COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA HERPES ZÓSTER

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición de vacuna para prevenir el herpes zóster.

Antecedentes de la invención

La infección primaria por virus de la varicela zóster (VZV) causa la varicela, que se caracteriza por erupciones cutáneas altamente contagiosas, principalmente en la cara y el tronco. Después de la infección inicial, el ADN viral puede permanecer latente durante años en el citoplasma de la célula neuronal del anfitrión. El virus puede reactivarse para causar herpes zóster (zóster o culebrilla) en adultos.

El herpes zóster causa erupciones cutáneas distintas de las que se producen durante la infección primaria. Las erupciones se acompañan de dolor intenso y pueden conducir a condiciones más graves, como la neuralgia postherpética (NPH).

El virus de la varicela zóster (VZV), también conocido como herpesvirus humano 3 (HHV-3), es un miembro de la subfamilia alfaherpesvirus de la familia Herpesviridae. El VZV es un virus envuelto con un genoma de ADN de doble cadena de aproximadamente 125,000 nucleótidos. El genoma de VZV está

encerrado por una nucleocápside icosaédrica. Un tegumento viral (epidermis), ubicado en el espacio entre la nucleocápside y la envoltura viral, es una construcción que consiste en proteínas y enzimas codificadas por virus. La envoltura viral se deriva de las membranas de la célula hospedera y contiene glicoproteínas codificadas por virus.

El genoma de VZV codifica para setenta (70) o más marcos de lectura abiertos (ORFs), nueve (9) de los cuales codifican para glicoproteínas (gE, gI, gB, gH, gK, gN, gL, gC y gM) que se presume que funcionan en diferentes etapas del ciclo de replicación viral.

La glicoproteína E (gE) es esencial para la replicación viral (Mallory *et al.* (1997) *J. Virol.* 71: 8279-8288) y Mo *et al.* (2002) *Virology* 304: 176-186), y es la glicoproteína más abundante que se encuentra en las células infectadas, así como en los viriones maduros (Grose, 2002, The predominant varicella-zoster virus gE and gI glycoprotein complex, En Structure-function relationships of human pathogenic viruses, Holzenburg y Bogner (eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY).

La glicoproteína I (gI) forma un complejo con gE en las células infectadas, promoviendo así la endocitosis de ambas glicoproteínas, que luego se administran al trans-Golgi donde se obtiene la envoltura viral final (Olson y Grose

(1998) *J. Virol.* 72: 1542-1551).

La glicoproteína B (gB), que se cree que desempeña un papel importante en la entrada viral, tiene un epítopo para un anticuerpo neutralizante de virus y es la segunda glucoproteína más importante en la superficie del virión (Arvin (1996) *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 361-381).

Se cree que la glicoproteína H (gH) tiene una función de fusión que promueve la propagación del virus de una célula a otra.

Actualmente, las vacunas vivas atenuadas, que se usan comúnmente para prevenir la varicela o el herpes zóster, tienen varias desventajas. Primero, hay algunas pruebas de que la inmunidad contra la infección por VZV disminuye con el tiempo y el efecto de la vacuna desaparece (Chaves *et al.* (2007) *N. Engl. J. Med.* 356: 1121-1129). Por lo tanto, los sujetos vacunados con la vacuna pueden seguir siendo susceptibles al herpes zóster, que es una condición más grave causada por el VZV. Además, las vacunas vivas atenuadas se fabrican usando virus vivos con patogenicidad debilitada, de modo que los sujetos vacunados pueden volverse susceptibles a la varicela o al herpes zóster debido a la vacunación. De hecho, se ha informado que varios casos de herpes zóster fueron causados por la cepa del virus usada en la vacuna (Matsubara *et al.* (1995) *Acta Paediatr Jpn* 37: 648-50; y

Hammerschlag *et al.* (1989) *J Infect Dis.* 160: 535-7). Además, debido al virus vivo atenuado presente en la vacuna, el uso de la vacuna puede estar limitado para sujetos cuya función inmune está disminuida.

Para aumentar el efecto de prevenir el herpes zóster que reaparece a lo largo de las células neuronales después de la latencia del virus, es importante aumentar significativamente la activación de la inmunidad mediada por células (CMI) al antígeno VZV en lugar de la activación de la inmunidad humoral al mismo. Para esto, es importante aumentar la relación Th1/Th2 promoviendo la activación de Th1 entre Th1 y Th2, que son células T (células T auxiliares).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas composiciones de vacuna contra el herpes zóster que puedan aumentar selectivamente la respuesta inmune mediada por células sin tener las desventajas de las vacunas atenuadas vivas.

Breve descripción de la invención

Problema técnico

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición de vacuna que tenga una alta seguridad y un excelente efecto para prevenir el herpes zóster, que aumente selectivamente la respuesta inmune mediada por células sin

tener las desventajas de las vacunas atenuadas vivas.

Solución al problema

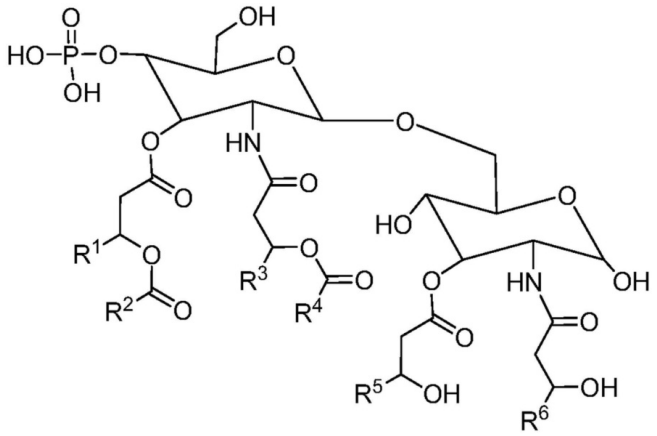
1. Una composición de vacuna contra la varicela o el herpes zóster que comprende:

glicoproteína E del virus de la varicela zóster;

un adyuvante lipídico de glucopiranosilo de la siguiente fórmula 1; y

un aceite metabolizable:

[Fórmula 1]



en donde, R^1, R^3, R^5 y R^6 son cada uno independientemente alquilo de C_{10}-C_{12}; y R^2 y R^4 son cada uno independientemente alquilo de C_8-C_{14}.

