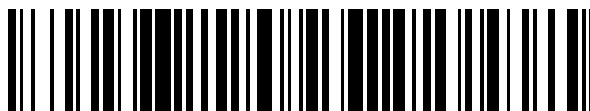


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 455**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2013 E 18159552 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3388835**

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:

16.10.2020

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:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 787 455 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 técnico

5

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

Antecedentes

10 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 produce lesiones cutáneas (por ejemplo, varicela y ampollas febriles) y se caracteriza 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 líquido que se rompen y forman úlceras dolorosas, que tardan varias semanas en curar. Como síntomas adicionales pueden incluirse 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. El virus puede permanecer en las células nerviosas durante el tiempo de vida del sujeto infectado y reactivarse, formando úlceras cutáneas, a intervalos irregulares. Incluso en ausencia de úlceras, el virus se puede producir y propagar de un individuo a otro. Actualmente es incurable.

20 El herpes genital es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente. En los Estados Unidos, más del 16 % de la población, o aproximadamente una de cada seis personas, está infectada con el VHS-2, con una carga desproporcionada en las mujeres - aproximadamente el 20 % de las mujeres y el 12 % de los hombres- y en los afroamericanos - aproximadamente el 40 % de la población y cerca del 50 % de las mujeres afroamericanas. (Morbidity and Mortality Weekly Report, 59:456-459, 23 de abril, 2010). En total, aproximadamente 50 millones de personas en los Estados Unidos están infectadas, de las cuales aproximadamente el 80 % no son conscientes de su infección, pero pueden seguir siendo contagiosas. 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 subsahariana donde cerca del 80 % de las mujeres y del 45 % de los hombres están infectados con VHS-2. 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 en el momento del parto. Junto con la epidemia del VHS-2 en la población adulta de los Estados Unidos, la incidencia de la infección neonatal también ha aumentado drásticamente. Cada año se producen unos 1 800 casos de infección neonatal por VHS en los Estados Unidos, lo que supone un número de casos mayor que el de la infección neonatal por VIH.

40 Las consecuencias sanitarias de la infección por VHS-2 son sorprendentes. Aunque la inmensa mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, el virus se puede seguir transmitiendo. Los que presentan 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, los que presentan 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 con frecuencia ocasiona 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 debida a infección por VHS tiene una mortalidad >15 % incluso con tratamiento, y la morbilidad neurológica entre los lactantes infectados por VHS-2 es un 30-50 % adicional de los casos supervivientes junto con la alta prevalencia del VHS-2, existe una clara comprensión de que la infección por VHS-2 aumenta sustancialmente el riesgo de adquirir y transmitir el VIH-1. Los datos de África muestran que la infección por VHS-2 puede aumentar el riesgo de transmisión del VIH hasta siete veces y que hasta la mitad de los casos de VIH recientemente adquiridos se atribuyen directamente a la infección por el 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 del VIH es mayor para el VHS-2 que para cualquier otra infección de transmisión sexual, lo que pone de manifiesto la necesidad de una estrategia de salud pública eficaz capaz de minimizar los efectos de la actual epidemia del VHS-2.

60 El aumento de la prevalencia del VHS-2 en las poblaciones adulta y pediátrica persiste a pesar del uso generalizado de la intervención farmacológica. Los medicamentos antiviricos, tal como aciclovir, proporcionado a altas dosis al inicio de la infección, pueden reducir la transmisión del VHS, pero no previenen de la infección latente del ganglio neuronal. La terapia antivirica tiene muchos inconvenientes, entre los que se incluyen efectos adversos tales como náuseas, vómitos, erupciones cutáneas y disminución de la función renal, y se debería utilizar con precaución ya que puede ser teratogénica, así como tóxica para los embriones en desarrollo. Además, la administración continua de supresores con valaciclovir reduce la transmisión del 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. Las alternativas a los medicamentos antivíricos, como los microbicidas tópicos, no han sido probadas clínicamente, y las barreras físicas (por ejemplo, los preservativos) tienen una eficacia marginal 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 varios planteamientos vacunales - pero todos ellos sin resultados. Los tipos de vacunas convencionales, de larga tradición, incluidos los virus enteros, inactivados, los virus vivos atenuados, los virus vivos modificados y las subunidades derivadas de cultivos celulares, fueron en gran medida infructuosos o tuvieron poca 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 glucoproteínas de envoltura en combinación con adyuvantes. Las glucoproteínas fueron candidatas atractivas, principalmente porque son las dianas de anticuerpos neutralizantes y están muy conservadas entre las cepas del 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 su insuficiente eficacia. La vacuna de Chiron comprendía formas truncadas de dos glucoproteínas del VHS-2, gD2 y gB2, en combinación con el adyuvante MF59. La vacuna proporcionó, en el mejor de los casos, protección transitoria contra el VHS-2 aunque se generaron altos títulos de anticuerpos contra el VHS-2 (Stanberry, *ibid*). GlaxoSmithKline (GSK) desarrolló y ensayó una vacuna similar; sin embargo contenía sólo una única glucoproteína, 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 parecía beneficiarse.

Sumario

25 La invención proporciona una composición farmacéutica inmunogénica que comprende:

- (a) un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 que es un fragmento inmunogénico de al menos 100 aminoácidos del polipéptido UL19 que comprende los restos 451-1054 de la SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75 % de los aminoácidos 1-450 de la SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75 % de los aminoácidos 1055-1374 de la SEQ ID NO:4; o una variante inmunogénica del mismo que conserva una identidad de aminoácidos de al menos 85 % sobre al menos 100 aminoácidos contiguos;
- b) un adyuvante de monofosforil lípido A (MLA); y
- (c) un transportador farmacéuticamente aceptable.

35 La invención proporciona también un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende dichas proteínas o fragmentos inmunogénicos, como se expone en las reivindicaciones.

La composición farmacéutica es para su uso en un método de generación de una respuesta inmunitaria en un sujeto. La composición farmacéutica es para su uso en un método de inmunización de un sujeto contra el VHS-2.

40 En las reivindicaciones adjuntas se exponen aspectos adicionales de la invención.

En la inmediata divulgación también se proporcionan 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 al menos del 75 % de los aminoácidos 1-450 de la SEQ ID NO:4 y que carece al menos del 75 % de los aminoácidos de 1055-1374 de la SEQ ID NO:4; (b) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:12; (c) una variante inmunogénica de (a) o (b) que conserva una identidad de aminoácidos de al menos 85 % 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 farmacéuticamente aceptable.

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

55 En otra realización más de la inmediata divulgación, se proporciona la composición mencionada anteriormente, en donde el agente es un adyuvante. En una realización, el adyuvante es GLA. 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.

60 En otra realización adicional de la divulgación, se proporciona un método para tratar una infección por 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 inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición mencionada anteriormente. En otra realización más, 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 intradérmica, mucosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal o vaginal. En otra realización más, se proporciona un método mencionado anteriormente que adicionalmente comprende administrar al sujeto una segunda, tercera o cuarta composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-8.

5 La invención reivindicada se dirige a composiciones y a métodos útiles para prevenir o tratar en sujetos infecciones causadas por el VHS-2 (virus del herpes simple 2), 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 glucoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la glucoproteína de envoltura del VHS-2, (ii) una proteína estructural del VHS-2 o un fragmento inmunogénico de la proteína estructural del VHS-2, en donde la proteína estructural no es una de las glucoproteínas de envoltura, (iii) un agente que activa la inmunidad innata en un sujeto y (iv) un transportador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la glucoproteína 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, estos derivan 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 a una proteína del VHS-2 engloban a cualquiera de dichas proteínas obtenibles de cualquier VHS-2 de origen natural. En otras realizaciones, están presentes tanto UL19 como UL25, o fragmentos de UL19 (por ejemplo, la SEQ ID NO:12, un tipo de Fragmento de Dominio Superior) y UL25, o una mezcla de proteína entera y fragmentos, por ejemplo, una mezcla de UL25 de longitud completa y un fragmento de UL19, por ejemplo, la 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 de MLA. En una realización la composición farmacéutica inmunogénica comprende gD2, GLA u otro adyuvante de MLA, y dos o tres antígenos seleccionados de UL25, UL19 y UL47 de longitud completa o fragmentos, y un transportador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica inmunogénica comprende un adyuvante de MLA, preferiblemente GLA que tienen la fórmula estructural de la Figura 1, gD2, UL25, el Fragmento de Dominio Superior de UL19 y un transportador farmacéuticamente aceptable; opcionalmente dicha composición comprende además una o más proteínas estructurales de VHS-2 adicionales, o fragmentos de la misma.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una parte antigénica de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 y un transportador farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "fragmento inmunogénico" y "fragmento inmunológico" y "parte antigénica" se emplean de manera indistinta en la presente memoria para designar fragmentos o partes de proteínas que suscitan una respuesta del anticuerpo o una respuesta citotóxica celular que conserva especificidad para (reactividad cruzada con) la proteína de longitud completa. En determinadas realizaciones, la parte antigénica se une a anticuerpos neutralizantes. En determinadas realizaciones, la parte antigénica es de gD2 o gB2, y en otras realizaciones, la parte antigénica, ya sea de gD2, gB2 u otra glucoproteína de envoltura, comprende al menos parte de, y opcionalmente toda, la secuencia líder. En cualquiera de las realizaciones, la parte antigénica comprende dos o más epítopos lineales o comprende dos o más epítopos discontinuos de la glucoproteína 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 desvela, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos N.º2009/0181078.

Los métodos pueden utilizarse para tratar una infección por VHS-2 o para generar una respuesta inmunitaria, que puede prevenir o mejorar una infección por VHS-2. Como sujetos adecuados para los métodos se incluyen los que son seropositivos para el VHS-2, así como los que son seronegativos para el VHS-2. En los métodos, a un sujeto se le administra una de las composiciones descritas en la presente memoria.

Algunas declaraciones a modo de ejemplo de la presente invención se exponen de la siguiente manera, utilizando la designación (xy), donde cada una de x e y indica una letra, indicando la designación una realización, o un grupo de realizaciones, cuando más de una (xy) se identifica dentro de una realización. (AA) Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende (i) una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; (ii) una proteína estructural del VHS-2 diferente de una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; (iii) un agente que activa la inmunidad innata; y (iv) un transportador farmacéuticamente aceptable. (AB) Composición (AA) en donde la glucoproteína de envoltura del 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 una cualquiera de una o más de (AA), (AB) y (AC), en donde la proteína estructural del VHS-2 es una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26. (AE) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 es UL19. (AF) La composición de (AB) en donde la proteína estructural del VHS-2 es UL19. (AG) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 es un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, la SEQ ID NO:12. (AH) Composición (AB) en donde la proteína estructural del VHS-2 es un fragmento inmunológico de UL47. (AI) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 es UL25. (AJ) Composición (AB) en donde la proteína estructural del VHS-2 es UL25. (AK) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 es un fragmento inmunológico de UL25. (AL) Composición (AB) en donde la proteína estructural del VHS-2 es ICP0. (AM) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 es UL47. (AN) Composición (AB) en donde la proteína

estructural del VHS-2 es un fragmento de UL47. (AO) Composición (AA) en donde la proteína estructural del VHS-2 diferente a la glucoproteína de envoltura del VHS-2 es UL47, y es un fragmento inmunológico de la misma. (AP) Composición (AB) en donde la proteína estructural del VHS-2 diferente a la glucoproteína de envoltura del VHS-2 es UL47, y es un fragmento inmunológico de la misma. (AQ) Una composición de una cualquiera o más de (AA), (AB), (AC), (AD), (AE), (AF), (AG), (AH), (AI), (AJ), (AK), (AL), (AM), (AN), (AO), (AP) que adicionalmente comprende una segunda proteína estructural del VHS-2 diferente a la glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma. (AR) composición (AQ) en donde la segunda proteína estructural del VHS-2 diferente a la glucoproteína de envoltura del 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 una cualquiera o más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que adicionalmente comprende UL25. (AV) Una composición de cualquiera de uno más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL25. (AW) Una composición de una cualquiera o más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que adicionalmente comprende UL47. (AX) Una composición de una cualquiera o más de (AE), (AF), (AG) y/o (AH) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47. (AY) Una composición de una cualquiera o más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que adicionalmente comprende UL19. (AZ) Una composición de una cualquiera o más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO:12. (BA) Una composición de una cualquiera o más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que adicionalmente comprende UL47. (BB) Una composición de una cualquiera o más de (AI), (AJ), (AK) y/o (AL) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47. (BC) Una composición de una cualquiera o más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que adicionalmente comprende UL19. (BD) Una composición de una cualquiera o más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL19. (BE) Una composición de una cualquiera o más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que adicionalmente comprende UL25. (BF) Una composición de una cualquiera o más de (AM), (AN), (AO) y/o (AP) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL25. (BG) Una composición de una cualquiera 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), y (BF) en donde el agente es un adyuvante. (BH) Una composición seleccionada de (BG) en donde el adyuvante es GLA u otro adyuvante de MLA, y todas 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 de MLA; y un transportador farmacéuticamente aceptable. (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 una cualquiera o más de (BI), (BJ) y (BK) que adicionalmente comprende UL47. (BM) Una composición de una cualquiera o más de (BI), (BJ) y (BK) que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47. (BN) Un método para tratar en un sujeto una infección por VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera 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 inmunitaria frente al VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera 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 seropositivo para el VHS-1. (BR) Método (BO) en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y seronegativo para el VHS-1.

45 En una realización se proporciona una composición que comprende una glucoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunológico de la misma; dos proteínas estructurales del VHS-2 distintas a una glucoproteína del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma; un agente que activa la inmunidad innata; y un transportador farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo es una composición que comprende gD2, UL25, y la SEQ ID NO:12 (un fragmento de UL19) y un adyuvante de monofosforil lípido A (MLA), por ejemplo, GLA. Además de respuestas de anticuerpos específicos de gD2, la vacunación con esta composición puede suscitar linfocitos T CD4 y CD8 de memoria y efectores fuertes, específicos de antígenos del VHS-2, que responden a una infección posterior con virus vivos. Cabe destacar, que la inmunización profiláctica con esta composición puede proteger en gran medida o completamente contra la infección intravaginal letal del VHS-2 en ratones C57BL/6, con inmunidad esterilizante tanto en la mucosa genital como en los ganglios de la raíz dorsal. Esta composición puede ampliarse a linfocitos T tanto CD4 como CD8, inducidos mediante infección anterior con una cepa atenuada del VHS-2. De acuerdo con esto, cuando se aplica como una terapia para lesiones recurrentes por VHS-2 en cerdos de guinea, esta composición puede reducir la frecuencia de las lesiones recurrentes.

60 También se proporcionan kits. En algunos kits, hay un vial que comprende la composición farmacéutica que comprende una parte antigénica de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

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

65

Breve descripción de los dibujos

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

5 La Figura 2 muestra respuestas de linfocitos T CD4 específicos de gD2. Los datos se obtuvieron después de inmunizar dos veces ratones Balb/c (4/grupo) por vía i.m. (intramuscular) a un intervalo de 28 días con una vacuna bivalente que comprendía diferentes niveles de proteína recombinante y GLA, como se indica. Los gráficos son resultados de análisis de citometría de flujo para la producción intracelular de IL-2, TNF- α e IFN- γ .

10 La Figura 3 muestra respuestas de linfocitos T CD8 esplénicos contra el péptido OVA257 analizadas el día 25 (D25) después de la primovacunación (D4 después del refuerzo); OVA recombinante = 5 μ g; SE = 2 %; lentivirus suministrado por vía s.c. (subcutánea); OVA recombinante suministrada por vía i.m.

15 La Figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8 positivos a citocina, medido 4 días después de un refuerzo. La primovacunación 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 GLA-SE 20 μ g; HA5, d0 LV-OVA, d21 OVA + SE; HA6, d0 LV-OVA, d21 OVA + GLA-SE 20 μ g; HA7, d0 LV-OVA, d21, OVA+GLA-SE 4 μ g; HA8, d0 LV- OVA, d21 OVA + GLA-SE 0,8 μ g.

20 Las Figuras 5A-B muestran datos obtenidos después de inmunizar grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) con un régimen de inmunización de primovacunación/refuerzo (d0 primovacunación/d21 refuerzo) con 5 μ g de proteína recombinante gD, UL19 o UL25, en combinación con 5 μ g de GLA-SE. El día 4 después del refuerzo, se midieron las respuestas de linfocitos T CD4 esplénicos mediante tinción intracelular para IFN- γ , TNF- α e IL-2 después de la reestimulación *ex vivo* con pentadecapéptidos (*15-mer peptides*) identificados anteriormente que contenían epítomos de CD4 para la proteína inmunogénica recombinante correspondiente. A) Gráfica de puntos de ICS (tinción intracelular de citocinas) representativa de la respuesta de linfocitos T CD4 contra cada uno de los pentadecapéptidos indicados en ratones inmunizados con la proteína inmunogénica recombinante correspondiente. B) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina de cada grupo.

30 Las Figuras 6 A-B muestran datos obtenidos después de inmunizar a un grupo de cinco ratones C57BL/6 con un régimen de primovacunación/refuerzo (d0 primovacunación/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. El día 4 después del refuerzo, se midieron las respuestas de linfocitos T CD4 esplénicos mediante tinción intracelular para IFN- γ , TNF- α e IL-12 después de la reestimulación *ex vivo* con pentadecapéptidos identificados anteriormente que contenían epítomos de linfocitos T CD4 para cada proteína inmunogénica recombinante correspondiente. Como control negativo se incluyó un péptido individual de cada biblioteca peptídica, que carecía de un epítomo de linfocitos T CD4. A) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina de cada grupo. B) Títulos de valoración en suero (que se define como la dilución recíproca en suero más alta que es 2 veces mayor que la del fondo) de los anticuerpos específicos de antígeno de la subclase de IgG1 para cada proteína inmunogénica recombinante en la vacuna trivalente.

45 Las Figuras 7 A-B muestran datos obtenidos cuando grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) se inmunizaron con un régimen de inmunización de primovacunación (d0) o primovacunación/refuerzo (d0 primovacunación/d21 refuerzo) con 5 μ g de proteína UL19 recombinante en combinación con 5 μ g de GLA-SE. El día 4 o el día 10 después de la última inmunización, se midieron las respuestas de los linfocitos T CD4 esplénicos mediante ICS para IFN- γ , TNF- α e IL-12 después de la reestimulación *ex vivo* con pentadecapéptidos identificados anteriormente que contenían epítomos de linfocitos T CD4 para UL19. A) Gráfica de puntos de ICS representativa de la respuesta de linfocitos T CD4 contra el pentadecapéptido 297 de UL19 indicado, en ratones inmunizados con la proteína inmunogénica recombinante correspondiente. Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina de cada grupo. B) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina que responden al pentadecapéptido 250 o 297 de UL19 de cada grupo.

55 Las Figuras 8A-B muestran datos obtenidos cuando grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) se inmunizaron con un régimen de inmunización de primovacunación (d0) o primovacunación/refuerzo (d0 primovacunación/d21 refuerzo) con 5 μ g de proteína UL19 recombinante suministrada sola o en combinación con 5 μ g de SE o GLA-SE. El día 5 o el día 10 después de la última inmunización, se midieron las respuestas de los linfocitos T CD4 esplénicos mediante ICS para IFN- γ , TNF- α e IL-12 después de la reestimulación *ex vivo* con pentadecapéptidos identificados anteriormente que contenían epítomos de linfocitos T CD4 para UL19. A) Gráfica de puntos de ICS representativa de la respuesta de linfocitos T CD4 contra el péptido pentadecapéptido 297 de UL19 indicado, en ratones inmunizados con la proteína inmunogénica recombinante correspondiente. Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina de cada grupo. B) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina que responden a pentadecapéptido 250 o 297 de UL19 de cada grupo.

65 Las Figuras 9 A-C muestran datos obtenidos cuando grupos de ratones C57BL/6 (5/grupo) se inmunizaron con un régimen de inmunización de primovacunación/refuerzo (d0 primovacunación/d21 refuerzo) con proteínas recombinantes formuladas sobre una base equimolar o equivalente en masa. El total de proteína suministrada

fue de 5 µg o de 15 µg. El día 5 después de la última inmunización, se midieron las respuestas de los linfocitos T CD4 esplénicos mediante tinción intracelular para IFN-γ, TNF-α e IL-12 después de la reestimulación *ex vivo* con pentadecapéptidos identificados anteriormente que contenían epítomos de linfocitos T CD4. A) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocina que responden contra péptidos gD. B) Se indica el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos a citocinas que responden a péptidos UL25. C) Se representa el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos que responden contra péptidos UL25.

La Figura 10 muestra datos obtenidos cuando grupos de ratones BALB/c (5/grupo) se inmunizaron con un régimen de inmunización de primovacuna/refuerzo (d0 primovacuna/d21 refuerzo) con 4 µg de proteína gD recombinante en combinación con 4 µg de GLA-SE, SE sola o vehículo PBS, suministrados por vía intramuscular en 100 µl (50 µl por pata). Mediante un ensayo ELISA, se midieron los anticuerpos específicos de gD2 del VHS-2 de los isotipos de IgG, IgG1 e IgG2a.

La Figura 11 muestra datos obtenidos cuando a grupos de cinco ratones C57BL/6 se les proporcionó una sola inmunización intramuscular de vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2, UL19ud y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con productos de vacuna control. El día 6 después de la inmunización se midieron las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 esplénicos específicos de antígeno mediante tinción intracelular de citocinas para IFN-γ, TNF-α e IL-2 después de la reestimulación *ex vivo* de cultivos de esplenocitos durante 5 horas con péptidos gD2, UL19 o UL25. A) Frecuencia y fenotipo de citocinas de linfocitos T CD4 que responden a péptidos de gD2, UL19ud o UL25. B) Frecuencia y fenotipo de citocinas de linfocitos T CD8 que responden a péptidos UL19. C) Frecuencia de linfocitos T CD8 que responden a péptidos UL19 en ratones que se inmunizaron 4 semanas antes con vacuna trivalente con GLA-SE y que se expusieron por vía subcutánea al virus VHS-2 atenuado deficiente en timidina cinasa (TK-).

La Figura 12 muestra datos obtenidos cuando a grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, con una diferencia de 28 días, de una vacuna bivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2 y UL19ud recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5 %. Los ratones inmunizados sólo con 5 µg de GLA-SE sirvieron como controles negativos. Veintidós (22) días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona de liberación prolongada y seis días después se expusieron a una dosis de 50xLD50 de VHS-2 de tipo silvestre por vía intravaginal. Los ratones se monitorizaron a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. Los días 1, 3, y 5 después de la infección, se recogieron frotis vaginales para la cuantificación de ADN del VHS-2 mediante PCR. Aproximadamente dos meses después de la infección, se extrajeron los ganglios de la raíz dorsal de los ratones supervivientes y el ADN del VHS-2 latente se cuantificó mediante PCR. 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 y aumentaron la supervivencia en comparación con los ratones inmunizados sólo con gD2 y UL19ud o 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 del VHS-2 el día 5, mientras que los ratones del grupo de control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina hasta el día 5. Como se representa en la Figura 12, panel C, aunque había tres supervivientes en el grupo tratado 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 datos obtenidos cuando ratones C57BL/6 (5/grupo) se infectaron por vía subcutánea con una dosis subletal de virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-), y después de 28 días se inmunizaron con una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada gD2, UL19ud y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con vehículo de dextrosa al 5 %. Los grupos de control incluían ratones infectados tratados solo con GLA-SE o solo con vehículo, así como ratones sin tratamiento previo tratados solo con vehículo. Seis días después de la inmunización, las respuestas de los linfocitos T CD8 (panel superior) y de los linfocitos T CD4 (panel inferior) específicos de UL19, se midieron mediante ICS después de la estimulación con péptidos UL19.

La Figura 14 muestra datos obtenidos cuando cerdos de guinea (7/grupo) se infectaron por vía intravaginal con una dosis subletal de la cepa 333 del virus VHS-2 y se trataron después, los días 13 y 27, tras la infección con una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada gD2, UL19ud y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE. Los cerdos de guinea infectados tratados solo con GLA-SE sirvieron como controles negativos. Los animales se monitorizaron 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 representaron frente al tiempo.

