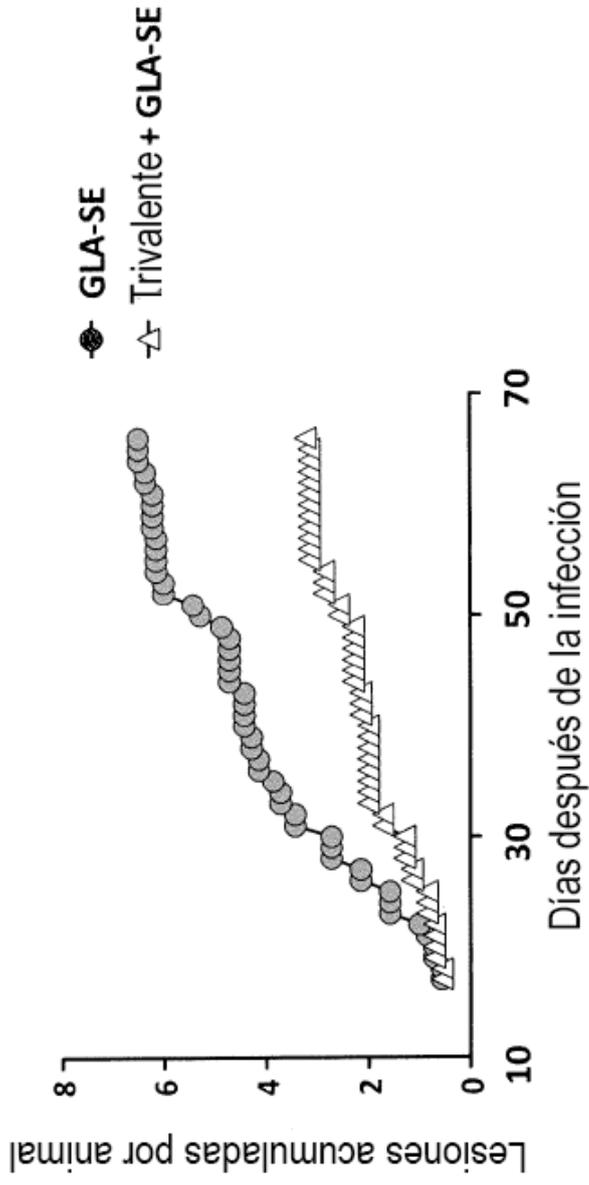


Figura 14

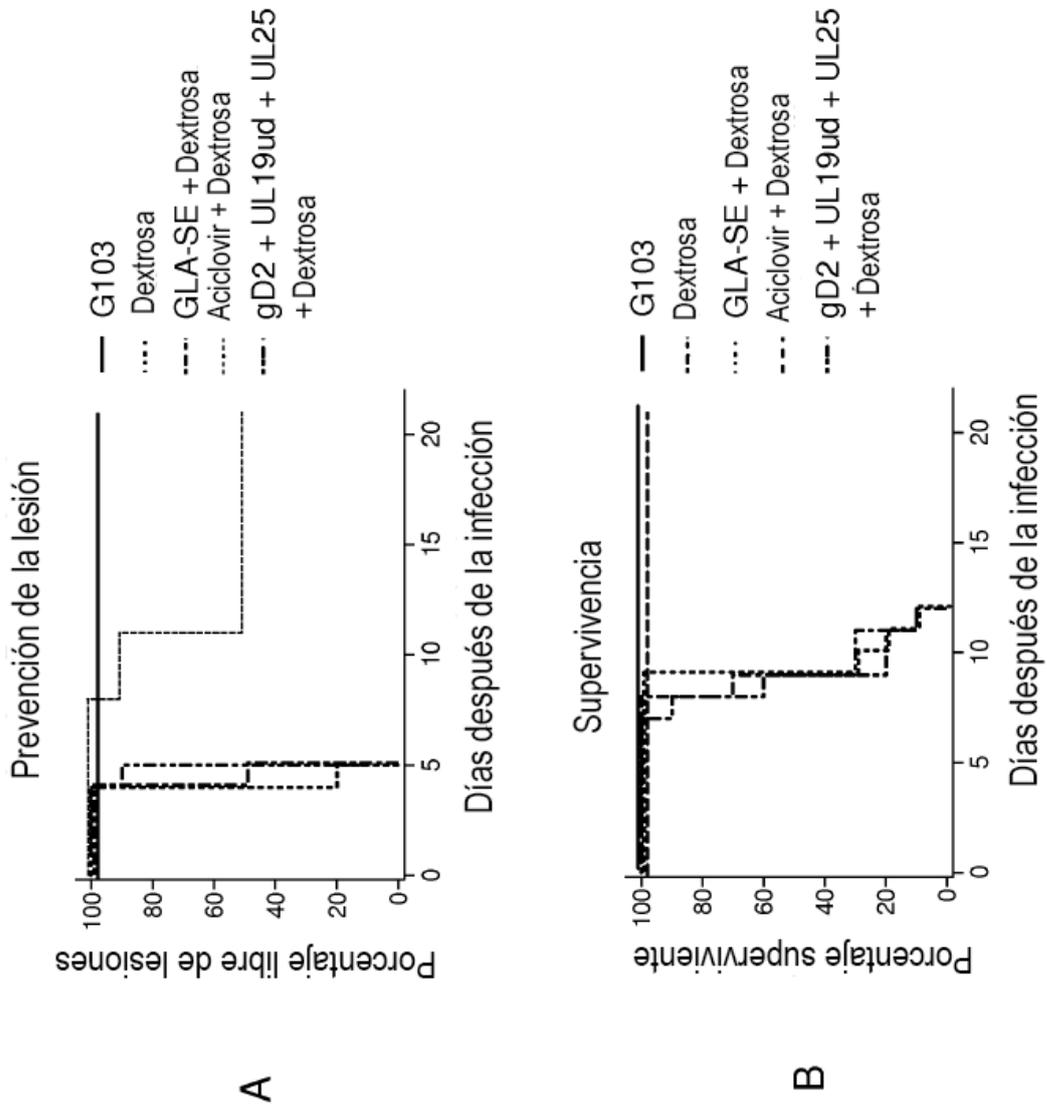