2. La composición de vacuna del anterior 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de Fórmula 1 en donde R^1, R^3, R^5 y R^6 son alquilo de C_{11}.

3. La composición de vacuna del anterior 1, en

donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de Fórmula 1 en donde R^2 y R^4 son alquilo de C_{13}.

4. La composición de vacuna del anterior 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de Fórmula 1 en donde R^2 y R^4 son alquilo de C_9.

5. La composición de vacuna del anterior 1, en donde el aceite metabolizable es escualeno.

6. La composición de vacuna del anterior 4, en donde el escualeno está contenido en una cantidad de 1% (v/v) a 7% (v/v) de la composición de vacuna total.

7. La composición de vacuna del anterior 5, en donde el escualeno está contenido en una cantidad de 1% (v/v) a 4% (v/v) de la composición de vacuna total.

8. La composición de vacuna del anterior 1, en donde la glicoproteína E está contenida en una cantidad de 5 µg a 100 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

9. La composición de vacuna del anterior 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo está contenido en una cantidad de 7.5 µg a 20 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

10. La composición de vacuna del anterior 8, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo está contenido en una cantidad de 9 µg a 18 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

11. Un método para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, que comprende administrar la composición de cualquiera de los anteriores 1 a 10 a un sujeto.

Efectos adecuados de la invención

La composición de vacuna de la presente invención es excelente para prevenir el herpes zóster.

La composición de vacuna de la presente invención aumenta significativamente la respuesta inmune mediada por células frente al antígeno VZV en comparación con la respuesta inmune humoral al mismo.

La composición de vacuna de la presente invención aumenta enormemente el número de células Th1 produciendo dos o más citocinas específicas de Th1.

La composición de vacuna de la presente invención aumenta enormemente la producción de IgG2c en comparación con la producción de IgG1.

La composición de vacuna de la presente invención no tiene posibilidad de infectar al sujeto con herpes zóster debido a la vacunación.

La composición de vacuna de la presente invención se puede administrar incluso a sujetos cuya función inmune esté disminuida.

La composición de vacuna de la presente invención

tiene un efecto preventivo de larga duración.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la producción de IgG específica de antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 3.

La figura 2 representa las producciones de IgG2c e IgG1 específicas de antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 3.

La figura 3 indica el número de células T que secretan IFN-γ específicamente a la proteína gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 4.

La figura 4 demuestra el número de células T que secretan IFN-γ específicamente al péptido que se superpone con gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 4.

La figura 5 muestra el número de células T que secretan IFN-γ específicamente a todo el VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 4.

La figura 6 presenta la cantidad de diversas citocinas Th secretadas específicamente al antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 5.

La figura 7 muestra la distribución de células secretoras de citocinas específicas de antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 6.

La figura 8 ilustra la producción de IgG específica de antígeno de VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 7.

La figura 9 representa las producciones de IgG2c e IgG1 específicas de antígeno de VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 7.

La figura 10 indica la cantidad de IFN-γ secretada específicamente para todo el VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 8.

La figura 11 demuestra la distribución de células secretoras de citocinas específicas de antígeno VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 9.

La figura 12 muestra la producción de IgG específica de antígeno de VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 10 y el número de células T específicas para gE o VZV completo de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 2-2.

La figura 13 presenta la producción de IgG específica de antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 11.

La figura 14 muestra las producciones de IgG2c e IgG1 específicas de antígeno gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 11.

La figura 15 ilustra el número de células T que

secretan IFN-γ específicamente a la proteína gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 12.

La figura 16 representa el número de células T que secretan IFN-γ específicamente al péptido que se superpone a gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 12.

La figura 17 indica el número de células T que secretan IFN-γ específicamente al antígeno VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 12.

La figura 18 demuestra la cantidad de IFN-γ secretada por la estimulación de la proteína gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 13.

La figura 19 muestra la cantidad de IFN-γ secretada por la estimulación peptídica superpuesta a gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 13.

La figura 20 presenta el número de células T que secretan IFN-γ específicamente a la proteína gE de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 14.

La figura 21 muestra el número de células T que secretan IFN-γ específicamente a todo el VZV de acuerdo con el experimento del Ejemplo experimental 14.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

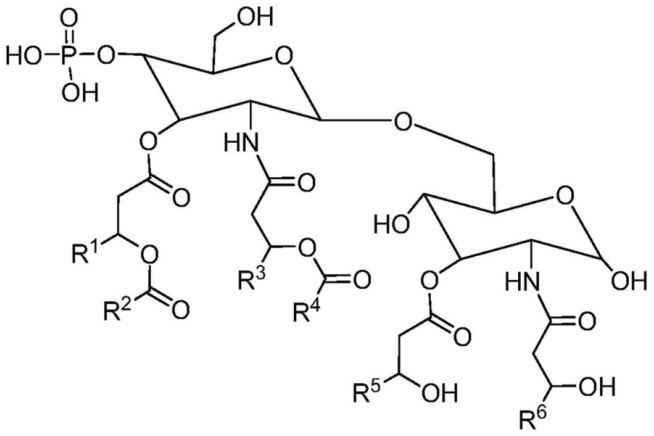
La presente invención se refiere a una composición de vacuna contra el herpes zóster, que comprende la

glucoproteína E del virus de la varicela zóster, un adyuvante lipídico de glucopiranosilo y un aceite metabolizable, y tiene una alta seguridad y un excelente efecto para prevenir el herpes zóster al aumentar selectivamente la respuesta inmune mediada por células sin tener las desventajas de las vacunas atenuadas vivas.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle.