La Figura 15 muestra datos obtenidos cuando a grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, con una diferencia de 28 días, de una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada gD2, UL19ud (véase la SEQ ID NO:12) y UL25 recombinante, en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5 %. Los ratones inmunizados solo con 5 µg GLA-SE sirvieron como controles negativos. Un grupo de control adicional consistió 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 de la exposición. Veintidós días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona de liberación prolongada y seis días después se expusieron a una dosis de 50xLD50 de VHS-2 de tipo silvestre por vía intravaginal. Los ratones se monitorizaron 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 de gD2, UL19ud (SEQ ID NO:12) y UL25 (véase la Figura 15 para la descripción de los grupos de ratones). Los días 1, 3, y 5 después de la infección, se recogieron frotis vaginales para la cuantificación de ADN del VHS-2 mediante PCR.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas inmunogénicas y métodos para el tratamiento o para la prevención de infecciones causadas por el virus del herpes simple, que incluyen infecciones por VHS-1 y VHS-2. Las composiciones comprenden proteínas víricas VHS-2 inmunogénicas o partes inmunogénicas de proteínas víricas, tal como fragmentos o péptidos, y al menos un agente que activa el sistema inmunitario innato, preferiblemente un agonista de TLR4, por ejemplo, un adyuvante de MLA como se describe en la presente memoria. Las proteínas víricas (y fragmentos y péptidos) comprenden al menos una glucoproteína de envoltura y al menos una, dos, tres o cuatro proteínas estructurales diferentes a una glucoproteína de envoltura. De manera alternativa, las proteínas víricas (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 utilizar fragmentos inmunogénicos. Algunos agentes específicos útiles en las composiciones incluyen adyuvantes, sustancias que mejoran la respuesta inmunitaria a un antígeno. Las proteínas y fragmentos se producen normalmente mediante tecnología recombinante en donde la proteína o proteínas o el fragmento o fragmentos se expresan en células cultivadas. Los péptidos también se pueden sintetizar a través de medios químicos.

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

El VHS-2 (virus de herpes simple de tipo 2) es un virus con envoltura. Su genoma se expresa a lo largo de 75 proteínas diferentes. Muchas de las proteínas son estructurales y se usan para formar la cápside y el tegumento, mientras que algunas otras son parte de la envoltura. Las principales proteínas de la cápside incluyen las que se expresan a partir de marcos abiertos de lectura (los nombres de las proteínas están entre paréntesis si el nombre común difiere del nombre del ORF (siglas del inglés *open reading frame*, marco abierto de lectura)) 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 (glucoproteína 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 con el N.º de registro NC 001798.1 (fecha de actualización del 23 de abril de 2010, 2:16 pm, entrada del 10 de enero de 2011). Se entiende que los nombres de la proteína usada normalmente pueden ser diferentes de los nombres genéticos, por ejemplo, UL19 codifica a VP5, pero en la presente memoria la referencia al nombre del gen es la misma que la referencia 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) engloba a cualquiera de dichas proteínas obtenibles a partir de cualquier VHS-2 de origen natural. Ya se conocen diversas secuencias y están depositadas en bases de datos. El ácido nucleico que codifica una proteína del VHS-2 con una secuencia alternativa, se puede aislar o amplificar fácilmente de uno o más VHS-2 (por ejemplo, de un aislado de VHS-2 depositado o de un aislado clínico) con sondas o cebadores oligonucleotídicos adecuados (por ejemplo, que se hibridan de manera específica con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas). Dentro de dicho grupo de ácidos nucleicos que codifica una proteína del VHS-2, por ejemplo, una proteína UL, un ácido nucleico del grupo se hibridará en condiciones rigurosas con el complemento de otro ácido nucleico dentro del grupo.

La expresión “en condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las cuales una sonda se hibridará preferentemente con su subsecuencia diana, y en menor grado, o nunca, con otras secuencias. “Hibridación rigurosa” y “condiciones de lavado de hibridación rigurosa” en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico, tal como hibridaciones Southern o 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 rigurosa y las condiciones de lavado son de aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH determinados. La Tm es la temperatura (a una fuerza iónica y un pH determinados) a la cual el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. En determinadas realizaciones, las condiciones rigurosas son iguales a la Tm para una sonda particular.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o Northern es con formol al 50 % con 1 mg de heparina a 42°C, realizándose la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado extremadamente rigurosas es con NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (véase Sambrook et al. para la descripción del tampón SSC). Un lavado muy riguroso puede ir precedido de un lavado poco riguroso para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex, por ejemplo, de más de 100 nucleótidos, es con SSC 1x a 45° C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de rigurosidad baja para un dúplex, por ejemplo, de más de 100 nucleótidos, es con SSC 4-6x a 40° C durante 15 minutos. En general, una relación de señal con respecto a fondo de 2x (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular, indica detección de una hibridación específica.

Debido a que en la entrada vírica en las células hospedadoras está implicada una o más proteínas de envoltura, los anticuerpos contra las proteínas de envoltura pueden neutralizar los virus, es decir, prevenir la infección o reinfección del virus. Sin querer estar sujeto a una teoría mecanicista, el suscitar anticuerpos contra una o más de esas proteínas de la envoltura, necesarias para la entrada celular, es una manera de obtener anticuerpos neutralizantes. Las vacunas que comprenden virus completos, normalmente virus inactivados, presentan de manera natural proteínas de envoltura a las células inmunitarias. Para una vacuna que comprende proteínas víricas individuales, una estrategia para obtener una respuesta de 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, al menos alguna de ellas está implicada en la entrada celular, incluyendo pero sin limitación, gB, gD, gH, y gL. La proteína gD parece unirse de forma específica a un receptor del VHS-2 en las células, y gB, junto con el heterodímero gH/gL, parece mediar en la fusión de la membrana. Por tanto, estas cuatro glucoproteínas de envoltura son elecciones excelentes como inmunógenos para su inclusión en una vacuna ya que los anticuerpos suscitados contra estas glucoproteínas de envoltura pueden incluir anticuerpos neutralizantes. De manera alternativa, o además, las glucoproteínas de envoltura implicadas en la propagación de virus son también candidatas como inmunógenos para su inclusión en una vacuna.

La mayoría de las proteínas estructurales del VHS-2, distintas de las proteínas de la envoltura, se encuentran en la cápside y en el tegumento. El tegumento ocupa el espacio entre la cápside y la envoltura. En el tegumento hay aproximadamente 20 proteínas víricas. Las proteínas del tegumento son importantes para diversas funciones víricas, entre las que se incluyen, la modulación inmunológica, el ensamble vírico 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 se suscita una respuesta celular contra proteínas estructurales y contra varias proteínas del VHS (Hosken et al., J Virol 80:5509-55515, 2006). Generalmente, la respuesta celular implica a linfocitos T tanto CD4 como CD8, tipos de células que desempeñan un papel en la lucha contra las infecciones causadas por el VHS.

La composición farmacéutica inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) desvelada en la presente memoria, comprende, como inmunógenos, dos o más proteínas estructurales, una de las cuales es una glucoproteína de envoltura y la otra es una que es distinta de una glucoproteína de envoltura. Aunque se puede utilizar cualquiera de las proteínas estructurales, la elección debe guiarse por la facilidad de producción, capacidad para formularse en una composición farmacéutica, información sobre la estructura proteica, y altos niveles de expresión. Dado que las respuestas de linfocitos T están normalmente limitadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés), una vacuna contiene generalmente proteínas o péptidos que responden al mayor número de tipos de MHC, y también pueden contener también múltiples proteínas o péptidos para aumentar el número de individuos que responderán.

Las composiciones farmacéuticas, inmunogénicas, son preferiblemente estériles, carecen o carecen sustancialmente de otros contaminantes víricos y carecen o carecen sustancialmente de sustancias pirogénicas, tales como LPS. Dichas composiciones son para su uso como vacunas.

Las proteínas estructurales de envoltura y de no envoltura para su uso en una vacuna como inmunógenos son normalmente proteínas de longitud completa, pero también puede ser una proteína precursora, un fragmento, o una parte de una proteína de fusión. Una proteína de longitud completa se refiere a una proteína madura; por ejemplo, en el caso de una proteína de envoltura, una proteína madura es la forma que se encuentra en la envoltura (por ejemplo, que carece de un péptido líder). Una proteína precursora (pre-proteína) es la proteína naciente, traducida antes de que ocurra cualquier procesamiento, o una proteína procesada parcialmente. Como parte de una proteína de fusión, la proteína del VHS-2 puede estar presente como una proteína precursora o de longitud completa o como un fragmento proteico. Un fragmento de una proteína deberá ser inmunogénico, conteniendo uno o más epítopos que susciten una respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica, inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) desvelada en la presente memoria, comprende, como inmunógenos (i) un producto génico de grupo α del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (ii) un producto génico de grupo β 1 del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo;

y/o (iii) un producto génico de grupo $\beta 2$ del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (iv) un producto génico de grupo $\gamma 1$ del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o (v) un producto génico del grupo $\gamma 2$ del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo. Los genes α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Herpesviruses and Their Replication in FUNDAMENTAL VIROLOGY, Capítulo 29, 1986.

5 Por tanto, cualquier uso del término "inmunógeno" en la presente memoria se refiere a todo un grupo 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 partes de un polipéptido diferente, y (5) conjugados de los mismos. En varias realizaciones, las
10 proteínas estructurales de envoltura y de no envoltura para su uso en una vacuna, incluyen un polipéptido que comprende cualquiera de un fragmento inmunogénico de los mismos o una variante de los mismos capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica para la proteína.

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

25 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 o 50 aminoácidos contiguos del antígeno. El fragmento inmunogénico puede comprender cualquier número de aminoácidos contiguos entre los anteriormente mencionados de tal manera 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.

30 A menudo se eligen fragmentos cortos, denominados péptidos, para formar complejos con moléculas del MHC para unirse a receptores de linfocitos T y, generalmente, tiene una longitud de hasta aproximadamente 30 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 25 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 20 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 15 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 12 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 9 aminoácidos, o de hasta aproximadamente 8 aminoácidos. En general, los péptidos más cortos se unen o asocian a moléculas del MHC de Clase I, y los péptidos más grandes se unen o asocian a moléculas del MHC de Clase II. Los péptidos adecuados se pueden predecir utilizando cualquiera de los diversos programas bioinformáticos y se pueden ensayar empleando métodos muy conocidos. Los fragmentos cortos, también denominados en la presente memoria "péptidos", tienen normalmente una longitud de 15-100 aminoácidos; los fragmentos más largos tienen normalmente una longitud de 100 aminoácidos hasta alcanzar la longitud completa, si bien los intervalos de longitud para los péptidos (fragmentos cortos) y fragmentos más largos, no son rígidos.

35 Como se desvela en la presente memoria, las proteínas adecuadas incluyen 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 glucoproteína de envoltura se puede presentar como una proteína madura y una proteína estructural como un fragmento o una glucoproteína de envoltura se puede se presentar como un fragmento y una proteína estructural como un fragmento. Para la producción celular de la glucoproteína, un péptido señal puede ser parte de la proteína precursora. Los péptidos señal incluyen la secuencia de glucoproteína D nativa u otras conocidas en la técnica. También puede ser deseable utilizar una proteína que no tenga una región transmembrana o intracelular o ambas cosas.

45 50 Como se indica en la presente memoria, una o más partes de una glucoproteína de envoltura, también denominadas fragmentos, se eligen por contener uno o más epítomos que se unen a anticuerpos neutralizantes. Las partes que contienen epítomos se pueden identificar mediante un ensayo, tal como un ensayo de inhibición de anticuerpos neutralizantes sobre la infección vírica de células. En resumen, partes solapantes de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 se mezclan con anticuerpos neutralizantes (por ejemplo, suero de un animal o ser humano infectado), y la mezcla se añade a VHS-2 y a una línea celular permisiva. Si una parte tiene un epítomo que se une a los anticuerpos, la línea celular se infectará con el VHS-2. Si la parte no tiene un epítomo, la línea celular no se infectará.

55 60 Las composiciones que comprenden al menos un fragmento inmunogénico de un polipéptido VHS-2 inmunogénico se pueden utilizar 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 un número suficiente de aminoácidos contiguos
65

que formen un epítipo lineal y/o pueden comprender un número suficiente de aminoácidos contiguos que permitan al fragmento plegarse en la misma (o suficientemente similar) conformación tridimensional que el polipéptido de longitud completa del que deriva el fragmento, para presentar un epítipo o epítipos no lineales (también referidos en la técnica como epítipos conformacionales). Los ensayos para evaluar si el fragmento inmunogénico se pliega en una conformación comparable a la del polipéptido de longitud 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 conservación de otras funciones de unión a 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, como ejemplo, la conformación tridimensional de un fragmento polipeptídico es suficientemente similar a la del polipéptido de longitud completa cuando la capacidad de unirse, y el nivel de unión de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de longitud completa, es sustancialmente la misma para el fragmento que para el polipéptido de longitud completa (es decir, el nivel de unión se ha mantenido a un grado estadístico, clínico y/o biológicamente suficiente en comparación con la inmunogenicidad del antígeno de longitud completa a modo de ejemplo o de tipo silvestre).

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

Los fragmentos que se unen al anticuerpo neutralizante se escogen y se pueden utilizar en una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria. Los fragmentos se pueden utilizar "tal cual" 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 utilizar en composiciones farmacéuticas. Probablemente, los fragmentos que tienen un PM de aproximadamente 1000 son 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 solo aminoácido, son malos inmunógenos, independientemente de su tamaño, mientras que los copolímeros de 2 o 3 aminoácidos pueden ser buenos inmunógenos. Un copolímero de ácido glutámico y lisina necesita tener un PM de al menos aproximadamente 30-40.000 para ser inmunogénico. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas aumentan la inmunogenicidad, de tal manera que un fragmento que tenga un PM sólo de aproximadamente 4000 que comprenda tirosina y fenilalanina puede ser inmunogénico. Los fragmentos que son demasiado cortos o no lo suficientemente complejos para ser inmunogénicos se pueden conjugar con una proteína transportadora, tal como KLH (hemocianina de lapa californiana), 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 entre sí 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 primovacunación-refuerzo, y evaluar, por ejemplo, mediante ELISA, los anticuerpos contra el fragmento, utilizando el suero extraído 7-10 días después del refuerzo. Una señal detectable indica que el fragmento es inmunogénico. Son deseables señales altas. El experto familiarizado con la técnica conoce otros ensayos para evaluar la inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, los fragmentos utilizados en la composición, son péptidos largos sintéticos. "Péptido largo sintético" (SLP, siglas del inglés *Synthetic Long Peptide*) se refiere a una secuencia proteica producida *ex vivo* y 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 para ser tomado y procesado por las células dendríticas para su presentación en su superficie celular con moléculas MHC de clase I o de clase II. Los SLP son péptidos derivados de proteínas contra las que se desea una respuesta inmunitaria. En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos 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 de CD4 o al menos un epítipo de CD8 o al menos un epítipo de CD4 o al menos un epítipo de CD8. Un epítipo de CD4 se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une a un MHC de clase II y un epítipo de CD8 se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une a un MHC de clase I. Las secuencias epitópicas 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 a moléculas del MHC y se presentan sobre la superficie celular como un complejo MHC- péptido. Los péptidos que forman complejos con moléculas del MHC de clase I interactúan con el receptor de antígenos de linfocitos T y CD8 en los linfocitos T CD8+, estos péptidos se denominan epítipos CD8; los péptidos que forman complejos con moléculas del MHC de clase II interactúan con el receptor de antígenos de linfocitos T y CD4 en los linfocitos T CD4+, estos péptidos se denominan epítipos CD4. Los linfocitos T CD8+ activados se convierten en linfocitos T citotóxicos, que reconocen y destruyen células diana que presentan los epítipos CD8-MHC de clase I. A menudo, las células diana son células infectadas o tumorales. Los linfocitos T

CD4+ activados se convierten en linfocitos T auxiliares, y dependiendo de su subtipo, los linfocitos B auxiliares producen anticuerpos o activan linfocitos citolíticos, fagocitos y linfocitos T CD8+. La activación de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, contribuye a una respuesta inmunitaria celular exhaustiva.

- 5 Como se ha desvelado 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 que forman complejos con moléculas MHC de clase I tienen generalmente una longitud de 8-11 aminoácidos y los péptidos que forman complejos con moléculas MHC de clase II tienen generalmente una longitud de 13-17 aminoácidos, aunque son habituales longitudes mayores o menores. Como tal, un SLP tendrá normalmente una longitud de al menos 25
- 10 aminoácidos y una longitud de hasta 100 aminoácidos (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 será generalmente de aproximadamente 45 aa o aproximadamente 50 aa.
- 15 Los epítomos pueden tener secuencias conocidas o secuencias desconocidas. Se ha mapeado una multitud de proteínas para los epítomos CD4 y CD8. Para los SLP, 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 lados del extremo N-terminal y C-terminal. Las secuencias flanqueantes son normalmente las secuencias que flanquean la secuencia del epítomo en la proteína nativa. Como se ha indicado
- 20 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 SLP a modo de ejemplo que comprenden epítomos solapantes). El número total de SLP utilizados puede ser tal que se representen todos los epítomos CD4 y CD8 conocidos.
- 25 Los SLP se pueden sintetizar mediante varios métodos (véase Corradin et al., *Sci Translational Med* 2:1, 2010 para una discusión general de los métodos de síntesis). En el comercio se dispone de 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 utilizar métodos de purificación de alternativos, tal como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de filtración en gel. Una pureza aceptable, evaluada mediante
- 30 HPLC analítica, es una pureza de al menos 90% o de al menos 95% o de al menos 98%.

- 35 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 SLP. Normalmente cada SLP tendrá aproximadamente 50 aa, y los SLP consecutivos se pueden solapar en la secuencia mediante aproximadamente 25 aa. De manera alternativa, o además, se pueden utilizar algoritmos y programas informáticos para predecir secuencias que se unirán a moléculas MHC de clase I o de clase II. Dichos 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.).
- 40

- La secuencia de un SLP puede ajustarse, según sea 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
- 45 secuencia peptídica con un alto contenido en aminoácidos hidrófobos puede ser difícil de solubilizar. Como referencia, el contenido hidrófobo 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
- 50 el grado de formación de lámina β , el aminoácido N-terminal (por ejemplo, se puede ciclar un Gln N-terminal), la minimización de restos de Ser y Pro.

- Algunas proteínas estructurales que son especialmente útiles para la inclusión en una composición farmacéutica incluyen UL19 (SEQ ID NO:4), un Fragmento de Dominio Superior de UL19 (SEQ ID NO:12), UL25 (SEQ ID NO:5) y
- 55 UL47 (SEQ ID NO:6). La estructura de proteínas víricas se puede encontrar en la MMDB (Molecular Modeling Database) del NCBI. Está disponible información estructural molecular para UL25 (MMDB ID: 37706, Bowman et al. *J. Virol.* 80:2309, 2006), VP5 (producto de UL19) (MMDB ID: 26005, Bowman et al., *EMBO J.* 22: 757-765, 2003), 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), ICP34.5, así como cualquier otra proteína VHS-2. Además, son conocidos algunos
- 60 epítomos de linfocitos T de proteínas víricas (Koelle et al., *J. Virol* 74:10930-10938, 2000; 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; Patente de Estados Unidos N.º 6.855.317; P.C.T. Pub. N.º WO 2004/009021).

- 65 Para el uso en las composiciones inmunogénicas de la presente memoria, se contemplan específicamente 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 una

cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6, o 12 que conserven una identidad de aminoácidos de al menos 90% sobre al menos 10 aminoácidos contiguos de las mismas o una identidad de aminoácidos de al menos 85% sobre al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas. 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 o 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 una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% sobre al menos 50 aminoácidos contiguos de la secuencia, o sobre al menos 100 aminoácidos contiguos de la secuencia. En algunas realizaciones, la variante es una variante de origen natural, preferiblemente una que, en condiciones rigurosas, se hibrida con un polinucleótido que codifica una cualquiera de las SEQ ID NO:4, 5, 6 o 12.

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 expone en las SEQ ID NO: 9 y 10 y péptidos UL25 como se expone en la SEQ ID NO:11) y de una proteína de envoltura (por ejemplo, gD2 SEQ ID NO 7 y 8), se pueden utilizar o pueden ser parte de una secuencia más larga (es decir, fragmento) derivada de la proteína. Péptidos, como se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias cortas de aminoácidos, generalmente de al menos 15 restos y generalmente de hasta aproximadamente 100 restos, o de aproximadamente 20 restos a aproximadamente 80 restos, o de aproximadamente 30 restos a aproximadamente 70 restos. Fragmentos, como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido de cualquier longitud menor que la de proteína completa y tiene generalmente una longitud de al menos 100 aminoácidos, 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 de 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 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 de UL19 puede comprender aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 aminoácidos o más de SEQ ID NO:12.

Además, los péptidos y fragmentos de la presente memoria, se pueden fusionar con péptidos heterólogos. Los ejemplos de péptidos heterólogos incluyen secuencias de otras proteínas (por ejemplo, en el caso de UL19, un Fragmento de Dominio Superior de UL19 se puede fusionar con una secuencia de otra proteína que no sea UL19), o secuencias identificadoras, tal como de hexahistidina, que generalmente se localizarán en el extremo N-terminal o C-terminal. Por tanto, los fragmentos inmunogénicos o variantes descritos en la presente memoria, se pueden fusionar con otro péptido que mejore la inmunogenicidad, con otro péptido que sirva como un indicador o marcador o con otro péptido de otra proteína estructural del VHS-2. Como tal, un polipéptido inmunogénico puede comprender un fragmento que consista en un fragmento determinado de una proteína estructural del VHS-2. En un ejemplo, un polipéptido inmunogénico comprende un fragmento de UL19 que consiste en la SEQ ID NO:12 o en un fragmento de la SEQ ID NO:12, fusionado opcionalmente con 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% idéntica sobre 50 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:12, fusionado opcionalmente con un péptido que no es UL19.

Sorprendentemente, los ejemplos de la presente memoria muestran que un Fragmento de Dominio Superior de 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 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.

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 gD engloba aproximadamente 1-25 restos. La secuencia líder de gB engloba aproximadamente 1-22 restos. La glucoproteína D (SEQ ID NO:2) es una proteína de 393 aminoácidos y tiene una región extracelular con una extensión de aproximadamente 26-340 restos, una región transmembrana con una extensión de aproximadamente 341-361 aminoácidos y una región citoplasmática con una extensión de aproximadamente de -393 restos, y un número de sitios de glucosilación unidos a N en los restos 119, 146, 287 (UniProtKB/Swiss-Prot número de registro Q69467, versión 49 de entrada y versión 1 de secuencia). Un ejemplo de un fragmento gD (en la presente memoria denominado de manera alternativa gD2) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, los fragmentos inmunogénicos y antigénicos a partir de glucoproteínas 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, algunas de las proteínas en virus intactos pueden tener la secuencia

líder. 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 glucoproteínas de envoltura de VHS-2. Para otras glucoproteínas 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/embosss/apps/sigcleave.html).

Se puede utilizar varias técnicas para inhibir la escisión del péptido señal durante la producción celular de un fragmento antigénico o inmunogénico que contiene la secuencia líder para utilizar en las composiciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden alterar uno o más aminoácidos que flanqueen el lugar de escisión de un aminoácido diferente, dando como resultado una secuencia que el aparato celular no reconoce ni escinde. Para este método, se han diseñado alteraciones en función de los sitios de escisión 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 escisión, mientras que prolina se encuentra a menudo en muchas posiciones de escisión 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 escisión. Si la escisión es factible, a continuación se realizan alteraciones adicionales y se reevalúa la nueva secuencia propuesta. Otras técnicas para inhibir la escisión de un péptido señal incluyen la adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de reconocimiento y escisión, la adición en el extremo N-terminal de un péptido señal y una secuencia de reconocimiento, tal que el péptido señal añadido se escinde preferiblemente, y la producción en una célula hospedadora carece de la maquinaria para escindir el péptido señal.

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

La glucoproteína 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 a N en los restos 82, 136, 393, 425, 486, 671 (UniProtKB/Swiss-Prot número de registro P08666, versión 60 de entrada y versión 2 de secuencia). La glucoproteína 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 glucoproteína C tiene una secuencia líder determinada de 27 aminoácidos, la glucoproteína E tiene una secuencia líder determinada de 23 aminoácidos, y la glucoproteína L tiene una secuencia líder determinada de 16 aminoácidos (Signal Peptide Resource, proline.bic.nus.edu.sg, registrada el 6 de octubre de 2011).

Las proteínas o fragmentos de proteínas son preferiblemente inmunogénicos. Un "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Las secuencias peptídicas inmunogénicas son reconocidas generalmente por linfocitos T (por ejemplo, linfocitos 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 utilizar varios ensayos para determinar si los linfocitos 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), el ensayo ELISPOT, la tinción intracelular de citocinas y la tinción de multímeros del 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 glucoproteínas 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 Estados Unidos* 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 (Donnes 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).