Figura 15

Títulos virales en VHS-2 vaginal-aguda

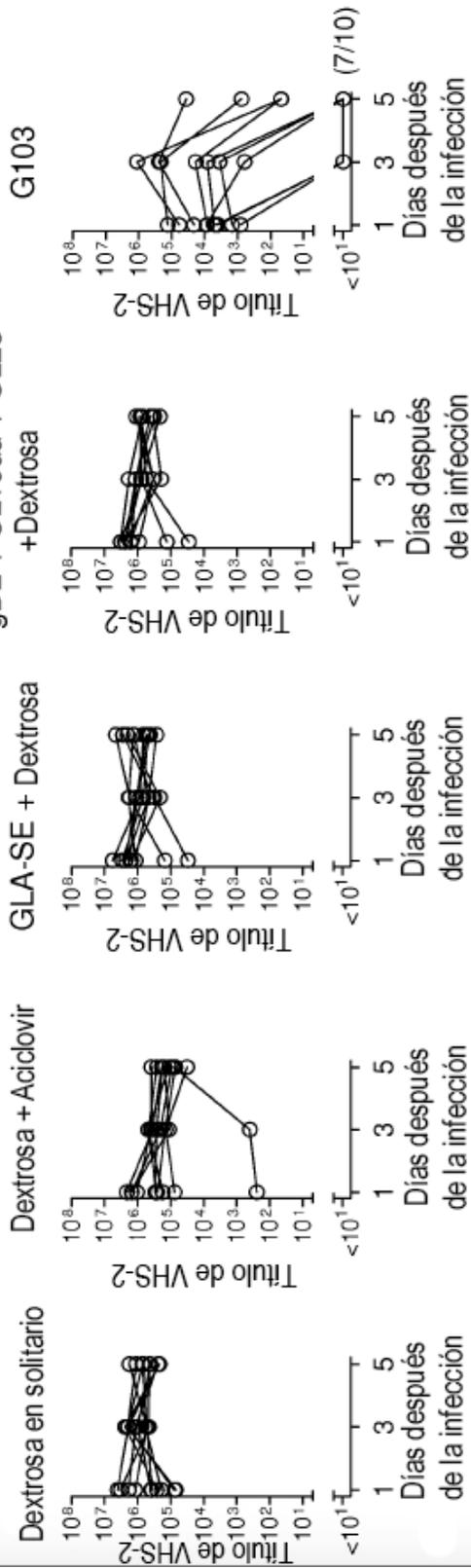


Figura 16