La composición de vacuna de la presente invención comprende la glucoproteína E del virus de la varicela zóster (VZV), un adyuvante lipídico de glucopiranosilo de la siguiente fórmula 1 y un aceite metabolizable:

[Fórmula 1]



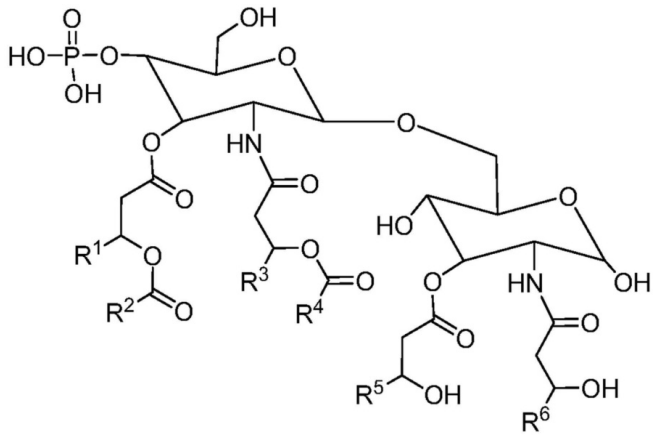
en donde, R^1, R^3, R^5 y R^6 son cada uno independientemente alquilo de C_{10}-C_{12}; y R^2 y R^4 son cada uno independientemente alquilo de C_8-C_{14}.

La composición de vacuna de la presente invención

comprende glicoproteína E (gE) de VZV. La glicoproteína E (gE) en la presente invención significa la glicoproteína E de VZV o un derivado inmunogénico de la misma. El derivado inmunogénico en la presente invención puede ser aquel en el que se modifique una parte de la glicoproteína E. Por ejemplo, puede ser aquel en el que se corte una parte de la glucoproteína E, uno o más aminoácidos de la glicoproteína E se reemplacen por otros aminoácidos, se eliminen uno o más aminoácidos de la glicoproteína E, se agreguen uno o más aminoácidos a la glicoproteína E, o uno o más aminoácidos de la glicoproteína E se modifiquen químicamente. Por ejemplo, la glicoproteína E de la presente invención puede representarse por la secuencia de SEQ ID NO: 1.

La composición de vacuna de la presente invención comprende un adyuvante lipídico de glucopiranosilo de la siguiente Fórmula 1 y un aceite metabolizable:

[Fórmula 1]



en donde, R^1, R^3, R^5 y R^6 son cada uno independientemente alquilo de C_{10}-C_{12}; y R^2 y R^4 son cada uno independientemente alquilo de C_8-C_{14}. Por ejemplo, R^2 y R^4 pueden ser alquilo de C_8, alquilo de C_9, alquilo de C_{10}, alquilo de C_{11}, alquilo de C_{12}, alquilo de C_{13}, o alquilo de C_{14}. De acuerdo con un ejemplo más específico, R^2 y R^4 pueden ser alquilo de C_9 o alquilo de C_{13}. Por ejemplo, R^2 y R^4 pueden ser alquilo de C_9.

El término "aceite metabolizable" como se usa en este documento significa un aceite cuya estructura está modificada por el metabolismo, e incluye aceites vegetales, aceites de pescado, aceites animales y aceites sintéticos, que no tienen biotoxicidad y pueden sufrir cambios estructurales en la progresión metabólica.

De acuerdo con una modalidad específica de la presente invención, el aceite metabolizable de la presente invención es escualeno. El escualeno es un hidrocarburo del

esqueleto triterpeno que tiene 30 carbonos. Se puede usar una variedad de escualenos comúnmente conocidos en la técnica como aceites o emulsiones metabolizables, por ejemplo, escualeno de aceite de hígado de tiburón. Un ejemplo de composición de escualeno se describe en Fox CB *et al.* (2013) *Vaccine* 31 (49): 5848-55.

Para aumentar el efecto de la prevención del herpes zóster, es importante mejorar significativamente la activación de la inmunidad mediada por células (CMI) contra los antígenos del VZV y, al mismo tiempo, minimizar la activación de la inmunidad humoral.

Los altos niveles de citocinas específicas de Th2 favorecen la inducción de una respuesta inmune humoral al antígeno proporcionado, mientras que los altos niveles de citocinas específicas de Th1 tienden a preferir la inducción de la respuesta inmune mediada por células (CMI) al antígeno proporcionado. Por lo tanto, cuantas más citocinas específicas de Th1 se generen en comparación con las citocinas específicas de Th2, mayor será el grado de activación de la respuesta inmune mediada por células que la de la respuesta inmune humoral.

Además, cuanto mayor sea el número de células que producen simultáneamente dos o más citocinas a partir de IFN-γ, TNF-α e IL-2, mayor será el grado de activación de la

respuesta inmune mediada por células.

Además, a medida que el grado de activación de la respuesta inmune mediada por células llega a ser mayor que el de la respuesta inmune humoral, la producción de anticuerpo IgG2c aumenta considerablemente en comparación con la del anticuerpo IgG1.

La composición de vacuna de la presente invención puede aumentar enormemente el grado de activación de la respuesta inmune mediada por células en lugar de la respuesta inmune humoral en el cuerpo de un sujeto.

Por ejemplo, la composición de vacuna de la presente invención puede aumentar significativamente la producción de citocinas específicas de Th1 (por ejemplo, interferón-gamma (IFN-γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e interleucina-2 (IL-2) en comparación con la producción de citocinas específicas de Th2 (por ejemplo, interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) y similares), en el cuerpo de un sujeto.