Cualquiera de las proteínas de VHS-2, incluyendo proteínas precursoras, proteínas maduras y fragmentos, incluyendo péptidos, se pueden incorporar como parte de una proteína de fusión. El compañero o compañeros de fusión asociado(s) puede ser de cualquier proteína de VHS-2 o una secuencia de proteína de VHS-2. Algunas razones habituales para utilizar 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 adaptada para un sistema de expresión de una célula hospedadora se puede unir a una proteína de VHS-2 o a una secuencia marcadora para utilizar en la purificación proteica, y posteriormente escindirla si se incorpora también una secuencia de escisión. 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 extremo N- terminal. De forma similar, los múltiples epítomos peptídicos pueden estar en cualquier orden.

La producción de proteínas de VHS-2, incluyendo 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 utiliza en la presente memoria para incluir todas estas formas). Los fragmentos cortos se sintetizan normalmente de forma química, utilizando un aparato (muchos de ellos disponibles en el comercio) o de forma manual. Si se producen mediante células, se conoce y se puede utilizar varios sistemas de expresión adecuados tanto para sistemas procariotas como eucariotas. Como células hospedadoras que se utilizan a menudo para la producción adecuada de proteínas se incluyen *E. coli*, levaduras, insectos y mamíferos. En el comercio se dispone de vectores de expresión y de células hospedadoras (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 de tal manera que el promotor y la secuencia se unen operativamente. Se pueden presentar otros elementos, tal como una secuencia señal de secreción (a veces denominada secuencia líder), una secuencia marcadora (por ejemplo, hexaHis), una señal de terminación de la transcripción, un origen de replicación, específicamente si el vector se replica extracromosómicamente, 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 utilizar "como tal" o más normalmente, se analizan y además se purifican. Los procedimientos típicos para determinar la pureza o cantidad incluyen electroforesis en gel, transferencia Western, 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. Se conocen bien muchos métodos de purificación 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 purificación, requiriendo el uso en seres humanos probablemente el nivel más alto de pureza.

B. Agentes que activan la inmunidad innata

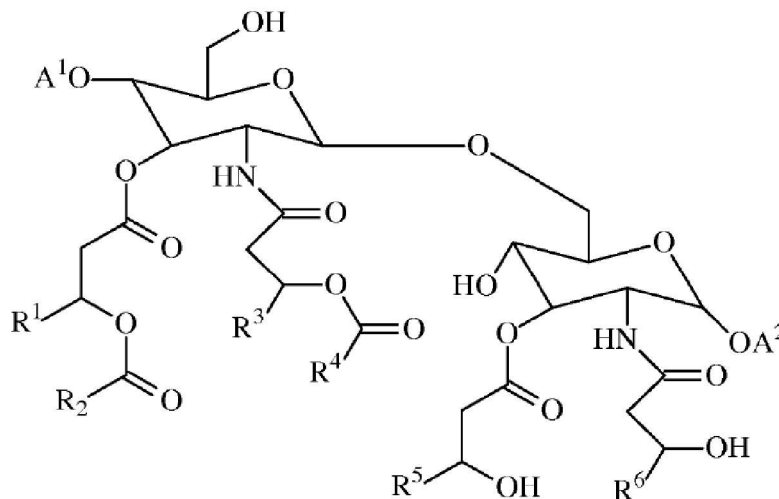
El sistema inmunitario innato comprende células que proporcionan protección de una manera específica a la infección por otros organismos. La inmunidad innata es una protección inmediata pero no es tan prolongada o protectora contra amenazas futuras. Las células del sistema inmunitario que tienen normalmente un papel en la inmunidad innata son los fagocitos, tal como macrófagos y células dendríticas. El sistema inmunitario innato interactúa con el sistema inmunitario adaptativo (también denominado adquirido) en varias formas. Las células del sistema inmunitario innato pueden participar en la presentación del antígeno a las células del sistema inmunitario 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 citocinas que reclutan y activan células del sistema inmunitario 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, dúplex de ADN, ARN monocatenario y otras moléculas. Muchos de los agentes actúan a través de una familia de moléculas - los receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *Toll-like receptors*). La participación de un TLR puede conducir también a la producción de citocinas y quimiocinas 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 varios agentes, que incluyen lipoproteína, peptidoglicano, la flagelina, imidazoquinolinas, ADN CpG, lipopolisacárido y ARN bicatenario (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, en la composición se incluyen 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 inmunitaria. Se han proporcionado varios 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 inmunitario innato, dando como resultado la producción de quimiocinas y citocinas, que activan a su vez la respuesta inmunitaria adaptativa (adquirida). En particular, algunos adyuvantes activan a células dendríticas a través de los TLR. Por tanto, un adyuvante es un tipo de agente que activa el sistema inmunitario innato que puede utilizarse en una vacuna para el VHS-2. Un adyuvante puede actuar para mejorar una respuesta inmunitaria adquirida también de otras maneras. El adyuvante es, preferiblemente un agonista TLR4.

Un adyuvante que se puede utilizar en las composiciones descritas en la presente memoria es una molécula de tipo monofosforil lípido A (MLA). Un ejemplo de un adyuvante de MLA es el MLP® como se describe, por ejemplo, en

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 MLA es el que se describe mediante la fórmula química (I):



(I)

5

en donde las fracciones A^1 y A^2 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 una de A^1 o A^2 es hidrógeno. Las fracciones R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , y R^6 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 fracción se selecciona "independientemente de" un grupo especificado que tiene múltiples miembros, se deberá entender que el miembro elegido para la primera fracción no tiene impacto o limita de ninguna manera la elección del miembro seleccionado para la segunda fracción. Los átomos de carbono unidos a R^1 , R^3 , R^5 y R^6 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.

10

15

20

25

30

35

"Hidrocarbonilo" o "alquilo" se refiere a una fracción 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 alquilo 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 alquilo 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.

40

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 en las publicaciones identificadas en el documento 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 Lipis, Alabaster AL, en donde R^1 , R^3 , R^5 y R^6 son undecilo y R^2 y R^4 son tridecilo.

45

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 utilizado en los ejemplos de la presente memoria tiene la fórmula expuesta en la Figura 1, en donde R1, R3, R5 y R6 son undecilo y R2 y R4 son tridecilo.

Los adyuvantes de MLA descritos anteriormente son una clase de adyuvante preferido para utilizar en composiciones farmacéuticas inmunogénicas descritas en la presente memoria. Sin embargo, en la formulación con la composición farmacéutica inmunogénica se puede utilizar cualquiera de los siguientes adyuvantes en solitario, o en combinación con un adyuvante de MLA.

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 contiene 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 oleaginosos 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 comentada 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 la que se obtiene de la corteza del árbol de la especie *Quillaja saponaria*, o una saponina modificada, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 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 utilizar 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 procedentes de *Quillaja saponaria* o de análogos sintéticos, colesterol, y fosfolípido, todos en forma de una estructura similar a un panal de abeja.

El adyuvante puede ser una citocina 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 citocina 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-a (IFN-a) o interferón-p (IFN-p), o un interferón tipo II, por ejemplo, interferón-Y (IFN-y), 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-1a (IL-1a), interleuquina-1p (IL-1p), 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 a de necrosis tumoral (TNFα).

El adyuvante puede ser dinucleótidos CpG no metilados, conjugados opcionalmente con los antígenos descritos en la presente memoria.

Ejemplos de inmunopotenciadores que se pueden utilizar 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); citocinas; y quimiocinas.

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 utilizar 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 inmunitario innato del sujeto. La activación del sistema inmunitario innato da como resultado la producción de quimiocinas y citocinas, que pueden activar a su vez una respuesta inmunitaria adaptativa (adquirida). Una consecuencia importante de la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa es la formación de células inmunológicas de memoria para que cuando el hospedador se reencuentre con el antígeno, la respuesta inmunitaria 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 donde el adyuvante se incorpora en la fase oleaginoso. 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 oleaginoso con un tensioactivo, tal como fosfatidilcolina, poloxámero, copolímero 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 microfluidica M110S, máximo de 50 pases, 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 utilizar otros equipos o parámetros para generar una emulsión. En las patentes de Estados Unidos N.º 5.650.155; 5.667.784; 5.718.904; 5.961.970; 5.976.538; 6.572.861; y 6.630.161, pueden encontrarse, por ejemplo, divulgaciones de composiciones de emulsión, y métodos para su preparación.

C. Composiciones farmacéuticas y usos

1. Formulación

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

En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende una parte antigénica de una glucoproteína de VHS-2, un transportador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un agente que es un agonista del sistema inmunitario innato. La composición puede comprender más de una parte de glucoproteína 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 glucoproteínas de VHS que se comentan son principalmente de VHS-2, también se pueden utilizar glucoproteínas de VHS-1.

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

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 150 µg o aproximadamente 200 µg o aproximadamente 250 µg o cualquier otra cantidad adecuada que se determine para proporcionar eficacia frente al VHS-2. Las proteínas o fragmentos inmunológicos se pueden presentar en varias proporciones, incluyendo
15 proporciones equimolares, que proporcionan representación de epítomos 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 la afección del sujeto.
20

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.
30 Normalmente, los aditivos son farmacéuticamente aceptables y biocompatibles. Preferiblemente, los aditivos, inmunógenos, agentes etc., carecen 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 propulsor.
35

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.
40

Cualquiera de estas formulaciones puede comprender también tampones, estabilizantes, conservadores, transportadores, u otros ingredientes no activos. Normalmente, los aditivos son farmacéuticamente aceptables y biocompatibles. 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 oleaginosas.
45

La cantidad de un agente adyuvante, tal como GLA u otro adyuvante de MLA, 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, puede estar presente a aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7,5 % o aproximadamente 10 %.
50

El agente y las proteínas se pueden proporcionar en recipientes distintos y mezclarse o mezclarse previamente *in situ*. Además, las proteínas se pueden presentar en recipientes distintos o combinados en un solo 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, una ampolla, un tubo, un pocillo de un dispositivo multipocillo, un depósito, una 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, en el kit
55
60
65

pueden incluirse líquidos para la reconstitución o ser suministrados 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 tiene normalmente un volumen de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2,0 ml, mientras que una vacuna que se proporciona por vía oral puede tener mayor volumen, por ejemplo, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml. Los volúmenes adecuados pueden variar también según el tamaño y la edad del sujeto.

2. Administración

La composición se puede utilizar para el tratamiento en sujetos de una infección causada por VHS-2. Como se utiliza 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 o se sabe que tiene una infección causada por VHS-2. La composición se proporciona en una cantidad suficiente para generar (inducir) una respuesta inmunitaria 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 que es susceptible o que está en riesgo de padecer una infección causada por VHS-2, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria 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 terapéutica o farmacéuticamente eficaz. Tal cantidad se puede administrar como una sola dosis 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.

En los regímenes tanto terapéuticos como profilácticos, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se haya alcanzado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se proporcionan dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a desaparecer. El tratamiento no tiene por qué eliminar por completo la enfermedad, ni evitar por completo que el sujeto se 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 denomina dosis de "primovacunación" y la segunda y posteriores dosis se denominan 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 de una o dos administraciones. Cuando se proporcionan administraciones múltiples, el plazo de la segunda y posteriores administraciones, será generalmente de 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, una respuesta inmunitaria se monitoriza para determinar si serían ventajosas dosis múltiples. 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 primovacunación 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 primovacunación 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 inmunitaria contra el VHS-2. La respuesta inmunitaria puede ser humoral (mediada por anticuerpo) o celular (normalmente, aunque no exclusivamente, mediada por linfocitos T) o ambas. El sujeto inmunizado puede activar también monocitos, macrófagos, linfocitos citolíticos (*NK cells*), células dendríticas, y otros tipos de células inmunológicas innatas. En la presente memoria se describen ensayos para una respuesta inmunitaria y son muy conocidos por un experto en la técnica.

La vacuna se administra a una dosis suficiente para efectuar una respuesta inmunitaria beneficiosa (dosis terapéuticamente eficaz), por ejemplo, una respuesta inmunitaria 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. Los indicadores de una respuesta terapéutica beneficiosa son menos lesiones herpéticas en cualquier brote determinado o un menor número de lesiones en promedio, 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 contra componentes de la vacuna de VHS-2, en particular, la presencia de anticuerpos contra glucoproteínas de la envoltura del VHS-2, por ejemplo, anticuerpos contra gD2, y también particularmente el desarrollo 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 implementación, el ensayo ELISA se realiza recubriendo pocillos de una placa multipocillo 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

5 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 donde el anticuerpo neutralizante se detecta mediante la inhibición de la formación de placas. Otros indicadores incluyen una cantidad o función o frecuencia aumentada de linfocitos T CD8 o CD4 sensibles a VHS-2, una reducción en la propagación del virus, reducción en la transmisión del virus a la pareja sexual y reducción del tamaño o frecuencia, o ambas cosas, de las lesiones sintomáticas.

10 Como ensayos para determinar la función de los linfocitos T se incluyen, ELISPOT para detectar IFN- γ y la ICS (del inglés *Intracellular Cytokine Staining*, tinción intracelular de citocinas). El ensayo ELISPOT, que detecta interferón-gamma, es muy utilizado para cuantificar las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 para vacunas candidatas. El ensayo ELISPOT se basa en el principio del ensayo ELISA que detecta la secreción inducida por antígeno de citocinas atrapadas por un anticuerpo inmovilizado y que se observa mediante un segundo anticuerpo acoplado a una enzima. La ICS es un método habitual para cuantificar la citotoxicidad de linfocitos T como consecuencia de la expresión de citocinas después de la estimulación con agonistas, tal como anticuerpos para moléculas de superficie de linfocitos T o péptidos que se unen a moléculas de Clase MHC. A continuación se describen ejemplos de procedimientos de ICS y ELISPOT.

20 Los sujetos que reciben la vacuna incluyen tanto 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.

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

30 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 (por ejemplo, Biojector, Bioject, OR EE.UU.), o un dispositivo de bolígrafo inyector, tal como los que se usan en autoinyecciones caseras para el suministro de insulina o epinefrina. Otras vías de suministro adecuadas son la intradérmica y la subcutánea. Dispositivos adecuados incluyen una jeringa y una aguja, la jeringa con una aguja corta, y dispositivos de inyección a chorro.

35 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.

40 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 pulverización 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 inmunitaria.

45

Vectores de expresión recombinante, vectores víricos y partículas similivíricas

50 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 inmunitaria 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 denominada secuencia o característica 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 inmunógeno 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.

60 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. Como ejemplo, un inmunógeno puede ser una proteína de VHS-2, tal como UL19 (por ejemplo, Fragmento de Dominio Superior de UL19 o un fragmento inmunogénico o variante del mismo) 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 o región inmunogénica de la proteína de VHS-2.

65

A. Producción de proteína recombinante

5 Para la producción del inmunógeno se puede utilizar un vector de expresión recombinante que comprenda una
 10 secuencia de polinucleótidos que codifique 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 utilizar para transformar,
 transducir o transfectar una determinada célula hospedadora para la producción recombinante de un respectivo
 15 inmunógeno. Células hospedadoras adecuadas para la producción del inmunógeno incluyen células procariotas,
 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
 20 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
 20 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. Estados Unidos 74:5463 (1997)) y el manual
 de secuenciación plc Amersham International e incluyendo las mejoras correspondientes.

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

Para la expresión de uno o más de los inmunógenos descritos en la presente memoria se pueden utilizar vectores de
 expresión recombinante. En realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante se suministra a una
 determinada célula (por ejemplo, una célula presentadora de antígeno, es decir, una célula que muestra un complejo
 30 MHC/péptido en su superficie celular, tal como una célula dendrítica) o tejido (por ejemplo, tejido linfóide) que
 inducirá la respuesta inmunitaria deseada (es decir, una respuesta humoral específica (es decir, respuesta de
 linfocitos B) y/o inducirá una respuesta inmunitaria mediada por células específicas, que puede incluir una respuesta
 de linfocitos T CD4 y/o CD8 específica del inmunógeno, cuya respuesta de linfocitos T CD8 puede incluir una
 35 respuesta de linfocitos T citotóxicos (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. En la técnica se conocen bien TRE específicos de
 tejido linfóide (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)).

40 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 una línea celular empaquetadora o productora. El plásmido comprende generalmente secuencias
 45 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 procariota 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 nucleotídicas que se incorporan en los plásmidos son correctas, el plásmido se
 50 puede replicar en *E. coli*, purificar y analizar mediante digestión con endonucleasas de restricción y/o determinar su
 secuencia de nucleótidos nucleotídica mediante métodos convencionales.

C. Vectores víricos

55 En otras realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante es un vector vírico. Como ejemplos de
 vectores víricos de expresión recombinante se incluyen un genoma de vector lentivírico, un genoma de vector
 poxvírico, un genoma de vector vírico variolovacunal, un genoma de vector vírico de virus adenoasociado, un
 genoma de vector herpesvírico y un genoma de vector vírico alfa. Los vectores víricos pueden estar vivos,
 60 atenuados, condicionados a replicación o tener una replicación deficiente, y normalmente es un vector vírico no
 patógeno (defectuoso) con replicación competente.

Como ejemplo, en una realización específica, cuando el vector vírico es un genoma de vector vírico variolovacunal,
 el polinucleótido que codifica un inmunógeno de interés se puede insertar en un sitio no esencial de un vector vírico
 variolovacunal. Tales sitios no esenciales se describen, por ejemplo, en Perkus et al., Virology 152:285 (1986);
 65 Hruby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 80:3411 (1983); Weir et al., J. Virol. 46:530 (1983). Promotores
 adecuados para su uso con virus variolovacunales incluyen, pero sin limitación, P7.5 (véase, por ejemplo, Cochran

et al., J. Virol. 54:30 (1985); P11 (véase, por ejemplo, Bertholet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 82:2096 (1985)); y CAE-1 (véase, por ejemplo, Patel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85:9431 (1998)). Las cepas del virus de la variolovacuna muy atenuadas, son más convenientes para su uso 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 de Estados Unidos N.º 5.698.530 y 6.998.252. Véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.443.964. Véanse también las patentes de Estados Unidos N.º 7.247.615 y 7.368.116.

En determinadas realizaciones, para expresar un inmunógeno de interés, se puede utilizar un vector de adenovirus o un vector de un virus asociado a adenovirus. 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. Estados Unidos 101:6188-93 (2004); las patentes de Estados Unidos N.º 6.143.290; 6.596.535; 6.855.317; 6.936.257; 7.125.717; 7.378.087; 7.550.296).

Genomas de vectores retrovíricos pueden incluir los que están basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia del Gibón (GaLV), retrovirus ecotrópico, virus de la inmunodeficiencia en 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)).

D. Vectores lentivíricos

En una realización más específica, el vector vírico de expresión recombinante es un vector génico lentiviral. El genoma puede proceder de cualquiera de diversos vectores adecuados y disponibles, basados en genoma lentivírico, incluyendo los 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 lentivíricos adecuados incluyen los 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 en simios (VIS), y virus Maedi Visna. Una característica deseable de los lentivirus es son capaces de infectar tanto a células que se dividen como a las que no se dividen, aunque no es necesario que las células diana no necesitan ser células que se dividan o que se estimulen para dividirse. Generalmente, el genoma y las glucoproteínas de la envoltura se basarán en diferentes virus, de tal manera que la partícula del vector vírico resultante está pseudotipificada. De manera deseable, se incorporan características de seguridad al vector génico. Las características de seguridad incluyen LTR que se autoinactivan y un genoma no integrante. Los vectores a modo de ejemplo contienen una señal de empaquetado (ψ), un elemento sensible a Rev (RRE), un donador de corte y empalme, un aceptor de corte y empalme, un tramo central de polipurina (cPPT), y un elemento WPRE. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, el genoma del vector vírico comprende secuencias de un genoma de lentivirus, tal como el genoma de VIH-1 o el genoma de VIS. La construcción del genoma vírico puede comprender secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus, y en particular, pueden comprender secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o autoinactivante de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, VIS, VIF o VIB. Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR de VIH.

El genoma del vector puede comprender una LTR 3' inactivada o autoinactivante (véase, por ejemplo, Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150, 1998). Generalmente, un vector autoinactivante tiene una delección de las secuencias potenciadora y promotora 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 (siglas del inglés *long terminal repeat*) 3' contiene una delección de su secuencia potenciadora, la caja TATA, sitios Sp1 y NF-Kappa B. Como resultado de la autoinactivación 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 reduciendo el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR sobre promotores celulares cercanos. La LTR 3' autoinactivante puede construirse mediante cualquier método conocido en la técnica.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentiviral se puede reemplazar por una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título del virus recubierto por la línea celular empaquetadora. Se puede incluir también una secuencia potenciadora. Se puede utilizar cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la línea celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se usa una secuencia potenciadora/promotora de CMV (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.385.839 y 5.168.062).

En determinadas realizaciones, el riesgo de mutagénesis por inserción se minimiza construyendo el genoma del vector lentivírico para que su integración sea defectuosa. Se puede aplicar una gran variedad de estrategias para producir un genoma de vector no integrante. Estas estrategias implican modificar con ingeniería genética una o más mutaciones en el componente enzimático integrasa del gen pol, de tal manera que codifique una proteína con una

integrasa inactiva. El propio genoma del vector se puede modificar para impedir la integración, por ejemplo, mediante la mutación o delección de uno o ambos sitios de acoplamiento, o haciendo que el tramo de polipurina (PPT, *polypurine tract*) 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 una o más funciones de la integrasa. Las estrategias no son excluyentes entre sí, esto es, se pueden utilizar 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 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 escisión de ADN vírico, bicatenario y de extremo romo y en la unión de los extremos 5'-fosfato en las dos cadenas de un sitio diana cromosómico. La integrasa tiene tres dominios funcionales: el dominio N-terminal, que contiene un motivo de fijación de unión a zinc (HHCC); el núcleo del dominio central, que contiene el núcleo catalítico y un motivo DD35E conservado (D64, D116, E152 en el 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 el University College de Londres, abril de 2009, págs. 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 deleccionar o mutar para obtener la proteína inactiva, preferiblemente sin afectar significativamente a la actividad de la transcriptasa inversa o a la diana nuclear, impidiendo así sólo la incorporación del provirus en el genoma de la célula diana. Mutaciones convenientes pueden reducir la catálisis de la integrasa, la transferencia de cadena, la unión a sitios att, la unión a ADN cromosómico del hospedador, y otras funciones. Por ejemplo, la sustitución de un solo ácido aspártico por asparagina en el resto 35 del VIH o de la integrasa del VIS, suprime completamente la integración de ADN vírico. Generalmente, las delecciones de la integrasa estarán limitadas en el dominio C-terminal. La delección de la secuencia que codifica los restos 235-288 dará 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 integración, expresión transgénica, y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son bien conocidos. Pueden generarse mutaciones mediante cualquiera de varias técnicas, incluida la mutagénesis dirigida 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.

De manera alternativa o en combinación con el uso de una mutación o mutaciones de la integrasa, también pueden mutarse sitios de unión (att) en U3 y U5. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido 3' terminal se escinde en ambos extremos del vector génico. Un dinucleótido CA se localiza en el extremo 3' con hueco; el CA se requiere para procesar la mutación de los bloques de nucleótidos en la integración en el cromosoma del hospedador. La A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para la integración, 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 de cada extremo, se cambia por TG. En otros ejemplos, el CA de cada extremo se cambia por TG en un extremo y por GT en el otro extremo. En otro ejemplo, el CA de cada extremo se delecciona; y en otros ejemplos, la A del CA se delecciona en cada extremo.

La integración se puede inhibir también mediante la mutación o delección del tramo de polipurina (PPT) (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/076524), localizado proximalmente en la LTR 3'. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que puede servir como un sitio de unión cebador para la síntesis de ADN de cadena positiva. En este caso, las mutaciones o delecciones 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 básicamente solo se producen círculos de ADN 1-LTR. La integración requiere un genoma de vector de ADN bicatenario lineal, y la incorporación se elimina esencialmente sin él. Como se indica en la presente memoria, un PPT puede pasar a ser no funcional mediante mutación o delección. Normalmente, se delecciona todo el PPT de aproximadamente 15 nt, aunque en algunas realizaciones, se pueden realizar delecciones 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 realizadas en el extremo 3' del PPT generalmente tienen un efecto más drástico (véase, por ejemplo, Powell et al., *J. Virol.* 70:5288, 1996).