Además, por ejemplo, la composición de vacuna de la presente invención es capaz de aumentar considerablemente el número de células que producen simultáneamente dos o más citocinas de IFN-γ, TNF-α e IL-2 que el número de células que producen solo una citocina de las citocinas anteriores, entre las células Th1 activadas.

Además, por ejemplo, la composición de vacuna de la presente invención puede aumentar enormemente la producción de anticuerpos IgG específicos de gE en el cuerpo de un sujeto y, especialmente, puede aumentar considerablemente la producción de anticuerpos IgG2c específicos de gE en comparación con la de anticuerpos IgG1 específicos de gE.

La composición de vacuna de la presente invención puede contener de 5 µg a 100 µg de glicoproteína E en una sola dosis. Por ejemplo, puede contener 5 µg a 80 µg, específicamente 5 µg a 70 µg, muy específicamente 5 µg a 60 µg, y más específicamente 5 µg a 50 µg de glicoproteína E en una sola dosis.

La composición de vacuna de la presente invención puede contener de 7.5 µg a 20 µg, específicamente de 9 µg a 18 µg, muy específicamente, de 9 µg a 16 µg, y más específicamente de 10 µg a 15 µg del adyuvante lipídico de glucopiranosilo en una sola dosis. De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, la composición de vacuna de la presente invención puede contener 13 µg a 17 µg del adyuvante lipídico de glucopiranosilo en una dosis única. Cuando el adyuvante lipídico de glucopiranosilo se incluye en el rango anterior, la respuesta inmune mediada por células puede maximizarse selectivamente.

La composición de vacuna de la presente invención

puede contener de 1 a 7% (v/v), muy específicamente de 1 a 5% (v/v), y más específicamente de 1 a 4% (v/v) del aceite metabolizable en una sola dosis.

Además de la glicoproteína E, el adyuvante lipídico de glucopiranosilo y el aceite metabolizable, la composición de vacuna de la presente invención puede incluir excipientes, portadores farmacéuticamente aceptables y similares. Por ejemplo, la composición de vacuna de la presente invención puede contener solución salina fisiológica o PBS (solución salina de pH regulado con fosfato).

La composición de vacuna de la presente invención se puede formular y envasar en diversas formas. De acuerdo con una modalidad, el primer vial que contiene glicoproteína E pero que no comprende el adyuvante lipídico de glucopiranosilo y el aceite metabolizable, y el segundo vial que contiene el adyuvante lipídico de glucopiranosilo y el aceite metabolizable pero que no comprende glicoproteína E pueden envasarse por separado y mezclarse antes de usar (mezcla de cabecera). De acuerdo con otra modalidad, una composición de vacuna que comprende toda la glicoproteína E, el adyuvante lipídico de glucopiranosilo y el aceite metabólico puede envasarse en un vial, una jeringa (jeringa precargada), o similares.

Descripción detallada de la invención

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos experimentales. Estos ejemplos experimentales solo pretenden ilustrar la presente invención, y el alcance de la presente invención no se limita a los ejemplificados en estos ejemplos experimentales.

Ejemplo experimental 1: Inmunización

Dado que los humanos tienen antecedentes de infección por varicela, para imitar la infección por varicela en ratones, se inyectó por vía subcutánea una vacuna viva atenuada (LAV, 3000 pfu) una vez a ratones C57BL/6 hembra para llevar a cabo la inmunización primaria (cebado de LAV). Después de 28 días desde el cebado de LAV (día 0), se administraron por inyección intramuscular diversas composiciones de vacuna de VZV con o sin inmunógeno o adyuvante de la proteína de VZV para llevar a cabo una inmunización secundaria.

Para medir la respuesta inmune humoral al VZV, se tomaron muestras de sangre una vez en el punto de cebado de LAV, y 28 días y 42 días después (día 0, día 28 y día 42), respectivamente, y se recogieron leucocitos de muestras de bazo 42 días después del cebado de LAV (Día 42) para medir la

CMI (respuesta inmune mediada por células) contra el VZV.

El diseño experimental para la inmunización primaria (cebado de LAV), la inmunización secundaria (inmunización) y la medición de la respuesta inmune se resume como se muestra en la Tabla 1 a continuación. En la Tabla 1 a continuación, gE se refiere a la glicoproteína E de VZV de SEQ ID NO: 1, LAV se refiere a virus vivo atenuado, SLA se refiere al adyuvante lipídico de glucopiranosilo de la Fórmula 1 en donde R^2 y R^4 son alquilo de C_9, y SE se refiere a escualeno. SLA y escualeno se obtuvieron del Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas (Seattle, EE.UU.) y Sigma-Aldrich (San Luis, MO), respectivamente.

El hidróxido de alumbre es hidróxido de aluminio; Addavax® es una nanoemulsión de aceite en agua a base de escualeno; Pam3CSK4 es un agonista de TLR 1/2, una lipoproteína triacilada sintética de número CAS 112208-00-1; poliIC es ácido polinosínico-policitidílico; MPL es lípido de monofosforilo A; y ODN1826 es un ligando TLR9 murino de oligonucleótido CpG de clase B. Además, los días de inmunización, la recolección de muestras de sangre y la recolección de muestras de bazo se calcularon desde el Día 0 como el día del cebado de LAV.

Tabla 1

Grupo	Inmunización primaria (cebado de LAV*)	Inmunización secundaria (Inmunización)		Día de inmunización secundaria	Día de toma de muestra de sangre	Día de toma de muestra de bazo
		Antígeno	Adyuvante			
PBS	solo PBS	X	X	Día 28	Día 0, Día 28, Día 42	Día 42
LAV(1 aplicación)	LAV	solo PBS	X			
LAV(2 aplicación)	LAV	LAV (15,000 pfu)	X			
gE	LAV	gE (5μg)	X			
gE+SLA-AF	LAV	gE (5μg)	SLA (5μg) en formulación acuosa			
gE+SLA-SE	LAV	gE (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
gE+SE	LAV	gE (5μg)	SE (2%)			
gE+liposoma	LAV	gE (5μg)	solo liposoma			
gE+Addavax	LAV	gE (5μg)	Addavax (50%)			
gE+MPL+QuilA	LAV	gE (5μg)	MPL (5μg) + QuilA (5μg)			
gI+SLA-SE	LAV	gI (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
IE63+SLA-SE	LAV	IE63 (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
gB+SLA-SE	LAV	gB (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
gC+SLA-SE	LAV	gC (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
gL+SLA-SE	LAV	gL (5μg)	SLA (5μg) + SE (2%)			
gE+Hidróxido de alumbre	LAV	gE (5 μg)	Hidróxido de alumbre (0.5 mg)			
gE+Addavax	LAV	gE (5 μg)	Addavax (50 μL)			
gE+Pam3CSK4	LAV	gE (5 μg)	Pam3CSK4 (11 μg)			
gE+poliIC	LAV	gE (5 μg)	poliIC (55 μg)			
gE+MPL	LAV	gE (5 μg)	MPL (11 μg)			
gE+flagelina	LAV	gE (5μg)	Flagelina (5.5 μg)			
gE+imiquimod	LAV	gE (5μg)	Imiquimod (55 μg)			
gE+ODN1826	LAV	gE (5μg)	ODN1826 (35μg)			

*Inmunización primaria (cebado de LAV): Dosis 100 μL/cabeza. 3,000 pfu
*Secondary immunization (Inmunización): Dosis 100 μL/cabeza

Ejemplo experimental 2: Métodos experimentales

Ejemplo experimental 2-1: Método para medir el título de IgG específica de antígeno VZV (título de IgG específica de VZV)

Después de llevar a cabo la inmunización primaria y la inmunización secundaria, se llevó a cabo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para medir el título de IgG específica de antígeno de VZV. Una proteína gE recombinante o un antígeno VZV (1 µg/ml) se recubrió en una placa de ELISA y se incubó durante la noche a 4°C. La placa de ELISA se lavó tres veces y el bloqueo se llevó a cabo con una solución de PBS (solución salina de pH regulado con fosfato) que contenía BSA al 2% (albúmina de suero bovino) durante 1 hora. Después de lavar la placa de ELISA, se añadieron muestras de suero diluidas y se incubaron durante 2 horas. Se agregaron anticuerpos anti-IgG, IgG1 o IgG2c de ratón de cabra conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) y fueron incubados durante 1 hora. Después de la incubación final, la placa de ELISA se lavó y la reacción de HRP se indujo mediante la adición de un sustrato de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción de HRP se detuvo agregando una solución de parada ELISA y la densidad óptica (OD) se midió usando un espectrómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo experimental 2-2: Método para medir la respuesta inmune mediada por células específica de antígeno VZV usando el ensayo inmunoestimulación enzimático (ensayo ELISPOT)

Después de llevar a cabo la inmunización primaria y la inmunización secundaria, se llevó a cabo un ensayo ELISPOT (inmunoestimulación ligada a enzimas) de IFN-γ de ratón para confirmar la respuesta inmune mediada por células (VCI) del antígeno VZV. El anticuerpo de captura de IFN-γ (5 μg/ml) se recubrió en una placa ELISPOT y se incubó durante la noche a 4°C. La placa de ELISPOT se lavó 3 veces y el bloqueo se llevó a cabo con un medio que contenía FBS al 10% (suero bovino fetal) durante 1 hora. Después de lavar la placa de ELISPOT, los leucocitos recolectados de los ratones inmunizados y proteína gE, OLP de gE (péptido superpuesto) o un lisado de VZV se agregaron a la misma y se incubaron durante 24 horas para la estimulación de leucocitos. Una vez completada la estimulación con leucocitos, se lavó la placa de ELISPOT y se añadió un anticuerpo de detección de IFN-γ de ratón biotinilado (2 μg/ml) y se incubó. Después de lavar la placa, se añadió estreptavidina-HRP y se incubó de nuevo. Luego, después de lavar la placa de ELISPOT, se añadió una mezcla de sustrato de AEC para inducir una reacción a

temperatura ambiente. La reacción se detuvo lavando la placa ELISPOT con agua y la placa se secó. El número de los puntos resultantes se contaron con un dispositivo.

Ejemplo experimental 2-3: Método para identificar citocinas secretadas por estimulación con antígeno (ensayo CBA)

Después de llevar a cabo la inmunización primaria y la inmunización secundaria, se llevó a cabo un ensayo de CBA (matriz de perlas citométricas) para identificar los tipos de citocinas secretadas por las células T debido a la estimulación del antígeno. Los leucocitos recolectados de ratones se estimularon con proteína gE o un lisado de VZV durante 3 días y se centrifugaron para obtener el sobrenadante, que luego se analizó en busca de citocinas con el kit de CBA Th1/Th2/Th17 de ratón. Siete (7) tipos de perlas de captura de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF e IL-17A), la muestra de sobrenadante y las perlas de detección de citocinas se hicieron reaccionar juntas durante 2 horas, las perlas se lavaron y se determinaron las cantidades de citocinas en el sobrenadante.