La región U3 puede comprender una secuencia PPT (tramo de polipurina) inmediatamente ascendente. En determinadas realizaciones específicas, en el vector lentivírico se puede incluir una cualquiera de al menos tres regiones distintas de U3 (en el extremo 3') (véanse las SEQ ID NS:13-15). Las construcciones contienen delecciones en las regiones U3. La construcción SIN tiene una delección de aproximadamente 130 nucleótidos (véase, por

ejemplo, Miyoshi, et al. *J. Virol.* 72: 8150, 1998; Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 83: 3194, 1986), que elimina la caja TATA, suprimiendo así la actividad promotora de la LTR. Las deleciones en las construcciones 703 y 704 aumentan la expresión de vectores de lentivirus (véase, por ejemplo, Bayer et al., *Mol. Therapy* 16:1968, 2008). Además, la construcción 704 contiene una deleción del PPT 3', que reduce la integración del vector (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/076524). Véase también la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 12/842.609 y la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2011/011584 (solicitud de patente internacional N.º PCT/US10/042870).

Estas diferentes estrategias para producir un genoma de vector no integrante se pueden utilizar de manera individual o en combinación. Utilizar más de una estrategia se puede utilizar para construir un vector de seguridad a través de mecanismos redundantes. Por tanto, las mutaciones o deleciones del PPT se pueden combinar con mutaciones o deleciones del sitio att o con mutaciones de la Integrasa o mutaciones o deleciones del PPT se pueden combinar tanto con mutaciones o deleciones del sitio att como con mutaciones de la integrasa. De manera similar, las mutaciones o deleciones del sitio att y las mutaciones de la Integrasa se pueden combinar entre sí o con mutaciones o deleciones del PPT.

Como se describe en la presente memoria, las construcciones de vectores lentivíricos pueden contener también un promotor para la expresión en células de mamífero. Los promotores, que se comentan con mayor detalle en la presente memoria, incluyen, por ejemplo, el promotor C de ubiquitina humana (UbiC), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).

E. Partículas similivíricas

En varias realizaciones, se proporcionan partículas similivíricas (VLP, siglas del inglés *virus-like particles*) que comprenden al menos un inmunógeno de VHS-2 que induce una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno y contra su antígeno designado respectivo.

Se puede preparar una partícula similivírica de VHS-1 o VHS-2 al permitir a la VP5, VP19, VP23, VP22a, y a la proteasa madurativa (producto del gen UL26) autoensamblarse *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 de 1994, 2442-2457. Las partículas similivíricas 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 de VHS-2 se pueden incluir en, o asociar a, una partícula similivírica. Como ejemplo, un inmunógeno puede ser una proteína de VHS-2, tal como UL19 (por ejemplo, un Fragmento de Dominio Superior de 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.

40 Secuencias de expresión reguladora

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 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 utilizar para regular la expresión de 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 las construcciones del vector lentivírico, un potenciador/promotor "interno" es uno que se localiza entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' en el vector vírico 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 que aumente 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 de tal manera que la secuencia de interés se expresará después de que el potenciador y/o promotor 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

constitutivamente activo. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que se pueden utilizar incluyen el promotor de ubiquitina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5510474; WO 98/32869); CMV (véase, por ejemplo, Thomsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81:659, 1984; patente de Estados Unidos N.º 5168062); beta-actina (Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 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).

De manera alternativa, el promotor puede ser un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de célula diana. Las células dendríticas diana pueden mejorar la respuesta inmunitaria, particularmente la respuesta citotóxica celular que es útil para la inmunidad del VHS-2. Por ejemplo, el promotor puede ser de cualquier producto expresado por las células dendríticas, que incluyen CD11c, CD103, TLRs, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor de 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 varios cambios fisiológicos o medio ambientales, que incluyen el choque térmico, iones metálicos, tal como el promotor de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides, tal como progesterona o promotor del receptor de glucocorticoides, radiación, tal como el promotor de VEGF. Se puede utilizar 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 basándose en el patrón de expresión deseado de la secuencia de polinucleótidos en el organismo o célula diana de interés.

Un vector de expresión recombinante, que incluye un genoma de un vector vírico, puede comprender al menos un promotor de respuesta a ARN Polimerasa II o III. Este promotor se puede unir operativamente a la secuencia de polinucleótidos 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, págs. 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 génico viral, puede ser inducible. Se puede utilizar 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 los promotores de 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 genoma de vector vírico, para aumentar la expresión de la secuencia de polinucleótidos de interés. Por ejemplo, se puede utilizar el potenciador de 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 utilizar en combinación con un promotor heterólogo. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar el potenciador adecuado basado en el patrón de expresión deseado.

Cuando el suministro diana de un vector de expresión recombinante, incluyendo un genoma de vector vírico, se dirige hacia una célula diana particular, el genoma del vector normalmente contendrá un promotor que reconoce la célula diana y que se une operativamente a la secuencia de interés, componentes víricos (cuando el vector es un vector vírico), y otras secuencias comentadas 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 esteroides (por ejemplo, promotor basado en el receptor de glucocorticoides de rata (GR), promotor basado en receptores de estrógeno humano (ER), promotor basado en el receptor de ecdisona de polilla, y los promotores basados en la superfamilia de receptores esteroideos/retinoideos/tiroideos), promotores regulados por metales (por ejemplo, promotores basados en el gen de metalotioneína), y promotores relacionados con la patogénesis (por ejemplo, promotores basados en proteínas relacionadas con patógenos (PR) de *Arabidopsis* y el maíz). 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). En otros lugares, por ejemplo, en patentes y solicitudes de patentes publicadas que se pueden identificar buscando en las bases de datos de la Oficina de patentes y marcas de Estados Unidos, se describen otros

promotores a modo de ejemplo.

5 Un experto en la técnica será capaz de seleccionar un promotor adecuado en función de 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 utilizar 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.

10 El promotor se puede obtener, por ejemplo, a partir de los genomas de virus, tal como virus del polio, virus de la viruela, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del 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 heterólogo de mamífero, 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, siempre que dichos promotores sean compatibles con la célula 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.

20 La transcripción puede aumentarse a través de la inserción de una secuencia potenciadora en el vector o vectores. Los potenciadores son normalmente elementos de ADN que actúan en cis, normalmente con una longitud de aproximadamente 10 a 300 pares de bases, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. En la actualidad se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfafetoproteína e insulina) y de virus de células eucariotas. Los 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 polio 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.

30 Los vectores de expresión también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias se encuentran a menudo en las regiones no traducidas del extremo 5' y, ocasionalmente, del extremo 3', de los ADN o ADNc de eucariotas o de virus y son muy conocidas en la técnica.

35 Una construcción de expresión recombinante, que incluye un genoma de vector vírico, puede contener también elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que se pueden incluir en la construcción no se limitan de ningún modo y se pueden elegir para obtener un resultado particular. Por ejemplo, se puede incluir una señal que facilite la entrada al núcleo del vector de expresión recombinante o del genoma vírico en la célula diana. Un ejemplo de dicha señal es la señal flap del VIH-1. Se pueden incluir secuencias reguladoras adicionales que faciliten la caracterización del sitio de incorporación del provirus en la célula diana. Por ejemplo, en la construcción se puede incluir una secuencia de ARNt supresora ámbar. En la construcción del genoma vírico se puede incluir también una secuencia aislante, por ejemplo, de β -globina de pollo. Este elemento reduce la posibilidad de silenciar un provirus integrado en la célula diana debido a efectos de metilación y heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger al potenciador interno, promotor y a las secuencias de polinucleótidos exógenas de efectos posicionales positivos o negativos del ADN circundante en el sitio de integración en el cromosoma. Además, la construcción recombinante, incluyendo el genoma del vector, puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para mejorar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, en la construcción puede colocarse un elemento de respuesta al virus de la hepatitis de marmota (WRE, siglas del inglés *Woodchuck hepatitis virus Responsive Element*) (véase, por ejemplo, Zufferey et al. 1999. J. Virol. 74:3668-81; Deglon et al., 2000. Human Gene Ther. 11:179-90).

50 Cuando el vector de expresión recombinante es un genoma de vector vírico, el genoma del vector vírico se construye normalmente en forma de plásmido que se puede transfectar en una línea celular empaquetadora o productora para la producción de la construcción del genoma del vector vírico. El plásmido comprende generalmente secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias. Tales plásmidos son muy 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 productos típicos de resistencia farmacológica bacteriana son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina.

60 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 por 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 a las DC de las células implicadas activamente en la captura de antígenos en células especializadas para linfocitos T de primovacunación. Por ejemplo, la participación de CD40 mediante CD40L en linfocitos T CD4 auxiliares es una señal crítica para la maduración de DC, dando como resultado una fuerte activación de linfocitos 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 linfocitos 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 linfocitos T específicos de antígeno que expresan altos niveles de PD-1. Como se ha demostrado que la fuerza de la inmunización terapéutica se mejora significativamente mediante la combinación con el punto de control inmunológico, como ejemplo no limitante, los expertos habituales en la técnica pueden apreciar que un enfoque alternativo para inhibir la expresión del punto de control inmunológico es inhibir la expresión de los ligandos de muerte programada (PD, del inglés *Programmed Death*) 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 DC 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 las DC o la expresión de elementos particulares tales como los puntos de control inmunológicos, por ejemplo, los ligandos PD-1, se puede caracterizar mediante análisis por citometría de flujo de regulación al alza de marcadores de superficie, tales como MHC II, y caracterizando las quimiocinas y citocinas 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, en la construcción de expresión recombinante se incorpora una proteína marcadora fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*), 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. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas adecuados para su uso en células eucariotas, por ejemplo, neomicina, metotrexato, blasticidina, entre otros conocidos en la técnica, o que complementan deficiencias auxotróficas, o que suministran nutrientes críticos retenidos en los medios. El marcador seleccionable puede estar, opcionalmente, presente en un plásmido distinto e introducirse mediante cotransfección.

Con respecto a las partículas del vector descritas en la presente memoria, se pueden utilizar una o más unidades de expresión multicistónicas 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 de DC necesarios para la producción de la partícula del vector deseado en células de empaquetado. El empleo de vectores multicistónicos reduce el número total de moléculas de ácido nucleico requerido y, por tanto, puede prevenir posibles dificultades asociadas a la coordinación de la expresión a partir de vectores génicos múltiples. En un vector multicistónico 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 multicistónico 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 donde la construcción recombinante comprende un polinucleótido que codifica un inmunógeno, la construcción codifica opcionalmente un factor de maduración de DC. En determinadas realizaciones, un vector multicistónico 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 multicistónicos dirigen la expresión y codifican al menos dos o más inmunógenos.

Cada uno de los componentes del vector de expresión multicistónico, por ejemplo, mediante un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*) o un elemento 2A vírico, se puede separar para permitir separar la expresión de las diferentes proteínas del mismo promotor. Los elementos IRES y los elementos 2A son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.937.190; de Felipe et al. 2004. Traffic 5:616-626). En una realización, se utilizan oligonucleótidos, tales como secuencias del sitio de escisión de furina (RAKR), (véase, por ejemplo, Fang et al. 2005 Nat. Biotech. 23:584-590), unidos a secuencias similares a 2A del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV, *foot-and-mouth diseases virus*); virus A de la rinitis equina (ERAV, *equine rhinitis A virus*); y el virus de *Thosea asigna* (TaV) (véase, por ejemplo, Szymczak et al. 2004 Nat. Biotechnol. 22:589-594) para separar elementos genéticos en un vector multicistónico. La eficacia de un vector multicistónico 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 genoma de vector vírico comprende: una secuencia potenciadora/promotora de citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 de la LTR 5' del VIH; una secuencia empaquetadora (Ψ); la señal flap

del 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 de ARNt ámbar; un elemento U3 con una delección de su secuencia potenciadora; el aislante de β -globina de pollo; y las secuencias R y U5 de la LTR 3' del VIH. En algunos ejemplos, el vector génico comprende una LTR 5' lentivírica intacta y una LTR 3' autoinactivante (véase, por ejemplo, Iwakuma et al. *Virology* 15:120, 1999).

La construcción del vector génico se puede realizar utilizando cualquiera de las técnicas de ingeniería genética conocidas en la materia, que incluyen, sin limitación, las técnicas estándar de digestión con nucleasas, ligamiento, transformación, purificación plasmídica, y secuenciación de ADN, por ejemplo, como se describe 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 utilizar 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 de manera eficaz en una célula hospedadora, de tal manera 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, págs. 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.

Utilizando 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 indicadora y que mide la expresión utilizando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de un conjugado de proteína fluorescente verde. En la técnica se conocen bien otros genes indicadores adecuados.

Realizaciones a modo de ejemplo

Además de cualquiera de las realizaciones anteriores descritas en la descripción detallada, se contemplan realizaciones que incluyen cualquiera de las siguientes o cualquier combinación de las mismas:

1. Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende,

(i) una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;

(ii) una proteína estructural del HSV-2 que no sea una glucoproteína de envoltura del HSV-2, o un fragmento inmunológico de la misma;

(iii) opcionalmente, un agente que active la inmunidad innata; y

(iv) un transportador farmacéuticamente aceptable.

2. La composición de la realización 1, en donde la glucoproteína de envoltura del HSV-2 es gD2.

3. La composición de la realización 1, que comprende un fragmento inmunológico de la glucoproteína de envoltura gD2.

4. La composición de cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde la proteína estructural del HSV-2 se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICPO, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26.

5. La composición de la realización 1, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL19.

6. La composición de la realización 2, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL19.

7. La composición de la realización 1, que comprende un fragmento inmunológico de UL19.

8. La composición de la realización 2, que comprende un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO 12.

9. La composición de la realización 1, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL25.

10. La composición de la realización 2, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL25.

11. La composición de la realización 1, que comprende un fragmento inmunológico de UL25.

12. La composición de la realización 2, que comprende un fragmento inmunológico de UL25.
- 5 13. La composición de la realización 1, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL47.
14. La composición de la realización 2, en donde la proteína estructural del HSV-2 es UL47.
15. La composición de la realización 1, que comprende un fragmento inmunológico de UL47.
- 10 16. La composición de la realización 2, que comprende un fragmento inmunológico de UL47.
17. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-16, que adicionalmente comprende una segunda proteína estructural del HSV-2, o un fragmento inmunológico de la misma.
- 15 18. La composición de la realización 17, en donde la segunda proteína estructural del HSV-2 se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICPO, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26, en donde la segunda proteína estructural no es idéntica a la primera proteína estructural.
- 20 19. La composición de la realización 18, en donde la segunda proteína estructural es una proteína de longitud completa.
20. La composición de la realización 18, en donde la segunda proteína estructural es un fragmento inmunológico de la segunda proteína estructural.
- 25 21. La composición de cualquiera de las realizaciones 5-8, que adicionalmente comprende UL25.
22. La composición de cualquiera de las realizaciones 5-8, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL25.
- 30 23. La composición de cualquiera de las realizaciones 5-8, que adicionalmente comprende UL47.
24. La composición de cualquiera de las realizaciones 5-8, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47.
- 35 25. La composición de cualquiera de las realizaciones 9-12, que adicionalmente comprende UL19.
26. La composición de cualquiera de las realizaciones 9-12, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO. 12.
- 40 27. La composición de cualquiera de las realizaciones 9-12, que adicionalmente comprende UL47.
28. La composición de cualquiera de las realizaciones 9-12, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47.
- 45 29. La composición de cualquiera de las realizaciones 13-16, que adicionalmente comprende UL19.
30. La composición de cualquiera de las realizaciones 13-16, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO. 12.
- 50 31. La composición de cualquiera de las realizaciones 13-16, que adicionalmente comprende UL25.
32. La composición de cualquiera de las realizaciones 13-16, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL25.
- 55 33. La composición de cualquiera de las realizaciones 1-32, en donde el agente es un adyuvante.
34. La composición de la realización 33, en donde el adyuvante es el GLA.
- 60 35. La composición de la realización 1, que comprende gD2; UL25; UL19; adyuvante GLA; y un transportador farmacéuticamente aceptable.
36. La composición de la realización 1, que comprende gD2, UL25 y un fragmento inmunológico de UL19, por ejemplo, SEQ ID NO. 12.
- 65 37. La composición de la realización 1, que comprende gD2, UL19, y un fragmento inmunológico de UL25.

38. La composición de cualquiera de las realizaciones 35-37, que adicionalmente comprende UL47.
39. La composición de cualquiera de las realizaciones 35-37, que adicionalmente comprende un fragmento inmunológico de UL47.
- 5 40. La composición de la realización 1, que comprende ICPO o un fragmento inmunológico de la misma, y una o más de UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, UL46 o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 10 41. La composición de la realización 2, que comprende ICPO o un fragmento inmunológico de la misma, y una o más de UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, UL46 o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 15 42. La composición de las realizaciones 40 o 41, que comprende OIPC o un fragmento inmunológico de la misma, y dos proteínas estructurales adicionales o un fragmento inmunológico de las mismas.
- 20 43. La composición de la realización 1, que comprende UL46 o un fragmento inmunológico de la misma y una o más de UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, ICPO o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 25 44. La composición de la realización 2, que comprende UL46 o un fragmento inmunológico de la misma y una o más de UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, ICPO o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 30 45. La composición de las realizaciones 43 o 44, que comprende UL46 o un fragmento inmunológico de la misma, y dos proteínas estructurales adicionales o un fragmento inmunológico de las mismas.
- 35 46. Un método para el tratamiento de una infección por HSV-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de realizaciones 1-45.
- 40 47. Un método para generar una respuesta inmunitaria contra el VHS-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45.
- 45 48. El método de la realización 47, en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y seropositivo para el VHS-1.
49. El método de la realización 47, en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y seronegativo para el VHS-1.
- 50 50. Una composición farmacéutica que comprende, una parte antigénica de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde la parte antigénica comprende una secuencia líder de una glucoproteína de la envoltura del VHS-2.
- 55 51. La composición de la realización 50, en donde la parte antigénica se une a anticuerpos neutralizantes.
52. La composición de la realización 50, en donde la glucoproteína de la envoltura del VHS-2 es gD2 o gB2.
53. La composición de las realizaciones 50-52, en donde la parte antigénica comprende dos o más epítopos lineales de la glucoproteína de la envoltura.
54. La composición de las realizaciones 50-52, en donde la parte antigénica comprende dos o más epítopos discontinuos de la glucoproteína de la envoltura.
- 60 55. La composición de cualquiera de las realizaciones 50-54, que adicionalmente comprende un agente que activa la inmunidad innata.
56. La composición de la realización 55, en donde el agente es un adyuvante.
- 65 57. La composición de la realización 56, en donde el adyuvante es el GLA.

58. Un método para el tratamiento de una infección por VHS-2 o VHS-1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 50-57.
- 5 59. Un método para generar una respuesta inmunitaria contra al VHS-2 o al VHS-1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 50-57.
60. El método de las realizaciones 58-59, en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y seropositivo para el VHS-1.
- 10 61. El método de las realizaciones 58-59, en donde el sujeto es seropositivo para el VHS-2 y seronegativo para el VHS-1.
62. Un kit que comprende un vial que comprende la composición de la realización 50.
- 15 63. Un fragmento aislado de UL19 que carece al menos de los aminoácidos 1-336 y 1295-1374 de la SEQ ID NO: 4.
64. Un polipéptido aislado que comprende un fragmento de UL19 que consiste en la SEQ ID NO: 12 o en un fragmento de la misma.
- 20 65. El polipéptido de la realización 64, que adicionalmente comprende un péptido no-UL19 fusionado al fragmento de UL19.
66. Un polipéptido aislado que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica sobre 50 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 12, opcionalmente fusionado con un péptido que no es UL19.
- 25 67. Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende,
- 30 (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante o fragmento inmunológico del mismo, o el fragmento o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 63-67;
- (ii) un adyuvante; y
- 35 (iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.
68. La composición de la realización 67, en donde el adyuvante es un agonista de TLR4.
69. La composición de la realización 68, en donde el adyuvante es el GLA (Figura 1).
- 40 70. La composición de la realización 67, que adicionalmente comprende uno cualquiera o más de a) una proteína de envoltura del VHS-2, b) una proteína estructural del VHS-2 distinta de una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o c) un fragmento inmunológico de a) o b).
- 45 71. La composición de la realización 67, que adicionalmente comprende una proteína estructural del HSV-2.
72. La composición de la realización 71, en donde la proteína estructural se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICPO, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26.
- 50 73. La composición de la realización 67, comprende además gD2, o un fragmento inmunológico de la misma, UL25, o un fragmento inmunológico de la misma, y opcionalmente UL47, o un fragmento inmunológico de la misma.
74. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,
- 55 (i) una glucoproteína de la envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;
- (ii) GLA (Figura 1); y
- (iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 60 75. La composición de la realización 74, en donde la glucoproteína de la envoltura del VHS-2 o el fragmento inmunológico de la misma es gD2 o un fragmento inmunológico de la misma.
76. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,
- 65 (i) una proteína estructural del VHS-2 distinta de una glucoproteína de la envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;

(ii) GLA; y

(iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

5 77. La composición de la realización 76, en donde la proteína estructural del HSV-2 o el fragmento inmunológico de la misma, se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26 o de un fragmento inmunológico de cualquiera de estas.

10 78. La composición de una cualquiera de las realizaciones 33, 34, 56, 57, 66, 67 y 71-77, que adicionalmente comprende un segundo adyuvante.

15 79. La composición de la realización 78, en donde el segundo adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un agonista de TLR, por ejemplo, un agonista de TLR7 o un agonista de TLR9; alumbre; una emulsión; una saponina; una citocina; un dinucleótido CpG no metilado; y una saponina modificada.

80. La composición de la realización 78, en donde el segundo adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund, MF-59™, Montanide™, AS02™, AS04™, QS-21™ e ISCOM™.

20 81. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,

(i) ICP4, o un fragmento inmunológico de la misma;

(ii) gD2, o un fragmento inmunológico de la misma;

25 (iii) GLA (Figura 1); y

(iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

30 82. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,

(i) un producto génico de grupo α del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o

35 (ii) un producto génico β 1 del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o

(iii) un producto génico β 2 del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o

(iv) un producto génico γ 1 del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o

40 (v) un producto génico γ 2 del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y/o

(vi) un adyuvante, preferiblemente GLA (Figura 1); y

(vii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

45 83. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-82, que adicionalmente comprende un tensioactivo.

50 84. Un método para el tratamiento de una infección por VHS-2 o una infección por VHS-1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 65-83.

85. Un método para generar una respuesta inmunitaria contra una infección por VHS-2 o VHS-1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 65-83.

55 86. El método de una cualquiera de las realizaciones 84-85, en donde el sujeto es seropositivo para el HSV-2 y seropositivo para el HSV-1.

87. El método de una cualquiera de las realizaciones 85-85, en donde el sujeto es seropositivo para el HSV-2 y seronegativo para el HSV-1.

60 88. El método de una cualquiera de las realizaciones 83-87, en que la vía de administración es intradérmica, mucosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal o vaginal.

65 89. Un método para reducir la transmisión del VHS-2 de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.

90. Un método para reducir la propagación del VHS-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.
- 5 91. Un método para reducir la frecuencia de lesiones en un sujeto con una infección por VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.
92. Un método para reducir el riesgo de contraer el VIH, en un sujeto con una infección por VHS-2, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.
- 10 93. Un método para inducir inmunidad esterilizante contra el VHS-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.
94. Un kit que comprende la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 65-83.
- 15 95. El kit de la realización 94, que adicionalmente comprende un virus VHS1 o VHS2 atenuado.
96. El kit de la realización 94, que adicionalmente comprende un virus VHS1 o VHS2 inactivado.
- 20 97. El kit de la realización 94, que adicionalmente comprende un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de VHS1 o VHS2.
98. El kit de realización 94, que adicionalmente comprende una partícula similitivírica que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de VHS1 o VHS2.
- 25 99. El kit de realización 94, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de VHS1 o VHS2.
100. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, en donde la glucoproteína de envoltura y/o la proteína estructural se fusiona con un péptido heterólogo.
- 30 101. El método de una cualquiera de las realizaciones 58-61 y 84-93, que adicionalmente comprende la administración de un polinucleótido que codifica un antígeno de VHS1 o VHS2.
- 35 102. El método de realización 101, en donde el polinucleótido forma parte del genoma de un vector vírico.
103. El método de una cualquiera de las realizaciones 58-61 y 84-93, que adicionalmente comprende la administración de un virus HSV1 o HSV2 inactivado o atenuado.
- 40 104. El método de una cualquiera de las realizaciones 58-61 y 84-93, que adicionalmente comprende la administración de una partícula similitivírica que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de VHS1 o VHS2.
105. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,
- 45 (i) un primer polinucleótido que codifica una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;
- (ii) un segundo polinucleótido que codifica una proteína estructural del HSV-2 distinta de una glucoproteína de envoltura del HSV- 2, o un fragmento inmunológico de la misma;
- 50 (iii) opcionalmente, un agente, tal como un adyuvante, que active la inmunidad innata; y
- (iv) un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 55 106. La composición de la realización 105, en donde la glucoproteína de envoltura del VHS-2 es gD2.
107. La composición de la realización 105, que comprende un fragmento inmunológico de la glucoproteína de envoltura gD2.
- 60 108. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde la proteína estructural del VHS-2 se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26.
109. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde la proteína estructural del VHS-2 o fragmento inmunológico de la misma es UL19 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 65 110. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde el segundo polinucleótido codifica UL19.

111. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde el segundo polinucleótido codifica un fragmento inmunológico de UL19, opcionalmente el fragmento o polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 63-66.
- 5 112. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde el segundo polinucleótido codifica la SEQ ID NO 12.
113. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde la proteína estructural del VHS-2 o fragmento inmunológico de la misma es UL25 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 10 114. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde el segundo polinucleótido codifica UL25.
115. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde el segundo polinucleótido codifica un fragmento inmunológico de UL25.
- 15 116. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-107, en donde la proteína estructural del VHS-2 o fragmento inmunológico de la misma es UL47 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 20 117. La composición de una cualquiera de las realizaciones 105-116 que adicionalmente comprende un tercer polinucleótido que codifica una segunda proteína estructural del HSV-2, o un fragmento inmunológico de la misma.
118. La composición de la realización 117, en donde la segunda proteína estructural del VHS-2 se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26, y en donde la segunda proteína estructural no idéntica a la primera proteína estructural.
- 25 119. La composición de la realización 118, en donde la segunda proteína estructural es una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma.
- 30 120. La composición de cualquiera de las realizaciones 100-112, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL25 o un fragmento inmunológico de la misma.
121. La composición de cualquiera de las realizaciones 106-109, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL47 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 35 122. La composición de cualquiera de las realizaciones 113-115, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL19.
123. La composición de cualquiera de las realizaciones 113-115, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica la SEQ ID NO. 12.
- 40 124. La composición de cualquiera de las realizaciones 113-115, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL47 o un fragmento inmunológico de la misma.
- 45 125. La composición de la realización 116, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL19.
126. La composición de la realización 116, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica la SEQ ID NO. 12.
- 50 127. La composición de la realización 116, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL25 o un fragmento de la misma.
128. La composición de cualquiera de las realizaciones 105-127, en donde el agente es un adyuvante, opcionalmente un agonista de TLR4.
- 55 129. La composición de la realización 128, en donde el adyuvante es el GLA.
130. La composición de la realización 105, en donde el primer polinucleótido codifica gD2; el segundo polinucleótido codifica UL25; y en donde la composición comprende además un tercer polinucleótido que codifica UL19; adyuvante GLA; y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 60 131. La composición de la realización 105 en donde el primer polinucleótido codifica gD2, el segundo polinucleótido codifica UL25, y en donde la composición comprende además un polinucleótido que codifica la SEQ ID NO. 12.
- 65 132. La composición de la realización 105, en donde el primer polinucleótido codifica gD2, el segundo polinucleótido codifica UL19, en donde la composición comprende además un polinucleótido que codifica un fragmento

inmunológico de UL25.

133. La composición de cualquiera de las realizaciones 130-132, que adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica UL47 o un fragmento inmunológico de la misma.

5 134. La composición de la realización 105 o 106, que comprende un polinucleótido que codifica ICP0 o un fragmento inmunológico de la misma, y uno o más de un polinucleótido que codifica UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, UL46 o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.

135. La composición de la realización 134, que comprende un polinucleótido que codifica ICP0 o un fragmento inmunológico de la misma, y dos proteínas estructurales adicionales o un fragmento inmunológico de las mismas.

15 136. La composición de la realización 105 o 106 que comprende un polinucleótido que codifica UL46 o un fragmento inmunológico de la misma y uno o más de un polinucleótido que codifica UL47 o un fragmento inmunológico de la misma, UL19 o un fragmento inmunológico de la misma, UL25 o un fragmento inmunológico de la misma, ICP0 o un fragmento inmunológico de la misma, UL39 o un fragmento inmunológico de la misma, UL7 o un fragmento inmunológico de la misma y UL26 o un fragmento inmunológico de la misma.

20 138. La composición de las realizaciones 136, que comprende un polinucleótido que codifica UL46 o un fragmento inmunológico de la misma, y polinucleótidos que codifican dos proteínas estructurales adicionales o un fragmento inmunológico de las mismas.

25 139. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,

(i) un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una variante inmunológica o fragmento de la misma;

30 (ii) opcionalmente, un agente, tal como un adyuvante, que active la inmunidad innata; y

(iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

35 140. La composición de la realización 139, en donde el agente es un adyuvante.

141. La composición de la realización 140, en donde el adyuvante es GLA.

40 142. La composición de la realización 139, que adicionalmente comprende un segundo polinucleótido que codifica una proteína estructural del HSV-2 distinta de una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma.

143. La composición de la realización 139, que adicionalmente comprende un tercer polinucleótido que codifica una proteína estructural del VHS-2 junto con UL19(ud).

45 144. La composición de la realización 143, en donde la proteína estructural se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26.

145. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,

50 (i) un primer polinucleótido que codifica una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;

(ii) GLA; y

55 (iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

146. La composición de la realización 145, en donde la glucoproteína de envoltura del VHS-2 es gD2.

60 147. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,

(i) un primer polinucleótido que codifica una proteína estructural del VHS-2 distinta de una glucoproteína de envoltura del VHS-2, o un fragmento inmunológico de la misma;

(ii) GLA; y

65 (iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.

148. La composición de la realización 147, en donde la proteína estructural del VHS-2 se selecciona del grupo que consiste en UL47, ICP0, UL19, UL25, UL46, UL39, UL7 y UL26.
- 5 149. La composición de una cualquiera de las realizaciones 105149, que adicionalmente comprende un segundo adyuvante.
150. La composición de la realización 149, en donde el segundo adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un agonista de TLR, alumbre, una emulsión, una saponina, una citocina, un dinucleótido CpG no metilado y una
10 saponina modificada.
151. La composición de la realización 149, en donde el segundo adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvante incompleto de Freund, MF-59™, Montanide™, AS02™, AS04™, QS-21™ e ISCOM™.
- 15 152. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,
- (i) un primer polinucleótido que codifica ICP4, o un fragmento inmunológico de la misma;
- (ii) un segundo polinucleótido que codifica gD2, o un fragmento inmunológico de la misma;
20 (iii) GLA; y
- (iii) un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 25 153. Una composición farmacéutica, inmunogénica, que comprende,
- (i) un primer polinucleótido que codifica un producto génico temprano inmediato del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo;
- (ii) un segundo polinucleótido que codifica un producto génico temprano del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo;
30 (iii) un tercer polinucleótido que codifica un producto génico tardío del VHS-2, o un fragmento inmunológico del mismo; y
- (iv) un transportador farmacéuticamente aceptable
35
154. La composición de una cualquiera de las realizaciones 105-153, que adicionalmente comprende un tensioactivo.
40
155. La composición de una cualquiera de las realizaciones 105-154, en donde los polinucleótidos están presentes en uno o más vectores de expresión recombinantes.
156. La composición de la realización 155, en donde el vector de expresión recombinante es un vector vírico o una
45 partícula similitivírica.
157. Un método de tratamiento de una infección por VHS-2 o VHS-1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 105-156, y coadministrar una segunda composición que comprende un adyuvante.
50
158. El método de la realización 157, en donde el adyuvante es un agonista de TLR4.
159. El método de realización 158, en donde el agonista de TLR4 es GLA.
- 55 160. Un método para generar en un sujeto una respuesta inmunitaria contra el VHS-2 o el VHS-1, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 105-156, y coadministrar una segunda composición que comprende un adyuvante.
161. El método de realización 160, en donde el adyuvante es un agonista de TLR4.
60
162. El método de realización 161, en donde el agonista de TLR4 es GLA.
163. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57 y 66-83, que adicionalmente comprende una
65 partícula similitivírica, en donde la partícula similitivírica comprende la glucoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunológico de la misma y la proteína estructural del VHS-2 distinta de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunológico de la misma de una cualquiera de las realizaciones 1-45; la parte antigénica

de una glucoproteína de envoltura del VHS-2 de una cualquiera de las realizaciones 50-57; el fragmento de UL19 de una cualquiera de las realizaciones 63-65; el polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 66-73; la glucoproteína de envoltura del VHS-2 o un fragmento inmunológico de la misma de una cualquiera de las realizaciones 74-75; la proteína estructural de una cualquiera de las realizaciones 76-77; o la ICP4 o un fragmento inmunológico de la misma y la gD2 o un fragmento inmunológico de la misma de la realización 81.

164. Un método para el tratamiento de una infección por VHS-2 o por VHS-1 en un sujeto, que comprende una etapa de primovacunación, que comprende administrar al sujeto un virus vivo atenuado del VHS y una etapa de refuerzo, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57, 66-83 y 105-156.

165. Un método para generar en un sujeto una respuesta inmunitaria contra una infección por VHS-2 o por VHS-1, que comprende una etapa de primovacunación, que comprende administrar al sujeto un virus vivo atenuado del VHS, y una etapa de refuerzo, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57, 66-83 y 105-156.

166. Un método para el tratamiento de una infección por VHS-2 o por VHS-1 en un sujeto, que comprende una etapa de primovacunación, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57, 66-83 y 105-156 y una etapa de refuerzo, que comprende administrar al sujeto un virus vivo atenuado del VHS.

167. Un método para generar en un sujeto una respuesta inmunitaria contra una infección por VHS-2 o por VHS-1, que comprende una etapa de primovacunación, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las realizaciones 1-45, 50-57, 66-83 y 105-156 y una etapa de refuerzo, que comprende administrar al sujeto un virus vivo atenuado del VHS.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

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

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

Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c con un régimen de inmunización de primovacunación/refuerzo (primovacunación d0/refuerzo d21) con 0,8, 4 o 20 µg de proteína gD recombinante en combinación con 0,8, 4 o 20 µg de GLA-SE (el porcentaje de SE es del 2 % en este y en todos los estudios posteriores), SE solo o con PBS, suministrado por vía intramuscular en 100 µl (50 µl en cada pata). Los ratones inmunizados con GLA-SE, SE solo o PBS en ausencia de proteína recombinante, sirvieron como controles negativos. Se midieron las respuestas de los linfocitos T CD4 esplénicos específicas del antígeno el día 4 después del refuerzo mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) para IFN-γ, IFN-α e IL-2 después de la reestimulación *ex vivo* de cultivos de esplenocitos durante 5 horas con el péptido gD₂₇₂₋₂₈₅, que anteriormente se había identificado como un epítipo de linfocitos T CD4 en gD2 que está presente en ratones con el haplotipo H-2d. Como se representa en la Figura 2, se observó una respuesta de linfocitos T CD4 a la inmunización con cada una de las dosis de proteína recombinante gD2 sólo cuando se incluyó como adyuvante GLA-SE o SE. A cada dosis de antígeno gD2 recombinante y a cada dosis de GLA-SE, la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD4 específicos para gD2 aumentó sobre la respuesta observada para la misma cantidad de antígeno gD2 recombinante formulado con SE solo. Además, la calidad de la respuesta de la población de linfocitos T CD4 específicos de antígeno se midió mediante la frecuencia de linfocitos T CD4 IFN-γ+, IFN-α +e IL-2+ (triple positivo) en la población de linfocitos T CD4 en cada dosis de proteína gD2 recombinante y en cada dosis de GLA sobre la observada cuando se formuló solo con SE. Los datos 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 consigue a través de la inmunización con la proteína recombinante sola o la proteína recombinante formulada solo con SE, según se mide tanto por la magnitud como por la calidad de la respuesta inmunitaria celular.

Ejemplo 2

GLA aumenta la respuesta de linfocitos T CD8 en ratones

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

Se usó ovoalbúmina como proteína modelo. Ratones hembra C57B1/6 recibieron una inyección s.c. de ovoalbúmina codificante de lentivirus ("LV-OVA" en las Figuras 3 y 4) y el día 21 recibieron una inyección i.m. de refuerzo de ovoalbúmina recombinante potenciada con varias dosis de adyuvante GLA-SE ("OVA+GLA/SE" en las Figuras 3 y 4). Cuatro días después, se midieron *in vitro* las respuestas de los linfocitos T esplénicos mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) para los siguientes estimulantes: péptidos 55-62 y 257-264 con OVA y MHC Clase I y péptidos 323-339 con OVA y MHC Clase II, o anticuerpos contra CD3 y contra CD28. Los linfocitos T CD8 se identificaron como linfocitos que segregaban cualquiera de las siguientes citocinas IFN- γ , IL-2 y TNF- α .

Como se muestra en la Figura 3, en los ratones que recibieron un refuerzo de antígeno, hubo un mayor porcentaje de linfocitos T CD8, teniendo los ratones que recibieron GLA-SE con el antígeno en el refuerzo, los porcentajes más altos. La Figura 4 proporciona un detalle de experimentación de las proporciones de cuatro subgrupos de linfocitos T CD8. Por lo tanto, una vacuna i.m. de 'refuerzo' con la proteína OVA recombinante + GLA-SE, reforzó a los linfocitos T CD8 preexistentes que se habían generado mediante vacunación con LV anterior. Las dosis medias (4 μ g) y bajas (0,8 μ g) de GLA proporcionaron el mayor aumento de linfocitos T CD8 en estos entornos experimentales. Por lo tanto, estos datos muestran que la proteína potenciada con el adyuvante GLA se puede utilizar para reforzar una respuesta de linfocitos T CD8 de memoria preexistentes, específica para la proteína. La activación de linfocitos CD8 de memoria, se considera que es una propiedad deseable en una vacuna terapéutica frente al VHS-2 para el tratamiento de individuos infectados, destacando que la proteína potenciada con adyuvante GLA, puede otorgar propiedades superiores a una vacuna para el VHS-2.

Ejemplo 3

Inmunogenicidad basada en linfocitos T CD4 frente a proteínas individuales, gD2, UL19 y UL25 del VHS-2 después de vacunaciones múltiples en ratones

El objetivo de este conjunto de estudios era identificar una única cepa de ratón en donde se pudiera evaluar la inmunogenicidad basada en linfocitos 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 linfocitos 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 μ g de cada uno de los antígenos de la proteína recombinante como un inmunógeno monovalente formulado con 5 μ g de GLA-SE suministrado por vía intramuscular en 100 μ l (50 μ l en cada pata) en el contexto de un régimen de inmunización de primovacuna/refuerzo (d0 primovacuna/d21 refuerzo). Se analizaron las respuestas de los linfocitos T CD4 específicos de antígeno 4 días después del refuerzo utilizando bibliotecas de pentadecapéptidos (superposición de 11 aa entre péptidos) cuyas secuencias derivaban de las secuencias de aminoácidos del inmunógeno monovalente correspondiente. En las exploraciones primarias, se analizaron linfocitos CD4 esplénicos con respecto a la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 en respuesta a la estimulación *ex vivo* de cultivos de esplenocitos con grupos de pentadecapéptidos de la biblioteca de péptidos que correspondía al antígeno que codifica el VHS-2 individual. Las respuestas de los linfocitos T CD4 observadas en los grupos de péptidos, se consideraron como aciertos positivos, y posteriormente se realizaron exploraciones secundarias (y en algunos casos terciarias) con una inmunización y estrategias de análisis idénticas utilizando péptidos individuales dentro de los grupos positivos de la exploración anterior como estimulantes *ex vivo*, o bien péptidos dentro de los grupos positivos de la exploración anterior reagrupados en diferentes combinaciones. Como se muestra en las Figuras 5A-B, estos estudios identificaron pentadecapéptidos individuales frente a los que se pudo observar una respuesta de linfocitos T CD4 específica de 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 linfocitos B y linfocitos T CD4 frente a cada una de las proteínas subunitarias individuales del VHS-2 después de vacunaciones múltiples de una formulación trivalente en ratones

Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad basada en linfocitos B y en linfocitos T CD4 frente a cada una de proteínas subunitarias individuales recombinantes dentro de la vacuna, cuando se suministran juntas como una formulación trivalente con GLA-SE en ratones C57BL/6. La estrategia experimental consistió en utilizar dos grupos de cinco ratones C57BL/6. Un grupo se inmunizó con un régimen de inmunización de primovacuna/refuerzo (primovacuna d0/refuerzo d21) con las proteínas gD2, UL19 y UL25 de VHS-2 recombinantes suministradas en combinación y formuladas en 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 suministrado por vía intramuscular en 100 μ l (50 μ l en cada pata). En el segundo grupo se simuló la inmunización con vehículo (PBS). Los animales se sacrificaron el día 4 después del refuerzo para extraer los bazo y la sangre periférica (mediante punción cardíaca). Se midieron las repuestas de los linfocitos T CD4 esplénicos específicas de antígeno mediante ICS para IFN- γ , TNF- α e IL-2 después de la reestimulación *ex vivo* de cultivos de esplenocitos con pentadecapéptidos identificados anteriormente que contenían epítomos de linfocitos T CD4 para cada uno de los inmunógenos de la proteína recombinante dentro de la vacuna trivalente (véase el Ejemplo 3). Mediante un ensayo ELISA directo, se analizó el suero de cada uno de los ratones que recibieron la

vacuna y el de los que recibieron la simulación de la vacuna, para detectar la presencia de anticuerpos específicos de antígeno de la subclase IgG1 frente a cada uno de los inmunógenos de la proteína recombinante dentro de la vacuna trivalente. Como se muestra en las Figuras 6A-B, se observaron respuestas de anticuerpos y de linfocitos T CD4 específicos de antígeno contra 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 confirman la significativa inmunogenicidad de la vacuna trivalente y su capacidad para suscitar una amplia respuesta inmunitaria (tanto humoral como celular) frente a proteínas del VHS-2. Inesperadamente, la magnitud de las respuestas inmunitarias generadas fueron mayores para el antígeno UL19. UL19 nunca se había incluido como componente de ninguna de las vacunas basadas en subunidades recombinantes anteriores para el tratamiento o la prevención de infección por VHS-2 en seres humanos. Estos datos proporcionan pruebas de que las vacunas reivindicadas presentan propiedades superiores sobre las vacunas de la técnica anterior.

Ejemplo 5

- 15 Respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno después de inmunizaciones sencillas y múltiples de UL19 del VHS-2 con GLA-SE en ratones

Este ejemplo muestra la inmunogenicidad basada en linfocitos T CD4 generada mediante inmunizaciones sencillas y repetidas de UL19 del VHS-2 formuladas 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 (con un intervalo de 21 días entre ellas) 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 4 días o 10 días después de la inmunización final para el análisis de las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno. Las inmunizaciones que recibieron los grupos de análisis respectivos se escalonaron en el tiempo de tal manera que los cuatro grupos de ratones se sacrificaron el mismo día para el análisis de la respuesta de linfocitos T CD4 específicos de antígeno. Se midió la respuesta de los linfocitos T CD4 específicos de antígeno para el inmunógeno mediante la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2 en respuesta a la estimulación *ex vivo* de los esplenocitos con los pentadecapéptidos de UL19 individuales números 250 y 297 que anteriormente se habían identificado que contenían epítopos de linfocitos 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 linfocitos T CD4 específicos de UL19 sólo en los animales que recibieron dos inmunizaciones, mientras que se detectaron respuestas de linfocitos T CD4 específicos de UL19 10 días después de última inmunización tanto en el grupo del experimento que recibió primovacuna como en el que recibió primovacuna/refuerzo. 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 contiene una proteína recombinante de VHS-2 + GLA-SE es un protocolo superior para aumentar la respuesta y la magnitud de la respuesta resultante de linfocitos T CD4 específicos de antígeno.

Para evaluar la dependencia del aumento de la respuesta de linfocitos T CD4 después de la administración repetida de la vacuna sobre GLA-SE, se realizó un experimento similar cuyos grupos de ratones se inmunizaron con la proteína UL19 sola o con la proteína formulada solo con SE, o con GLA-SE. Los grupos de ratones se sacrificaron 5 días o 10 días después de la inmunización final para el análisis de las respuestas de linfocitos T CD4 específico de antígeno. La respuesta de linfocitos T CD4 específicos de antígeno contra el inmunógeno se midió mediante la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2 en respuesta a la estimulación *ex vivo* de esplenocitos con los pentadecapéptidos de UL19 individuales números 250 y 297 que se habían identificado anteriormente que contenían epítopos de linfocitos 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 aumento significativo en cuanto a la respuesta de linfocitos T CD4 en comparación con los que recibieron sólo una única inmunización, confirmando los resultados del experimento anterior. Cabe destacar, que este aumento dependía del adyuvante GLA-SE, ya que los ratones que recibieron dos inmunizaciones no mostraron respuestas significativas de los linfocitos T CD4 cuando el inmunógeno se administró solo o con SE en ausencia de GLA.

Ejemplo 6

- 55 Respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno después de la inmunización con la vacuna trivalente del VHS formulada con GLA-SE en ratones

Este Ejemplo muestra que pueden generarse respuestas de linfocitos T CD4 frente a cada una de las subunidades de una vacuna subunitaria trivalente que comprende los antígenos gD2, UL19 y UL25, formulada en GLA-SE cuando las proteínas recombinantes se formulan sobre una base equimolar 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 de 5 µg o de 15 µg sobre una base equimolar o de masa equivalente. Los ratones recibieron una segunda inmunización con una formulación homóloga el día 21 y mediante ICS se midieron las respuestas de los linfocitos T después de la reestimulación *ex vivo* con un péptido adecuado cinco días después de la última inmunización. Como se muestra en la Figura 9, se generaron respuestas de linfocitos T CD4 específicas de epítopo frente a cada uno de los componentes individuales de la vacuna subunitaria trivalente del VHS-2. Se observaron respuestas positivas a pesar

de que los componentes de la proteína recombinante se formulaban sobre una base equimolar o de masa equivalente, lo que indica que las respuestas no se ven afectadas o alteradas significativamente basándose en la composición proteica relativa de la vacuna.

5 Ejemplo 7

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

10 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de GLA-SE para aumentar las respuestas de linfocitos T CD4 después de la inmunización de ratones con una vacuna de proteína recombinante.

15 Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c a través de un régimen de inmunización de primovacuna/refuerzo (primovacuna d0/refuerzo d21) con 4 µg de proteína gD recombinante en combinación con 4 µg de GLA-SE, SE solo o vehículo PBS, suministrados por vía intramuscular en 100 µl (50 µl por pata). Mediante un ensayo Elisa, se midieron los anticuerpos específicos de gD2 del VHS-2 de los isotipos de IgG, IgG1 e IgG2a. Como se representa en la Figura 10, el adyuvante GLA-SE mejoró la respuesta de IgG total frente a gD2 del VHS-2, redujo la producción de IgG1 específica de antígeno y aumentó la producción de IgG2a específica de antígeno.

20 Ejemplo 8

Mejora de la inmunogenicidad basada en linfocitos T CD8 frente a la proteína UL19UD del VHS-2 cuando se formula con el adyuvante GLA-SE

25 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de GLA-SE para inducir respuestas funcionales de linfocitos T CD8 específicos de UL19 del VHS-2 después de la inmunización de ratones con una vacuna trivalente que contenía gD2, el dominio superior (UP, del inglés *upper domain*) de UL19 (UL19ud; SEQ ID NO:12) y UL25 del VHS-2 recombinante.

30 A grupos de cinco ratones C57BL/6 se les proporcionó una inmunización intramuscular única de vacuna trivalente que consistía en 5 µg cada una de gD2, UL19ud y UL25 recombinante, en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5 %. Los ratones inmunizados sólo con vehículo sirvieron como controles negativos. Las respuestas de los linfocitos T CD4 y CD8 esplénicos, específicos de antígeno, se midieron el día 6 después de la inmunización mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) para IFN-γ, TNF-α e IL-2 después de la reestimulación *ex vivo* durante 5 horas de cultivos de esplenocitos con los péptidos gD2, UL19 o UL25. Como se representa en la Figura 11, panel A, se observó una respuesta de linfocitos T CD4 contra 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 linfocitos T CD8 frente al antígeno UL19ud cuando se proporciona con GLA-SE. Para confirmar que estos linfocitos T CD8 eran funcionales, los ratones que no se inmunizaron o que se inmunizaron 4 semanas antes con la vacuna trivalente con GLA-SE, se expusieron por vía subcutánea al virus VHS-2 atenuado deficiente en timidina cinasa (TK-) y las respuestas de los linfocitos T CD8 se midieron mediante ICS. Como se representa en la Figura 11, panel C, la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD8 tras la exposición al virus, fue mayor en los ratones anteriormente inmunizados con la vacuna.