Ejemplo experimental 2-4: Método para determinar la distribución de células secretoras de citocinas (ensayo ICS)

Después de llevar a cabo la inmunización primaria y la inmunización secundaria, se midió la secreción de citocinas específicas de Th1 mediante un ensayo ICS (tinción de citocinas intracelular) para confirmar la respuesta inmune mediada por células específicas de antígeno. Los leucocitos recolectados de los ratones se estimularon durante la noche con la proteína gE y, en este momento, también se agregó GolgiStop (BFA)/GolgiPlug (monensina) para evitar que las citocinas de las células se secretaran al exterior. Después de lavar los leucocitos estimulados, la superficie celular de los leucocitos se marcó con anticuerpos (7-AAD, CD3-FITC, CD4-V500) para identificar las células T. Una vez completada la reacción, los leucocitos se lavaron, se permeabilizaron y se sometieron a una reacción con anticuerpos (TNF-α-PE, IFN-γ-APC, IL-2-V450) que pueden unirse a las citocinas para confirmar la presencia de las citocinas en las células. Después de la reacción, los leucocitos se lavaron y se fijaron, y se analizó la distribución de las células que secretan citocinas mediante la estimulación con antígeno.

Ejemplo experimental 2-5: Método para determinar la citocina IFN-γ secretada por la estimulación con antígeno gE (ELISA de IFN-γ)

Después de llevar a cabo la inmunización primaria y

la inmunización secundaria, se llevó a cabo un ensayo ELISA con IFN-γ para determinar la cantidad de secreción de IFN-γ, una citocina efectora típica secretada por células T por estimulación con antígeno. Los leucocitos recolectados de ratones se estimularon con proteína gE o péptido superpuesto a gE durante 3 días y se centrifugaron para obtener el sobrenadante, que luego se analizó con un kit ELISA de IFN-γ de ratón. El anticuerpo de captura de IFN-γ (4 μg/ml) se recubrió en una placa ELISA y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La placa de ELISA se lavó tres veces y el bloqueo se llevó a cabo con PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 1 hora. Después de lavar la placa de ELISA, se añadió el sobrenadante obtenido estimulando leucocitos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa de ELISA, se añadió un anticuerpo de detección de IFN-γ de ratón biotinilado (400 ng/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado, se añadió estreptavidina-HRP y se incubó nuevamente durante 20 minutos. Después de la incubación, la placa de ELISA se lavó y se hizo reaccionar con una solución de sustrato a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de detener la reacción con una solución de parada, la densidad óptica se midió usando un instrumento a 450 nm.

Ejemplo experimental 3: Medición del título de IgG específica de antígeno gE (título de IgG específica de gE)

El título de IgG específica de antígeno gE se midió de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-1, y los resultados del experimento se resumen en las figuras 1 y 2.

Como se muestra en la figura 1, la producción de IgG específica para el antígeno gE aumentó considerablemente en el grupo gE + SLA-SE.

Como se muestra en la figura 2, la producción de IgG2c aumentó considerablemente en el grupo gE + SLA-SE y, especialmente, la producción de IgG2c aumentó mucho en comparación con la de IgG1. En la figura 2, las gráficas de barras en el lado derecho basadas en el eje horizontal "0" representan la producción de IgG2c, y las gráficas de barras en el lado izquierdo representan la producción de IgG1.

Tomando los resultados de las figuras 1 y 2 en consideración, se confirmó que el uso de una composición que comprende gE, SLA y SE incrementó significativamente la producción global de IgG y la producción de IgG2c y, especialmente, aumentó considerablemente la producción de IgG2c en comparación con IgG1. Estos resultados significan que la composición que comprende gE, SLA y SE, que satisface tanto la alta producción de IgG2c como la alta proporción de IgG2c/IgG1, tiene el mayor efecto de prevenir el herpes zóster.

Ejemplo experimental 4: Medición de respuestas inmunes mediadas por células específicas de antígeno gE o VZV (ensayo ELISPOT)

Las respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de proteína gE, OLP de gE o lisado VZV se midieron de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-2 (ensayo ELISPOT de IFN-γ), y los resultados experimentales se resumen en las figuras 3, 4 y 5.

Como se muestra en la figura 3, cuando el número de células T que reaccionaron específicamente con la proteína gE después de la inmunización secundaria se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se puede observar que la cantidad de células T que secretan IFN-γ, una citocina Th1 representativa, aumentó cuando se usó la combinación de gE, SLA y SE (gE + SLA-SE).

Como se muestra en la figura 4, cuando el número de células T específicas para el péptido superpuesto a gE después de la inmunización secundaria se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se puede ver que, de manera similar a los resultados de la figura 3, la composición que comprende gE, SLA , y SE mostró un aumento significativo de CMI específico para el antígeno en comparación con otras composiciones.

Como se muestra en la figura 5, cuando el número de células T específicas para todo el VZV inducido por la estimulación con lisado de VZV después de la inmunización con

el antígeno gE se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se confirmó que la cantidad de células T que segregan citocinas efectoras específicas para todo el VZV, así como el antígeno gE se incrementó por la combinación de gE, SLA y SE.

Tomando los resultados de las figuras 3, 4 y 5 en consideración, se confirmó que la composición que comprende gE, SLA y SE (gE + SLA-SE) puede aumentar al máximo la CMI específica para el antígeno VZV, así como la CMI específica para la gE. Esto significa que la composición de gE + SLA-SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 5: Confirmación de la cantidad de citocinas secretadas por la estimulación con antígenos (ensayo CBA)

La confirmación de las citocinas secretadas por la estimulación antigénica (ensayo CBA) se llevó a cabo de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-3, y los resultados experimentales se resumen en la figura 6. En la figura 6, IFN-g significa IFN-γ.

Como se muestra en la figura 6, varias citocinas Th fueron secretadas por la composición que comprende gE, SLA y SE, y una citocina Th1 representativa, IFN-γ (la cuarta desde el frente), aumentó considerablemente, mientras que la

secreción de citocinas Th2, IL-4 (la segunda desde el frente) e IL-6 (la tercera desde el frente), o la citocina Th17, IL-17A (la sexta desde el frente), fue mínima. Esto significa que la composición que comprende gE, SLA y SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 6: Confirmación de la distribución de células secretoras de citocinas

El ensayo para confirmar la distribución de las células que secretan citocinas por estimulación antigénica (ensayo ICS) se llevó a cabo de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-4, y los resultados del experimento se resumen en la figura 7.

Como se muestra en la figura 7, en el caso del grupo gE + SLA-SE, el número de células T que secretaron simultáneamente dos o más citocinas específicas de Th1 aumentó significativamente (69%), lo que indica que las células T específicas de antígeno de alta calidad fueron inducidas por la inmunización con gE + SLA-SE. Esto significa que la composición que comprende gE, SLA y SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 7: Medición de los títulos de IgG específicos de antígeno VZV (título de IgG específico de glicoproteína anti-VZV)

Se determinaron varios títulos de IgG específicos para el antígeno VZV de acuerdo con el uso de SLA-SE de la misma manera que en el Ejemplo experimental 2-1, excepto que se usó cualquiera de gE, gI, IE63, gB, gC y gL como antígeno en la inmunización secundaria y SLA-SE se usó como adyuvante, y los resultados se resumen en las figuras 8 y 9.

Como se muestra en la figura 8, la producción de IgG específica para el antígeno VZV aumentó significativamente en el grupo gE + SLA-SE.

Como se muestra en la figura 9, la producción de IgG2c aumentó considerablemente en el grupo gE + SLA-SE y, especialmente, la producción de IgG2c aumentó significativamente en comparación con la de IgG1. En la figura 9, las gráficas de barras en el lado derecho basadas en el eje horizontal "0" representan la producción de IgG2c, y las gráficas de barras en el lado izquierdo representan la producción de IgG1.

Tomando los resultados de las figuras 8 y 9 en consideración, se confirmó que el uso de la composición que comprende gE, SLA y SE aumentó significativamente la producción global de IgG y la producción de IgG2c y,

especialmente, aumentó considerablemente la producción de IgG2c en comparación con IgG1. Esto significa que la composición que comprende gE, SLA y SE, que satisfacen tanto la alta producción de IgG2c como la alta proporción de IgG2c/IgG1, tiene el mayor efecto de prevenir el herpes zóster.

Ejemplo experimental 8: Confirmación de la cantidad de citocinas secretadas por la estimulación con antígeno VZV

Se llevó a cabo un experimento (ensayo de CBA) para confirmar las citocinas secretadas por la estimulación antigénica, después de la inmunización, de la misma manera que en el Ejemplo experimental 2-3, excepto que cualquiera de gE, gI, IE63, gB, gC y gL fue usado como antígeno en la inmunización secundaria y SLA-SE como adyuvante, y los resultados se resumen en la figura 10.

Como se muestra en la figura 10, en el caso del grupo gE + SLA-SE, la cantidad de secreción de IFN-γ, una citocina Th1 representativa, aumentó considerablemente. Esto significa que la respuesta inmune mediada por células (CMI) se activó en gran medida, y que la composición que comprende gE, SLA y SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 9: Confirmación de la distribución de células que secretan citocinas específicas del antígeno VZV

Se llevó a cabo un experimento (ensayo ICS) para confirmar la distribución de células T que secretan citocinas efectoras mediante estimulación con antígeno, luego de la inmunización, de la misma manera que en el Ejemplo experimental 2-4, excepto que cualquiera de gE, gI, IE63, gB , gC, y gL se usó como antígeno en la inmunización secundaria y SLA-SE se usó como adyuvante, y los resultados se resumen en la figura 11.

Como se muestra en la figura 11, en el caso del grupo gE + SLA-SE, la proporción de células T $CD4^+$ que secretan citocinas Th1 IFN-γ, IL-2 y TNF-α aumentó significativamente. Esto significa que la respuesta inmune mediada por células (CMI) se activó en gran medida, y que la composición que comprende gE, SLA y SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 10: Identificación de la inmunogenicidad específica de VZV dependiendo de la combinación de antígenos

Para identificar las inmunogenicidades específicas del VZV inducidas cuando se usa el antígeno gE solo y cuando

se usa el antígeno gE en combinación con otro antígeno VZV en el momento de la inmunización secundaria, los títulos de IgG específicos del antígeno VZV y las respuestas inmunes de células T específicas del antígeno VZV se confirmaron de acuerdo con los métodos de los Ejemplos experimentales 2-1 y 2-2, y los resultados experimentales se resumen en la figura 12.

Como se muestra en la figura 12, la respuesta de anticuerpos específicos de VZV y la respuesta de las células T inducidas cuando se usó el antígeno gE solo no fueron significativamente diferentes de las respuestas inmunitarias específicas de VZV inducidas cuando se usó el antígeno gE junto con el antígeno gI o IE63. Esto significa que una composición que comprende gE, SLA y SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 11: Medición de los títulos de IgG específicos de antígeno gE (título de IgG específico de gE)

Los títulos de IgG específicos para el antígeno gE que dependen del uso de diversos adyuvantes se midieron de la misma manera que en el Ejemplo experimental 2-1, excepto que se usó gE como antígeno y cualquiera de SLA-SE, hidróxido de alumbre, Addavax, Pam3CSK4, polyIC, MPL, flagelina, Imiquimod

y ODN1826 se usaron como adyuvantes en la inmunización secundaria, y los resultados se resumen en las figuras 13 y 14.

Como se muestra en la figura 13, la producción de IgG específica de antígeno gE aumentó considerablemente en el grupo gE + SLA-SE, en comparación con otros grupos adyuvantes.

Como se muestra en la figura 14, la producción de IgG2c aumentó mucho en el grupo gE + SLA-SE en comparación con otros grupos de adyuvantes y, especialmente, la producción de IgG2c aumentó significativamente en comparación con la de IgG1. En la figura 14, las gráficas de barras en el lado derecho basadas en el eje horizontal "0" representan la producción de IgG2c, y las gráficas de barras en el lado izquierdo representan la producción de IgG1.