45 Ejemplo 9

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

50 En este ejemplo, se evaluó la eficacia de GLA-SE para mejorar la capacidad de una vacuna de proteína de VHS-2 recombinante bivalente para proteger frente a una exposición letal al VHS-2.

55 A grupos de diez ratones C57BL/6 se les proporcionó dos inmunizaciones intramusculares, con un intervalo de separación de 28 días, de una vacuna bivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2 y UL19ud recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5 %. Los ratones inmunizados solo con 5 µg de GLA-SE sirvieron como controles negativos. Veintidós (22) días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona de liberación prolongada y seis días después se expusieron a una dosis letal para el 50 % de la población (DL₅₀) 50x de VHS-2 de tipo silvestre por vía intravaginal. Los ratones se monitorizaron a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. Los días 1, 3 y 5 después de la infección, se recogieron frotis vaginales para la cuantificación, mediante PCR, del ADN del VHS-2. Aproximadamente dos meses después de la infección, se extrajeron 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 y aumentaron la supervivencia en comparación con los ratones inmunizados solo con gD2 y UL19ud o solo con GLA-SE. 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 los 5 días, mientras que los ratones de cualquier grupo de control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina hasta el día 5. Como se representa en la Figura 12, panel C, aunque hubo tres supervivientes en el grupo inmunizado 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 apenas mostraron o no mostraron ningún VHS-2 detectable en los ganglios.

Ejemplo 10

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

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de GLA-SE para mejorar la capacidad de una vacuna proteica de VHS-2 recombinante trivalente para expandir linfocitos T CD8 de memoria inducidos anteriormente mediante infección con VHS-2.

Grupos de cinco ratones C57BL/6 se infectaron por vía subcutánea con una dosis subletal de virus VHS-2 atenuados deficientes en timidina quinasa (TK-). Veintiocho (28) días después, los ratones infectados o no infectados se inmunizaron con una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2, UL19ud (SEQ ID NO:12) y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con vehículo de dextrosa al 5 %. Los grupos de control incluían a ratones infectados tratados solo con GLA-SE o solo con vehículo, así como a ratones sin tratamiento previo tratados sólo con vehículo. Seis días después de la inmunización, las respuestas de los linfocitos T CD4 y CD8 específicos de UL19, se midieron mediante ICS. Como se representa en la Figura 13, la frecuencia de los linfocitos T CD4 y CD8, específicos de UL19, fue mayor después de la inmunización de los ratones anteriormente infectados, lo que indica que hubo un recuerdo de linfocitos T de memoria inducidos por la infección. Cabe destacar, que la máxima expansión de estos linfocitos T de memoria, mediante la vacuna proteica recombinante, requirió la presencia del adyuvante GLA-SE.

Ejemplo 11

Capacidad de la vacuna proteica del VHS-2 recombinante para tratar el VHS-2 recurrente en cobayas

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de una vacuna proteica del VHS-2 recombinante trivalente para reducir la frecuencia de lesiones recurrentes causadas por el VHS-2.

Grupos de siete cobayas se infectaron por vía intravaginal con una dosis subletal de la cepa 333 del virus VHS-2. Los días 13 y 27 después de la infección, las cobayas se inmunizaron con una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2, UL19ud (véase, SEQ ID NO:12) y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE. Las cobayas infectadas tratadas solo con GLA-SE sirvieron como controles negativos. Los animales se monitorizaron 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 una reducción de aproximadamente un 50 % en las lesiones recurrentes en comparación con los animales tratados solo con GLA-SE.

Ejemplo 12

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

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

La secuencia líder de gD2 tiene 40 aminoácidos de longitud (1-40 restos en SEQ ID NO:1). En un vector de expresión, se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de 100 aminoácidos (1-100 restos). Se usa mutagénesis dirigida para cambiar los restos 38-42 de CysAlaLysTyr (SEQ ID NO:16) a GlyLeuAlaVal (SEQ ID NO:17) u otra secuencia que no se escinda durante la síntesis proteica. Células CHO se transformaron con el vector que contenía la secuencia alterada y se aisló la proteína gD2. De manera alternativa, la secuencia de nucleótidos se insertó en un vector de expresión de baculovirus y la proteína se aisló de células Sf9. La verificación de que la secuencia líder está presente se obtiene mediante análisis HPLC.

Ejemplo 13

Eficacia protectora de la vacuna proteica trivalente recombinante más GLA-SE frente a la exposición letal del VHS-2 virulento

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de una vacuna proteica de VHS-2 recombinante trivalente más adyuvante GLA para proteger frente al VHS-2 letal.

Grupos de diez ratones C57BL/6 recibieron dos inmunizaciones intramusculares, con un intervalo de separación de 28 días, de una vacuna trivalente que consistía en 5 µg de cada una de gD2, UL19ud (véase, SEQ ID NO:12) y UL25 recombinante en combinación con 5 µg de GLA-SE o con un vehículo de dextrosa al 5 %. Los ratones inmunizados solo con 5 µg de GLA-SE sirvieron como controles negativos. Un grupo de control adicional consistió en ratones inmunizados con 5 µg de GLA-SE y 1 miligramo por ml de aciclovir (ACV) en el agua de bebida comenzando 24 horas después de la exposición. Veintidós días después de la segunda inmunización, los ratones se trataron con acetato de medroxiprogesterona de liberación prolongada y seis días después se expusieron a una dosis letal para el 50 % de la población (DL₅₀) 50x de VHS-2 de tipo silvestre por vía intravaginal. Los ratones se monitorizaron a diario para observar la formación de lesiones genitales y la supervivencia. Los días 1, 3 y 5 después de la infección, se recogieron frotis vaginales para la cuantificación, mediante PCR, de ADN del VHS-2. 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) y aumentaron la supervivencia (panel B) en comparación con los ratones inmunizados solo con la vacuna proteica trivalente o solo con GLA-SE. Asimismo, como se representa en la Figura 16, 7 de los 10 ratones inmunizados con gD2/UL19ud/UL25 con GLA-SE no tenían ADN detectable de VHS-2 vaginal el día 5, mientras que los ratones en los tres grupos de control mostraron niveles sostenidos de VHS-2 en la vagina hasta el día 5. Los animales que recibieron aciclovir también tuvieron las mismas altas cargas víricas de ADN del VHS-2 los días 1, 3 y 5. Los animales que recibieron la vacuna activa de GLA/SE más gD2/UL19ud/UL25 tuvieron cargas víricas notablemente más bajas, estando muchos animales esterilizados (es decir, sin cargas víricas detectables) el día 5. En resumen, estos experimentos demuestran la eficacia protectora *in vivo* de GLA-SE + la vacuna proteica gD2/UL19ud/UL25 trivalente recombinante contra la exposición letal al VHS-2 virulento.

Ejemplo 14

25 Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en seres humanos

La seguridad y la inmunogenicidad de los inmunógenos descritos anteriormente formulados con GLA-SE, o solo con SE, puede evaluarse en un diseño de estudio en fase 1A/1B con sujetos seronegativos a VHS-2 (diana de la vacuna profiláctica) y con sujetos seropositivos a VHS-2 (diana de la vacuna inmunoterapéutica). El diseño del estudio puede seguir el establecido por la Red de Ensayos de Vacunas contra el VIH (HVTN, por sus siglas en inglés *HIV Vaccine Trials Network*), y se ha utilizado en 40 ensayos de vacunas humanas en fase IA contra el VIH-1 en los últimos 10 años.

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

Los sujetos seronegativos a VHS-2 se definieron mediante transferencia Western el día 0. Además de los ensayos de seguridad, los sujetos del estudio se pueden monitorizar para detectar una posible respuesta inmunitaria humoral y celular específica para el VHS-2 inducida por la vacuna, y la frecuencia de recurrencia de úlceras genitales (sólo para sujetos seropositivos a VHS-2). Para la población infectada con VHS-2, pueden utilizarse dos momentos de prevacunación para establecer anticuerpos contra gD2. La inmunidad celular contra proteínas recombinantes del VHS-2 se puede evaluar mediante ensayo ELISPOT para detectar IFN-γ y mediante tinción intracelular de citocinas (ICS), y la inmunidad humoral específica de gD2 mediante ensayo ELISA y ensayos con anticuerpos neutralizantes.

De lo anterior se apreciará que, aunque en la presente memoria se han descrito realizaciones específicas con fines ilustrativos, pueden hacerse varias modificaciones sin alejarse de la esencia y alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Immune Design Corp.

<120> Vacunas para el VHS-2

60 <130> EAH/FP7331242

<140> EP

<141> 16-05-2013

65 <150> EP13724492.7

<151> 16-05-2013

ES 2 787 455 T3

<150> PCT/US2013/041364
 <151> 16-05-2013

5 <150> 61/647.764
 <151> 16-05-2012

10 <150> 61/679,387
 <151> 03-08-2012

<150> 61/714.158
 <151> 15-10-2012

15 <160> 17

<170> Patentin versión 3.5

20 <210> 1
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 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

ES 2 787 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 787 455 T3

Leu Ile Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg
 610 615 620

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

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

ES 2 787 455 T3

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> Virus del herpes simple 2

5

<400> 2

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

ES 2 787 455 T3

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

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 Asp Ala
 370 375 380

Pro Pro Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
 385 390

<210> 3
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2

5

<400> 3

ES 2 787 455 T3

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
 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

ES 2 787 455 T3

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

<210> 4
<211> 1374
<212> PRT
<213> Virus del herpes simple 2

5

<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

ES 2 787 455 T3

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

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

ES 2 787 455 T3

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

ES 2 787 455 T3

Asn Asn Thr Arg Cys Ala Ala Phe Val Asn Asp Tyr Ser Leu Val Ser
 660 665 670
 Tyr Ile Val Thr Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Pro Glu Glu Cys Met Ala
 675 680 685
 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

ES 2 787 455 T3

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

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

ES 2 787 455 T3

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

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
 <212> PRT

ES 2 787 455 T3

<213> Virus del herpes simple 2

<400> 5

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

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 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

ES 2 787 455 T3

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

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
- <212> PRT
- <213> Virus del herpes simple 2
- <400> 6

5

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

ES 2 787 455 T3

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

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

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

ES 2 787 455 T3

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

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

ES 2 787 455 T3

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

5 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 7

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

15 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 8

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

25 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 9

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

35 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2
 <400> 10

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

<210> 11

ES 2 787 455 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2

5 <400> 11

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

10 <210> 12
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Virus del herpes simple 2

15 <400> 12

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

ES 2 787 455 T3

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
 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

ES 2 787 455 T3

actgaccttt ggatggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360
 caatgaagga gagaacaccc gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgaccc 420
 ggagagagaa gtattagagt ggaggttga cagccgccta gcatttcac acatggcccg 480
 agagctgcat cgggactgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 540
 ctctggctaa ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt gagtgttca 600
 agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 660
 gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

5 <210> 14
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo1

<400> 14
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc 240
 tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgccgctc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

10
 15 <210> 15
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo1

<400> 15
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggctaat 180
 tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgctgtact gggctctctt ggtagacca 240
 gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag 300
 cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360
 atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

20
 25 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Fragmento de VHS-2

<400> 16

ES 2 787 455 T3

Cys Ala Lys Tyr
1

5 <210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Fragmento modificado de VHS-2

<400> 17

Gly Leu Ala Val
1

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica inmunogénica que comprende:
 - 5 (a) un fragmento inmunogénico de un polipéptido de VHS-2 que es un fragmento inmunogénico de al menos 100 aminoácidos del polipéptido UL19 que comprende los restos 451-1054 de la SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75 % de aminoácidos 1-450 de la SEQ ID NO:4, y que carece al menos del 75 % de aminoácidos 1055-1374 de la SEQ ID NO:4; o una variante inmunogénica del mismo que conserva una identidad de aminoácidos de al menos el 85 % sobre al menos 100 aminoácidos contiguos;
 - 10 (b) un adyuvante monofosforil lípido A (MLA); y
 - (c) un transportador farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el fragmento inmunogénico de UL19 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:12.

15
3. La composición de cualquier reivindicación anterior, que adicionalmente comprende UL25 o un fragmento inmunogénico de la misma.
4. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, que adicionalmente comprende gD2 o un fragmento inmunogénico del mismo.

20
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el adyuvante de MLA 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.

25
7. La composición de la reivindicación 6, en donde la emulsión de aceite en agua comprende escualeno.
8. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método para el tratamiento de una infección por VHS-2 en un sujeto.

30
9. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en un método de generación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- 35 10. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en un método de inmunización de un sujeto frente al VHS-2.
11. La composición para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la composición es para la administración una través de una vía intradérmica, mucosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, rectal o vaginal.

40
12. La composición para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el método comprende además la administración al sujeto de una segunda, una tercera o una cuarta composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

45
13. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende las proteínas o los fragmentos inmunogénicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

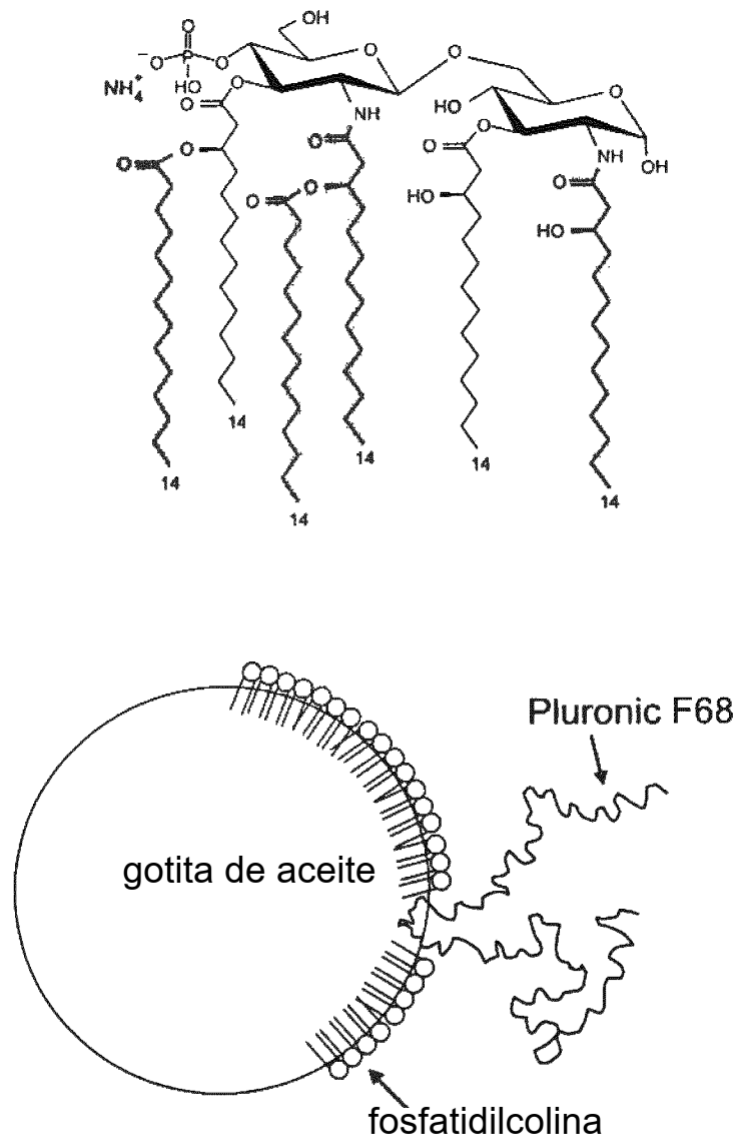


FIG. 1

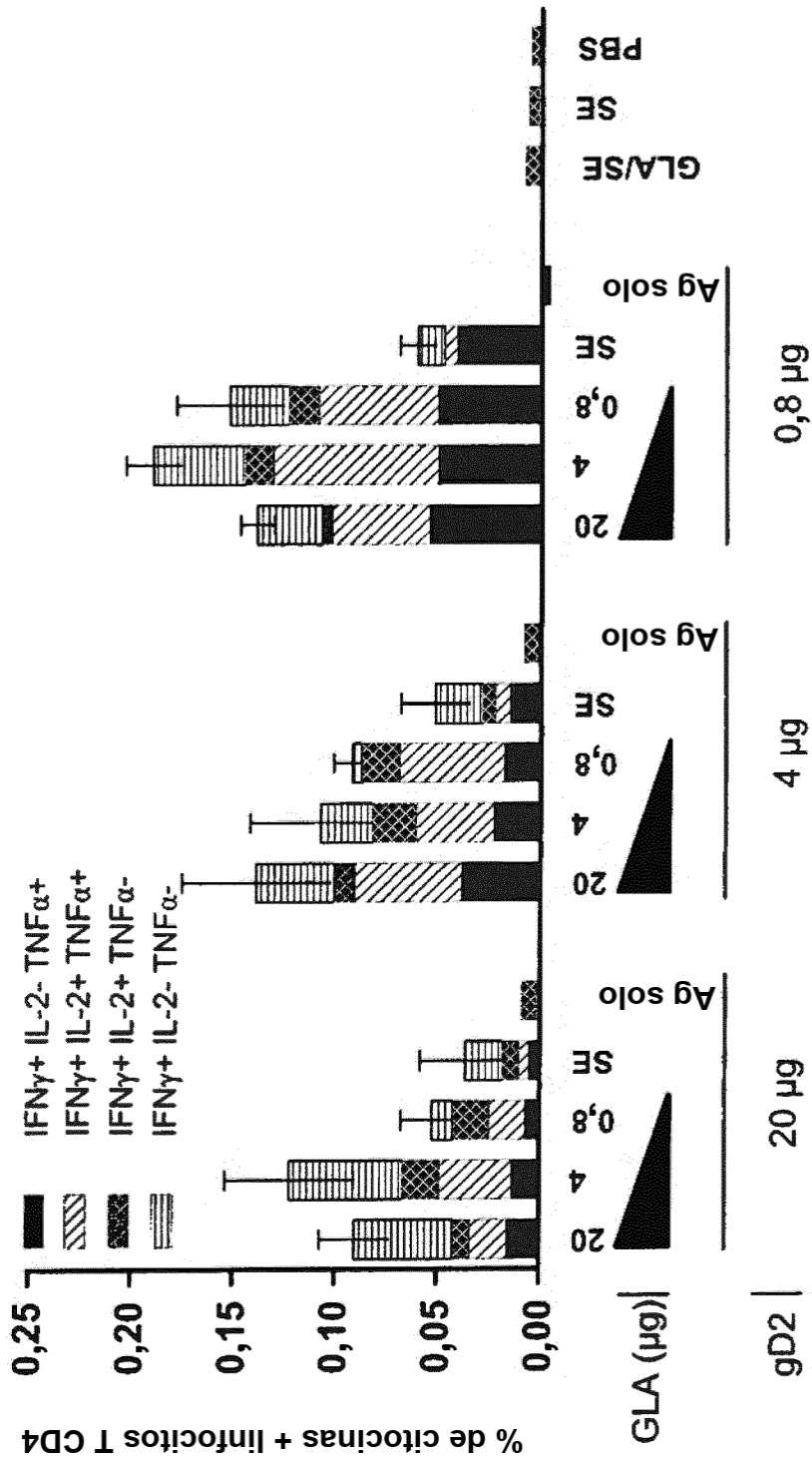


FIG. 2

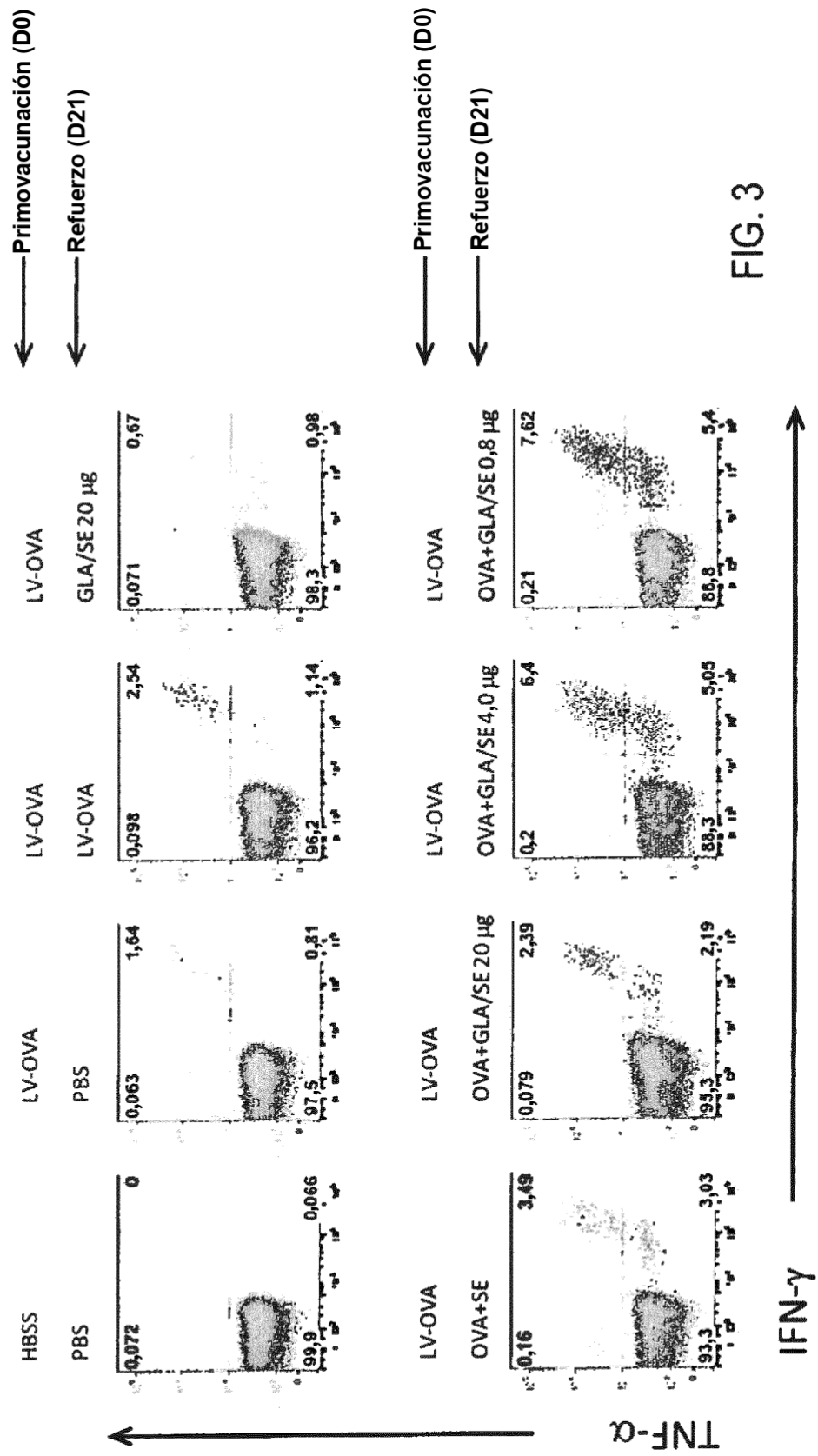


FIG. 3

OVA 257

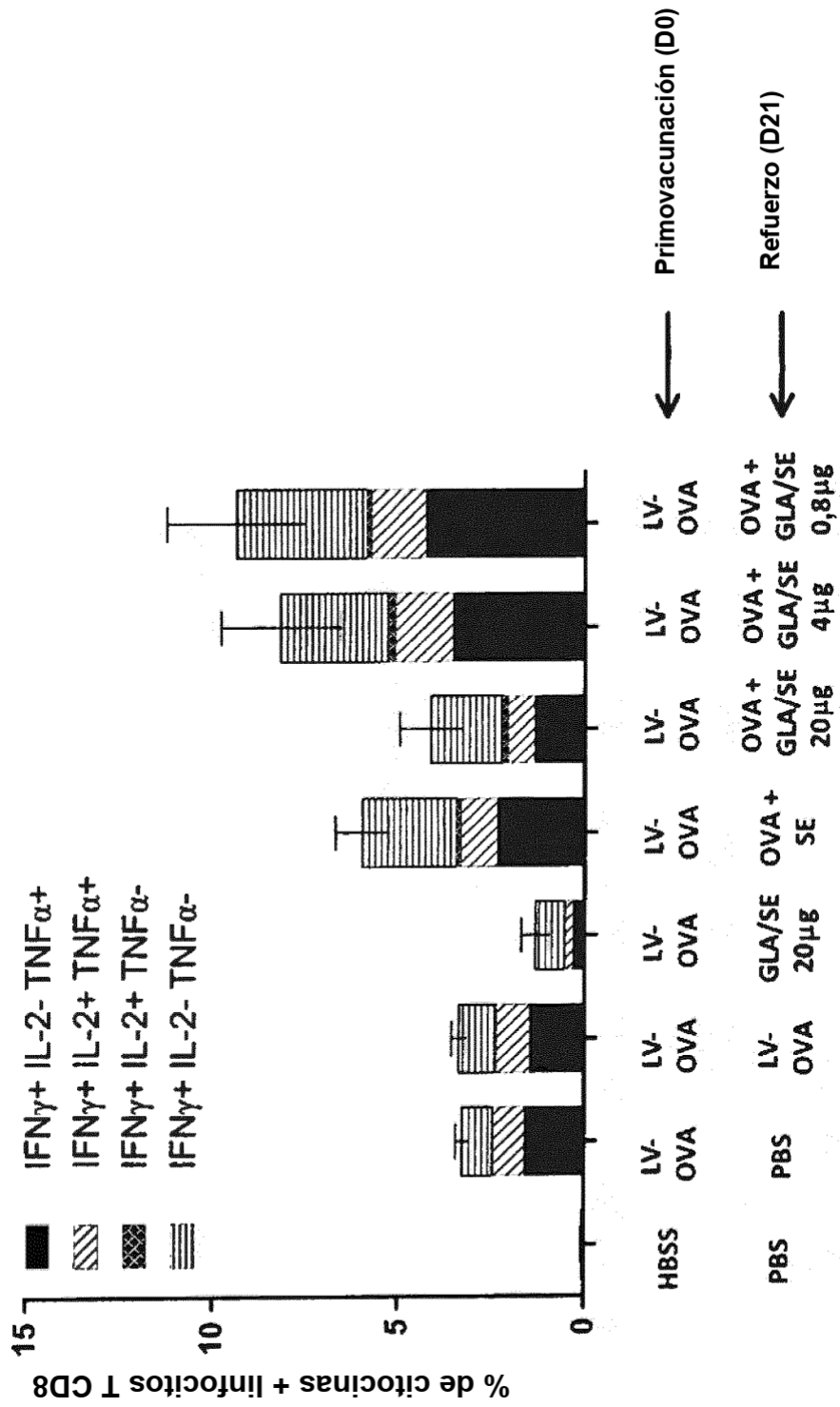


FIG. 4

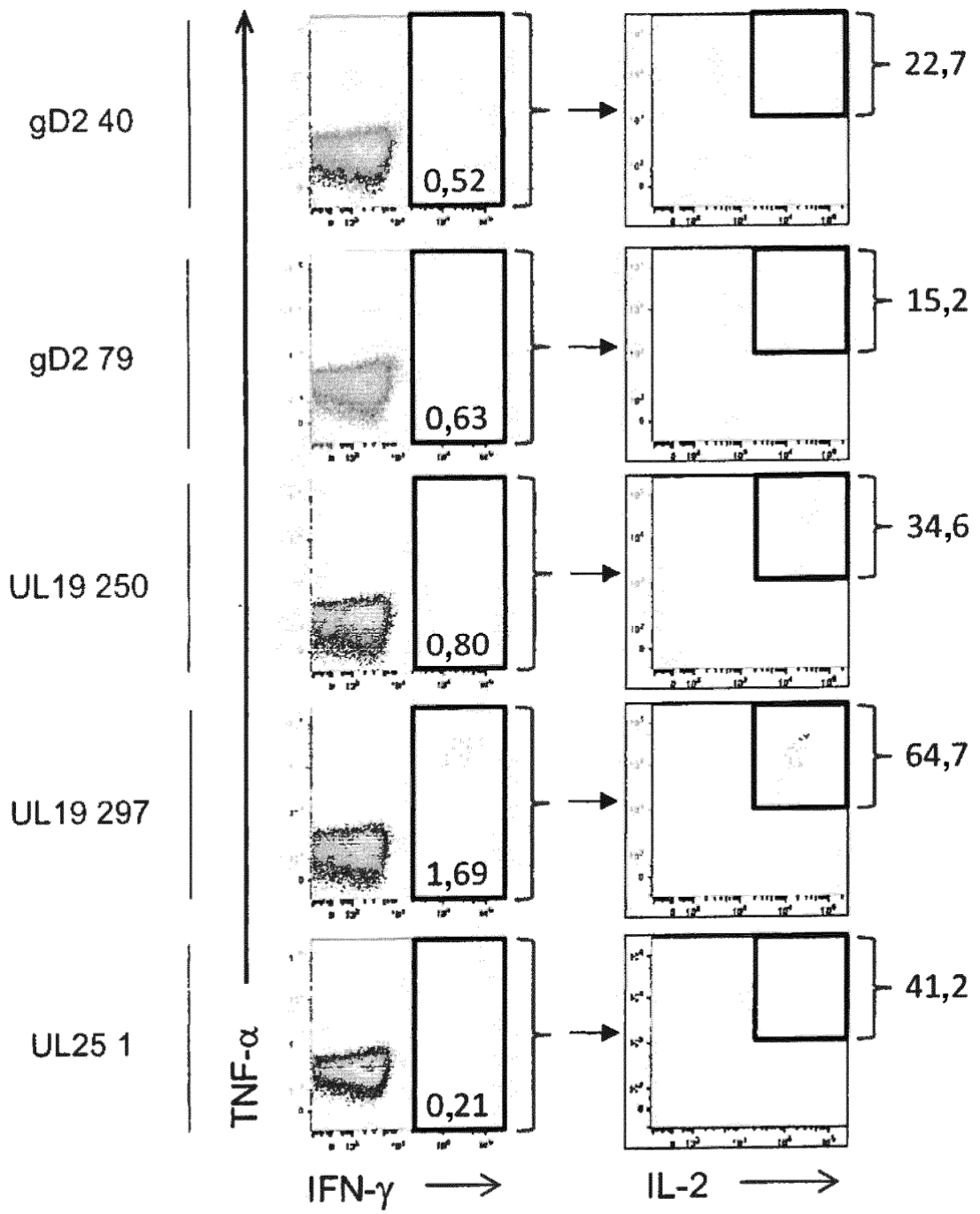
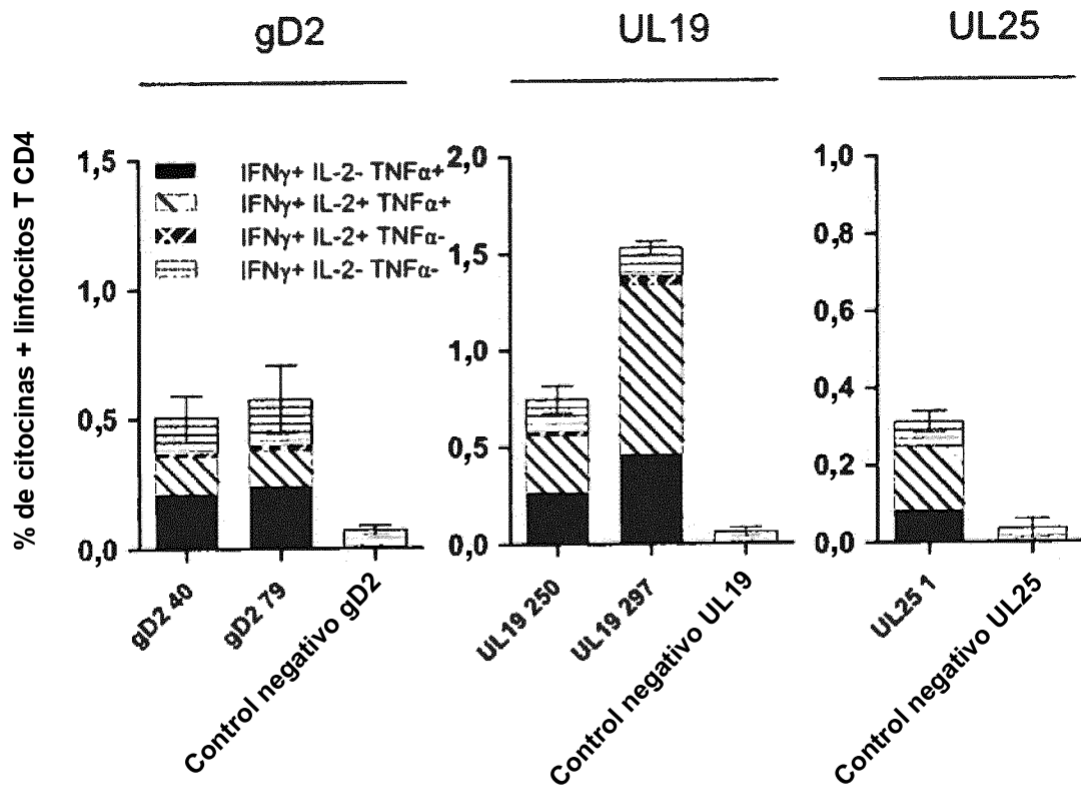


FIG. 5A



Pentadecapéptidos

FIG. 5B

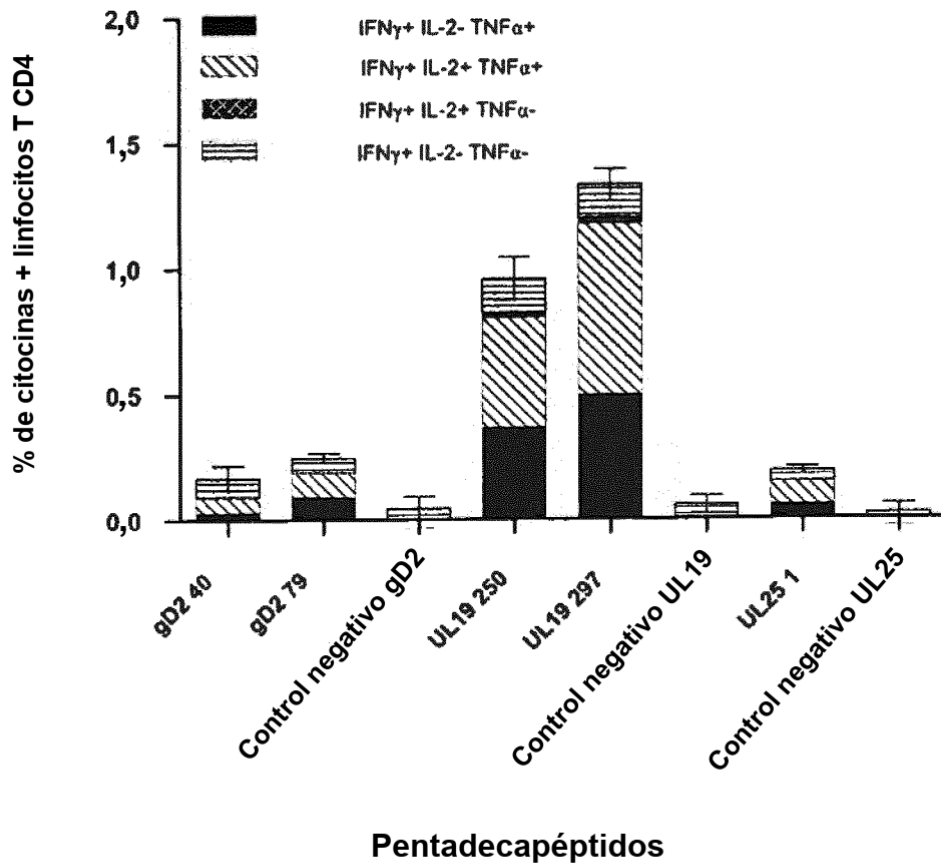


FIG. 6A

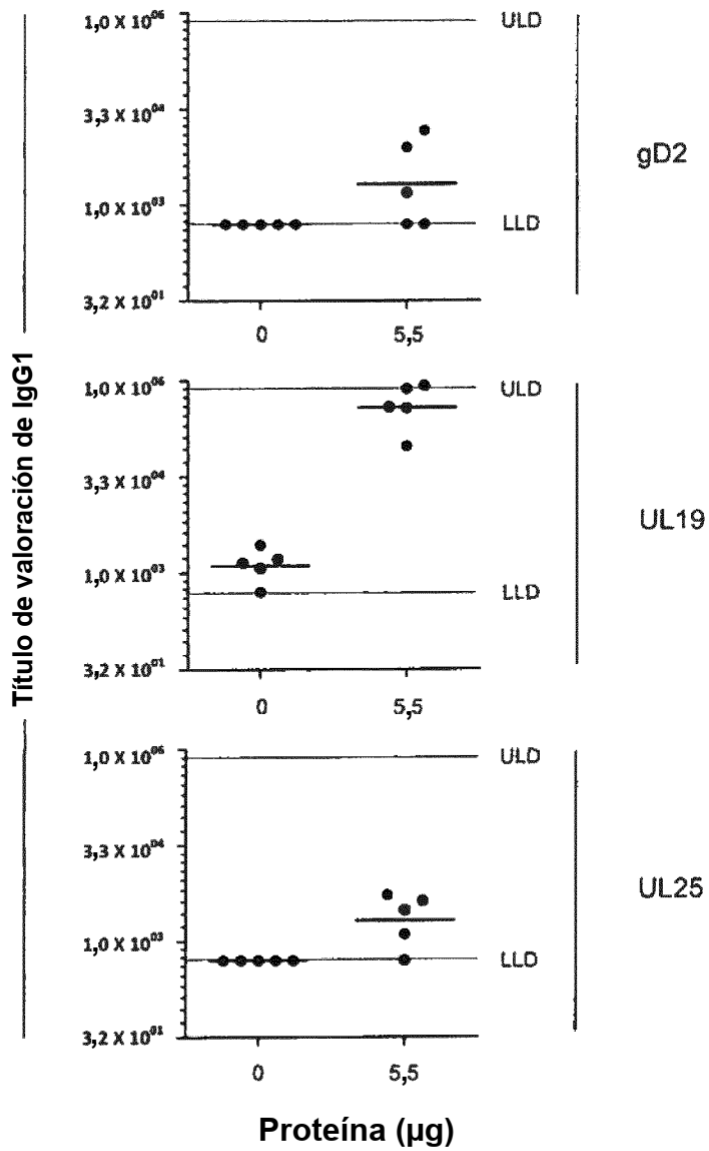


FIG. 6B

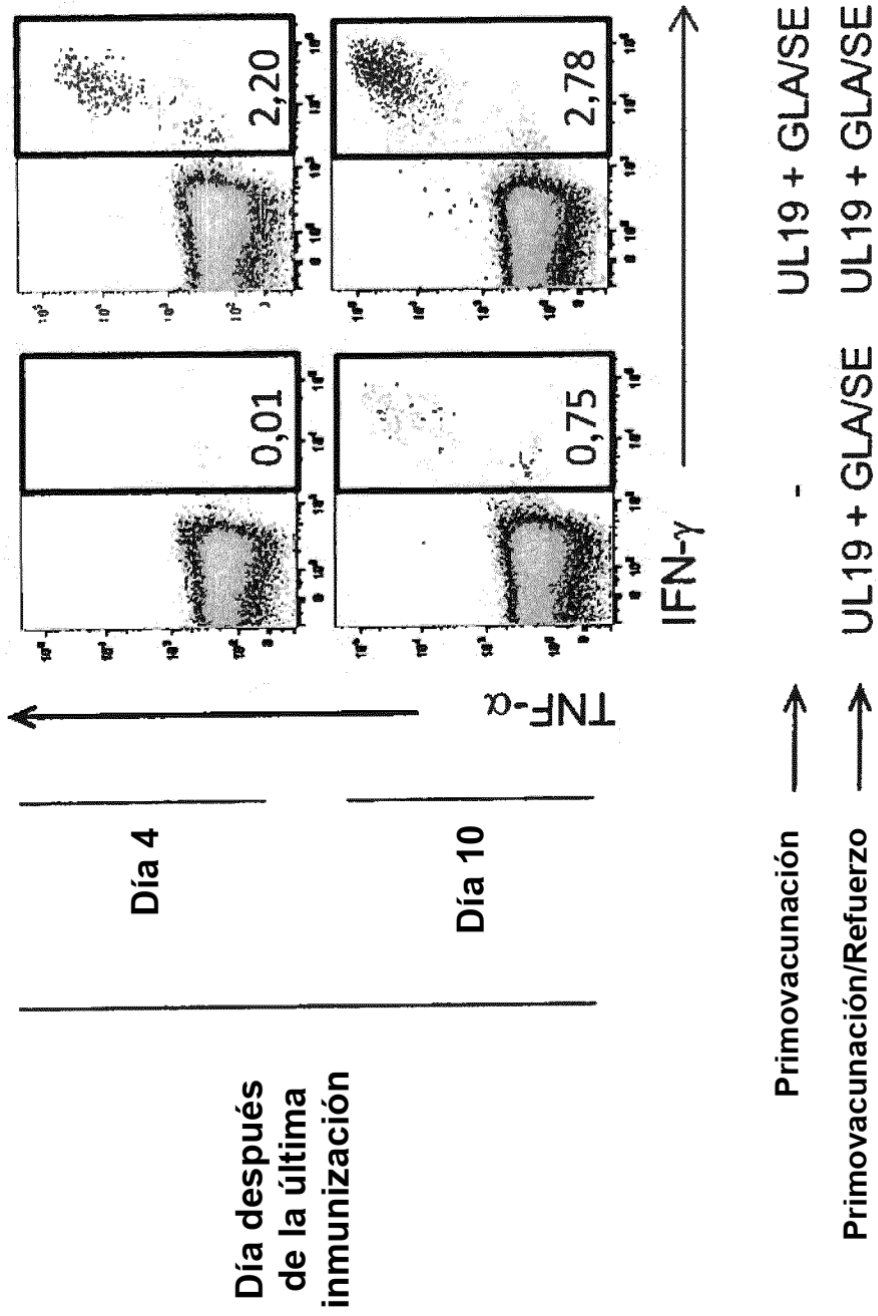


FIG. 7A

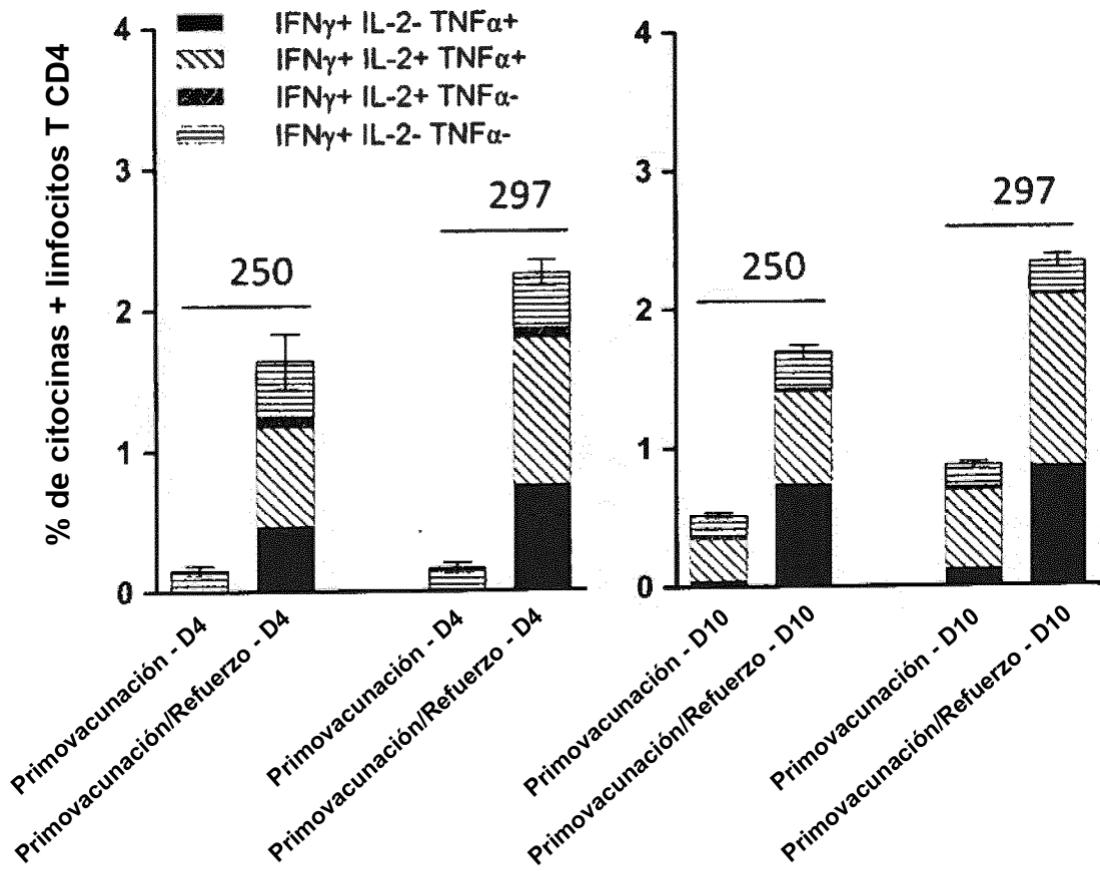


FIG. 7B

**Primovacunación/Refuerzo
epítipo nº 2 de linfocito T CD4
de UL19**

Adyuvante

Ninguno

SE

GLA-SE

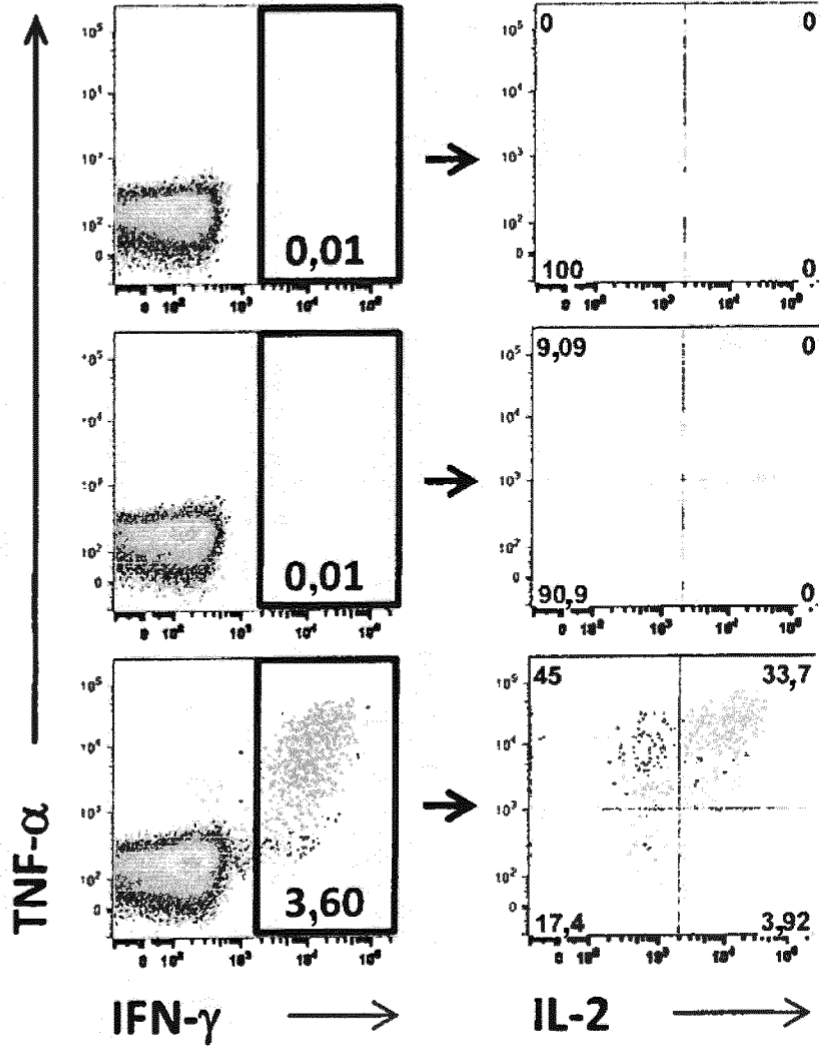


FIG. 8A

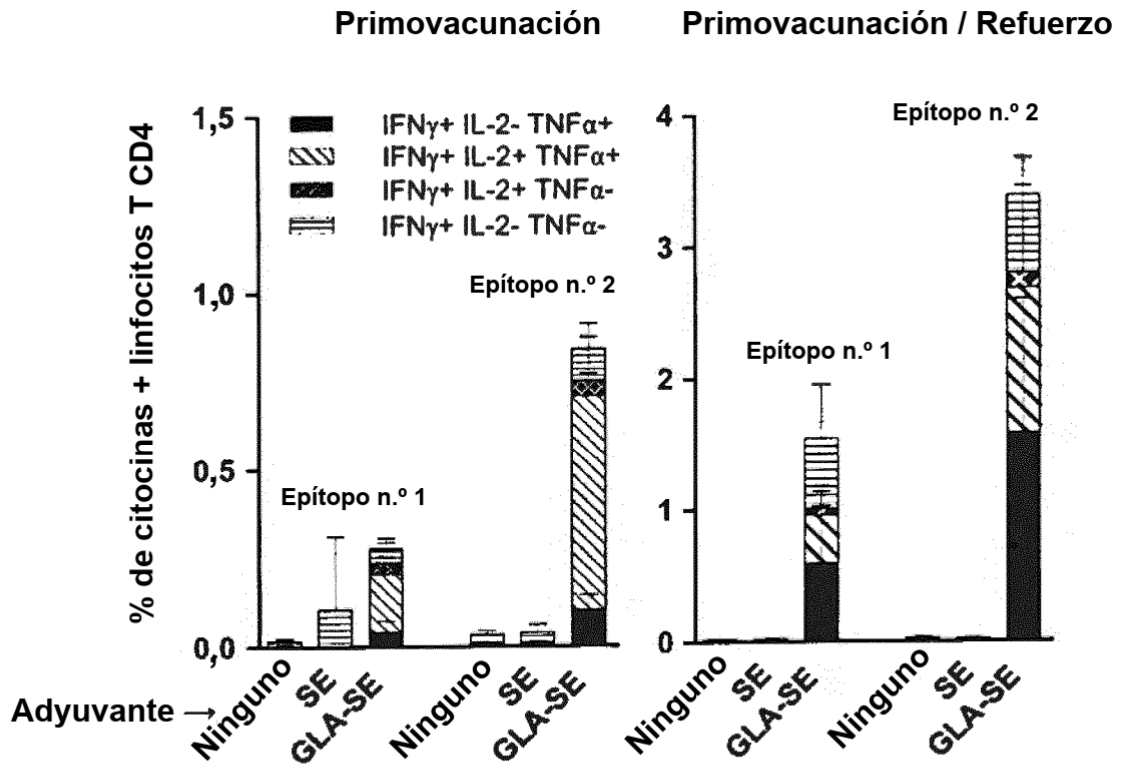


FIG. 8B

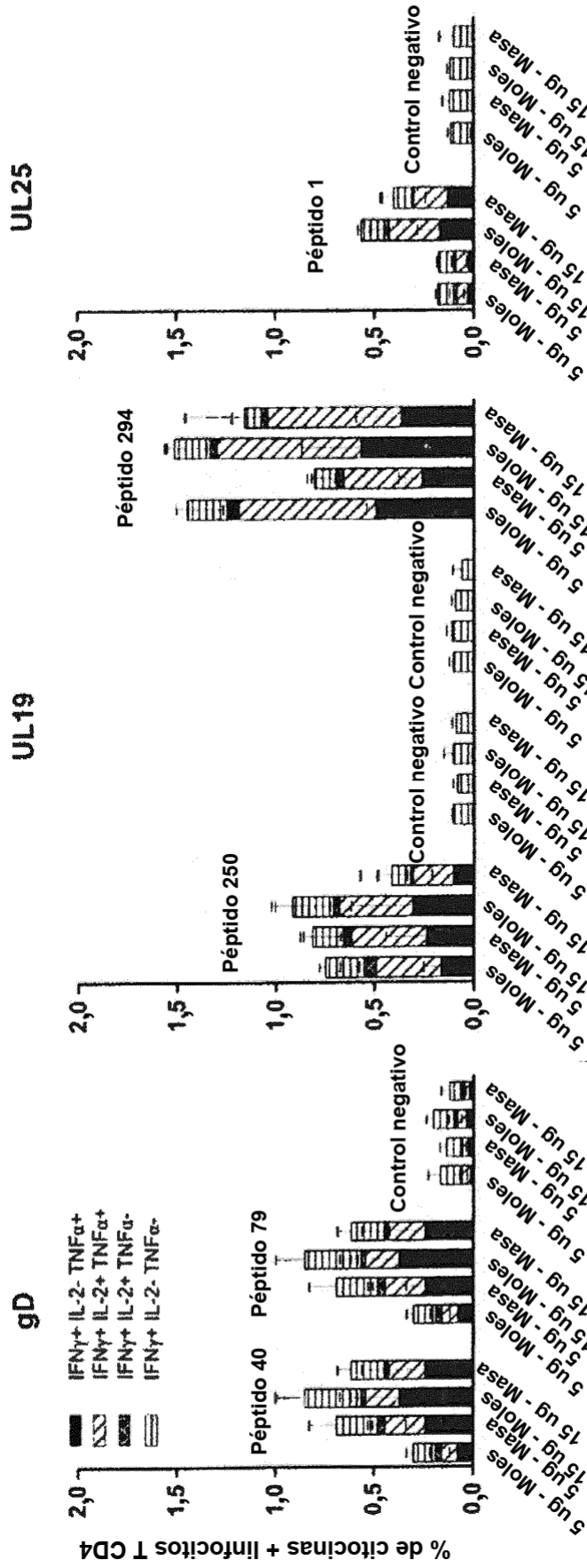
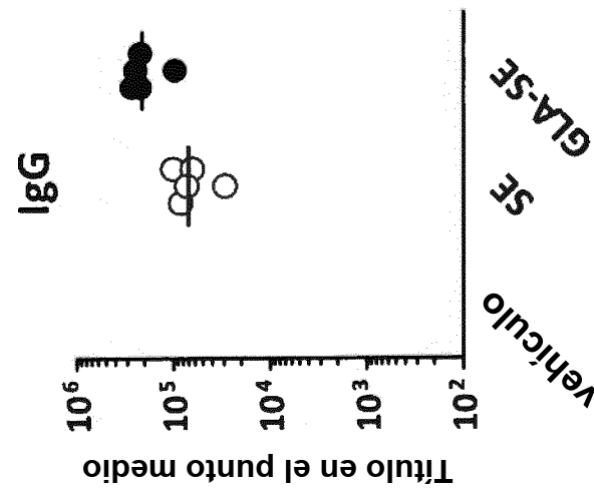
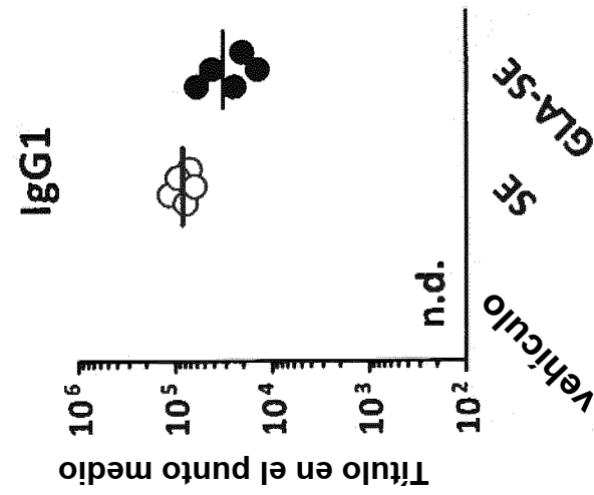
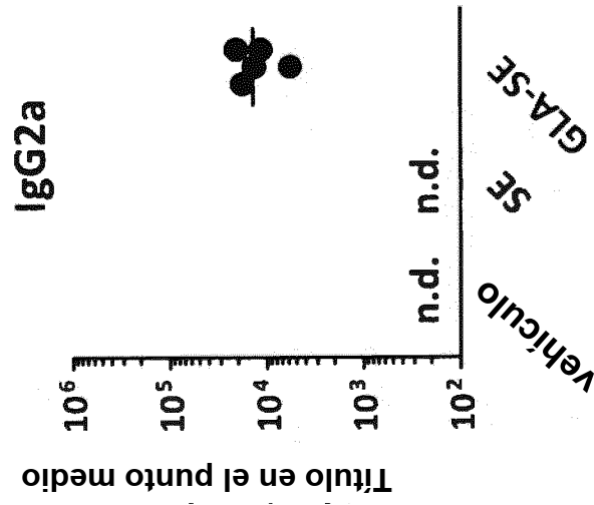
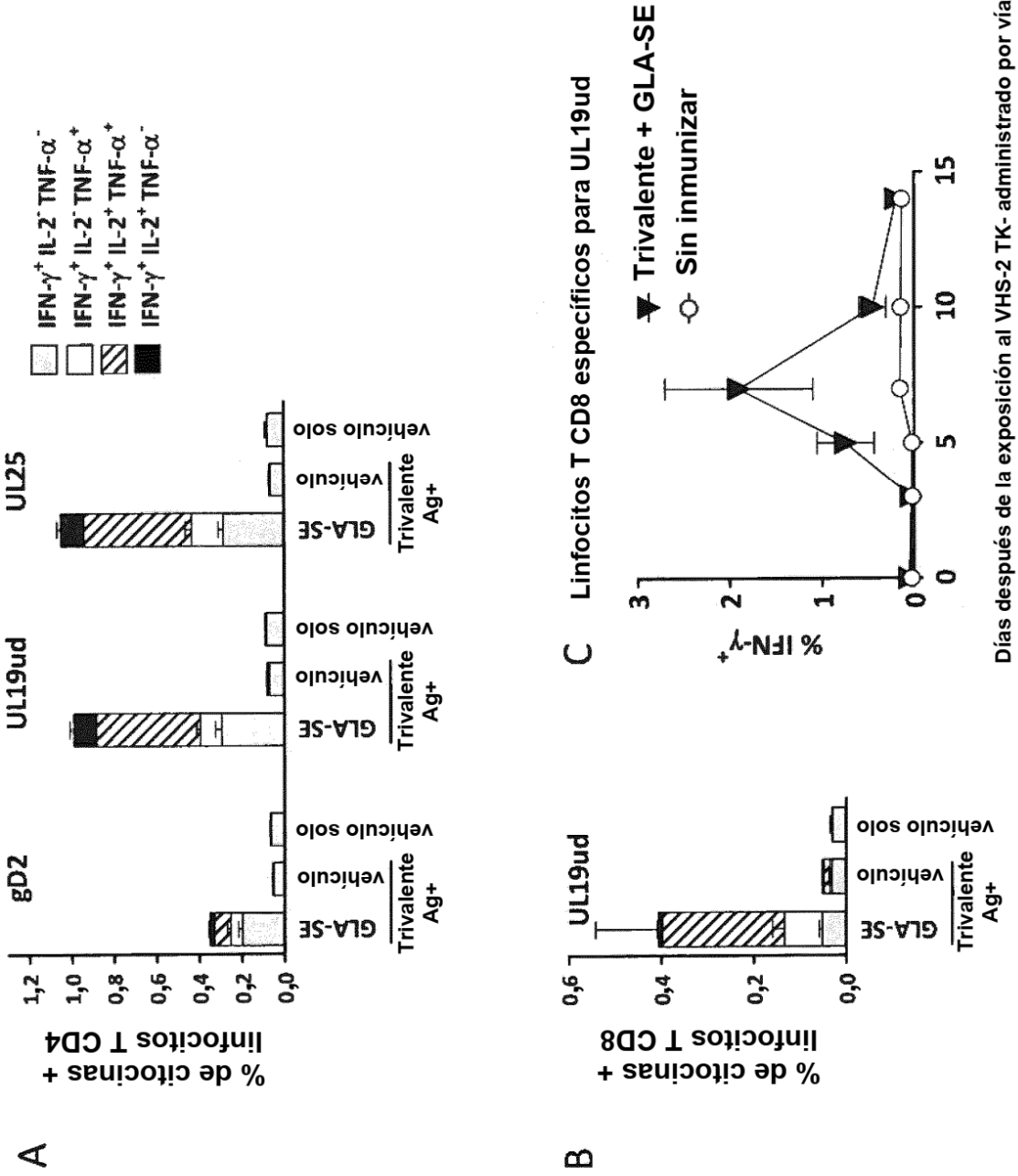


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C





Días después de la exposición al VHS-2 TK- administrado por vía s.c.

Figura 11

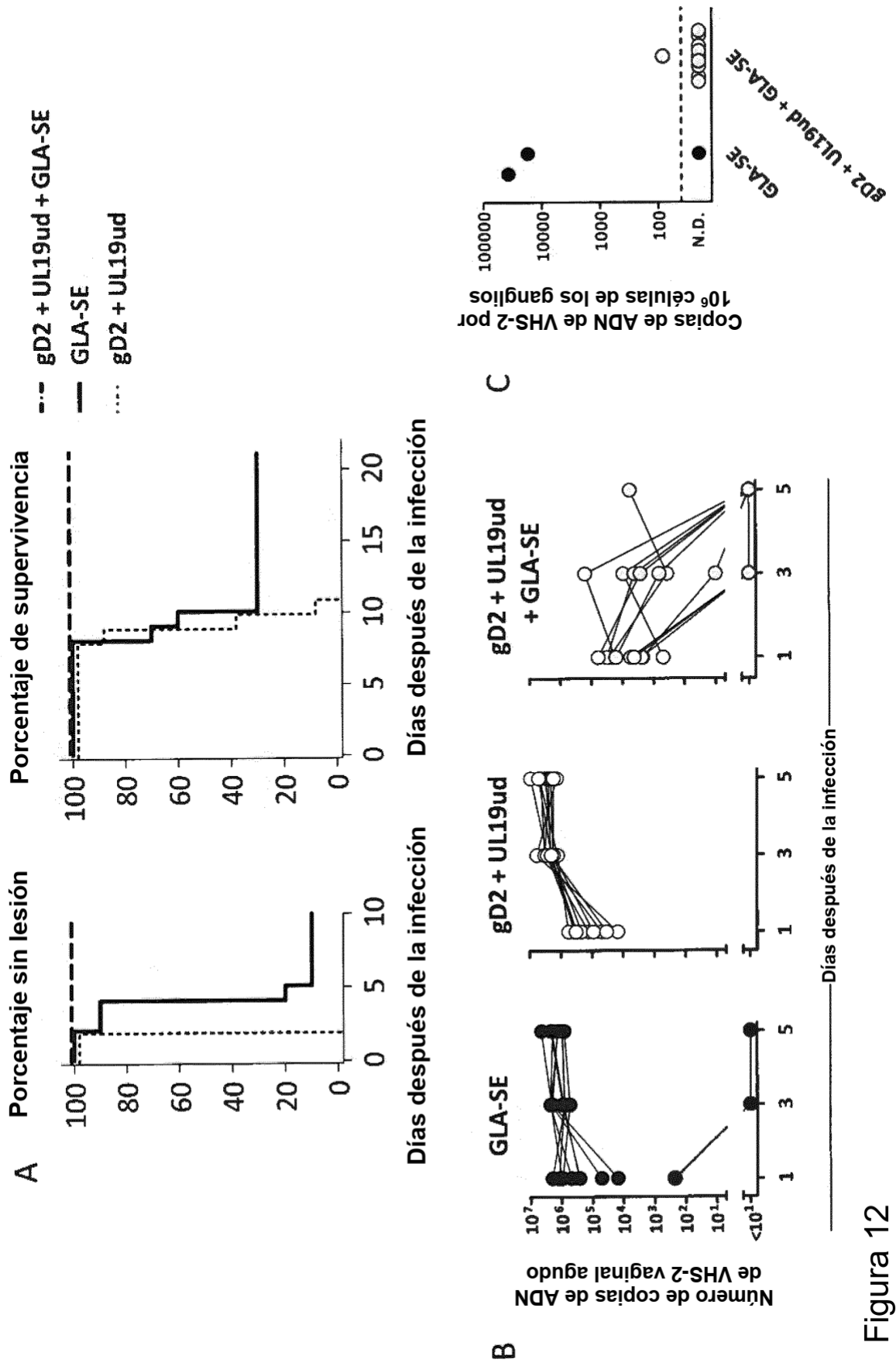


Figura 12

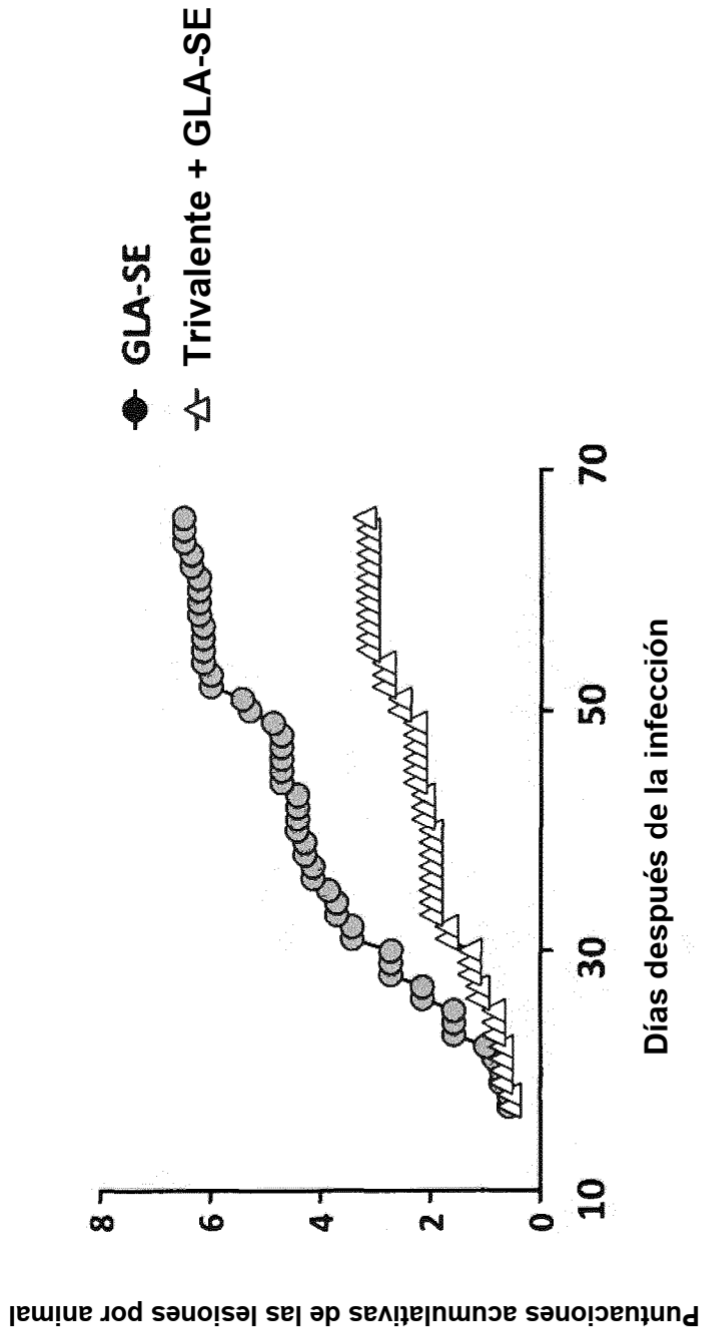


Figura 14

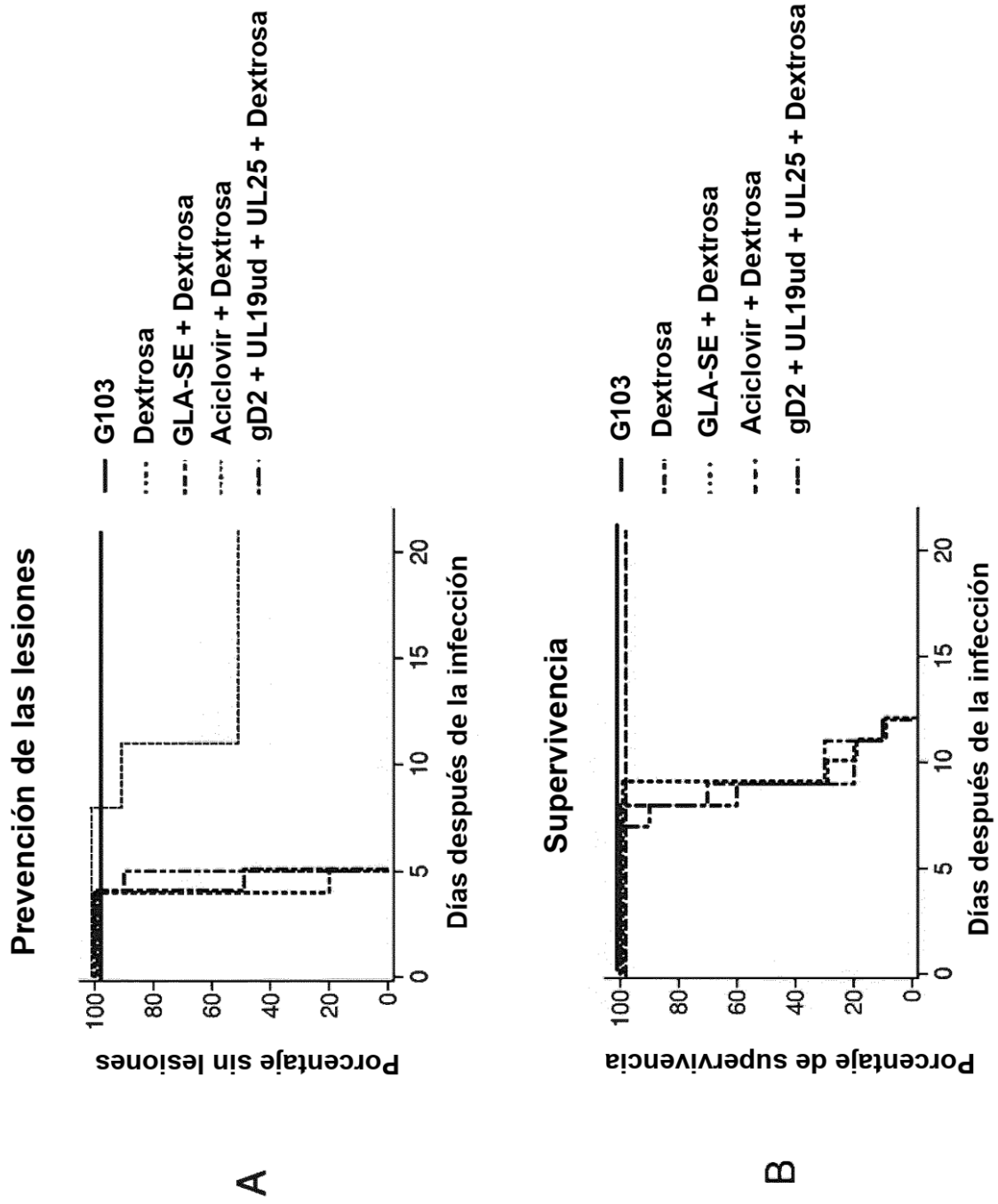


Figura 15

Títulos víricos vaginales agudos

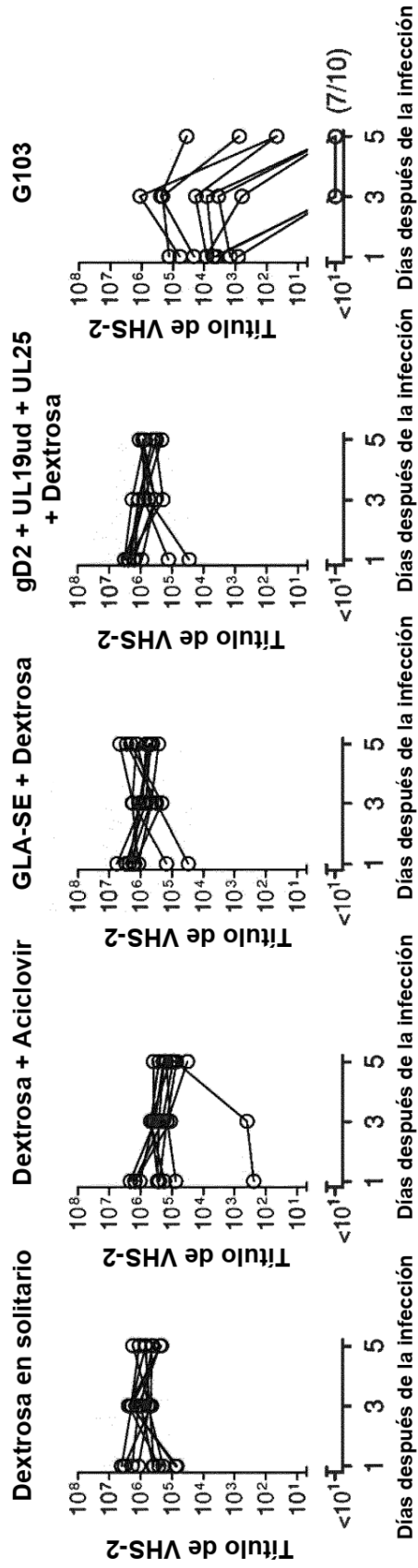


Figura 16