Tomando los resultados de las figuras 13 y 14 en consideración, se confirmó que el uso de la composición que comprende gE, SLA y SE aumentó significativamente la producción global de IgG y la producción de IgG2c. Esto significa que la composición que comprende gE, SLA y SE tiene el mayor efecto de prevenir el herpes zóster.

Ejemplo experimental 12: Medición de respuestas inmunes mediadas por células específicas de antígeno gE o VZV (ensayo ELISPOT)

La proteína gE, la gE OLP o las respuestas

inmunitarias mediadas por células específicas del lisado de VZV se midieron de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-2 (ensayo ELISPOT de IFN-γ), y los resultados experimentales se resumen en las figuras 15, 16 y 17.

Como se muestra en la figura 15, cuando el número de células T que responden específicamente a la proteína gE después de la inmunización secundaria se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se puede observar que la cantidad de células T que segregan IFN-γ, una citocina Th1 representativa, se incrementó significativamente en el grupo gE + SLA-SE en comparación con otros grupos adyuvantes.

Como se muestra en la figura 16, cuando el número de células T específicas para el péptido superpuesto a gE después de la inmunización secundaria se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se puede ver que, de manera similar a los resultados de la figura 15, la composición que comprende gE, SLA, y SE mostró un aumento significativo de CMI específico para el antígeno en comparación con otras composiciones.

Como se muestra en la figura 17, cuando el número de células T específicas para todo el VZV inducido por la estimulación con un lisado de VZV después de la inmunización con antígeno gE se confirmó mediante el ensayo ELISPOT, se confirmó que la cantidad de células T que secretan IFN-γ específico para todo el VZV se incrementó en gE + SLA-SE.

Tomando los resultados de las figuras 15, 16 y 17 en consideración, se confirmó que la composición que comprende gE, SLA y SE puede aumentar al máximo la CMI específica para el antígeno VZV, así como la CMI específica para la gE, en comparación con otras composiciones. Esto significa que la composición de gE + SLA-SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 13: Confirmación de la citocina IFN-γ secretada por el antígeno gE o la estimulación del antígeno VZV (ensayo ELISA de IFN-γ)

Se llevó a cabo un experimento (ensayo ELISA de IFN-γ) para confirmar la citocina IFN-γ secretada por el antígeno gE o la estimulación del antígeno gE OLP de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-5, y los resultados se resumen en las figuras 18 y 19.

Como se muestra en la figura 18, cuando se observó la cantidad de secreción de citocina IFN-γ secretada por la proteína gE después de la inmunización secundaria, se confirmó que la cantidad de secreción de IFN-γ, una citocina efectora Th1 típica, en el grupo gE + SLA-SE se incrementó en comparación con otros grupos de adyuvantes.

Como se muestra en la figura 19, cuando se observó la cantidad de secreción de citocina IFN-γ secretada por la

estimulación del péptido superpuesto con gE después de la inmunización secundaria, se confirmó que la cantidad de secreción de IFN-γ se incrementó mediante la combinación de gE, SLA y SE en comparación con otros grupos adyuvantes.

Tomando los resultados de las figuras 18 y 19 en consideración, la composición que comprende gE, SLA y SE aumentó la cantidad de secreción de una citocina efectora Th1 representativa, en comparación con otras composiciones que contienen adyuvante, y esto significa que la composición de gE + SLA-SE tiene un mayor efecto de prevenir el herpes zóster que otras composiciones.

Ejemplo experimental 14: Determinación de la cantidad óptima de SLA-SE que induce inmunogenicidad específica de VZV

La Tabla 2 resume el diseño experimental para confirmar la cantidad óptima de SLA-SE que puede inducir de manera más efectiva la respuesta inmune mediada por células (CMI) específica para el antígeno VZV. La vacuna viva atenuada (LAV, 3,000 pfu) se inyectó por vía subcutánea una vez a ratones C57BL/6 hembras y, a partir del día 28, se llevó a cabo la inmunización secundaria (inmunización). En el día 56 después de la preparación de LAV, se recolectaron leucocitos de muestras de bazo para confirmar la respuesta

inmune mediada por células (CMI) específica para VZV.

Tabla 2

Grupo	Inmunización primaria (cebado de LAV*)	Inmunización secundaria (Inmunización)		Día de inmunización secundaria	Día de toma de muestra de bazo
		Antígeno	Adyuvante		
PBS	solo PBS	X	X	Día 28	Día 56
gE	LAV	gE (5 μg)	X		
gE + SLA 0.2 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (0.2 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 1 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (1 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 2.5 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (2.5 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 5 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (5 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 7.5 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (7.5 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 10 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (10 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 15 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (15 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 20 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (20 μg) + SE (2%)		
gE + SLA 22.5 μg	LAV	gE (5 μg)	SLA (22.5 μg) + SE (2%)		

*Inmunización primaria (cebado de LAV): Dosis 100 μL/cabeza. 3,000 pfu
*Secondary immunization (Inmunización): Dosis 100 μL/cabeza

La respuesta inmune mediada por células específica de antígeno gE (ensayo ELISPOT de IFN-γ) se midió de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-2, y los resultados del experimento se resumen en la figura 20.

La respuesta inmune mediada por células específica de antígeno VZV (ensayo ELISPOT de IFN-γ) se midió de acuerdo con el método del Ejemplo experimental 2-2, y los resultados

del experimento se resumen en la figura 21.

Tomando los resultados de las figuras 20 y 21 en consideración, se puede ver que la cantidad óptima de SLA para inducir la respuesta inmune mediada por células específica de antígeno VZV está en el rango de 7.5 µg a 20 µg.

REIVINDICACIONES

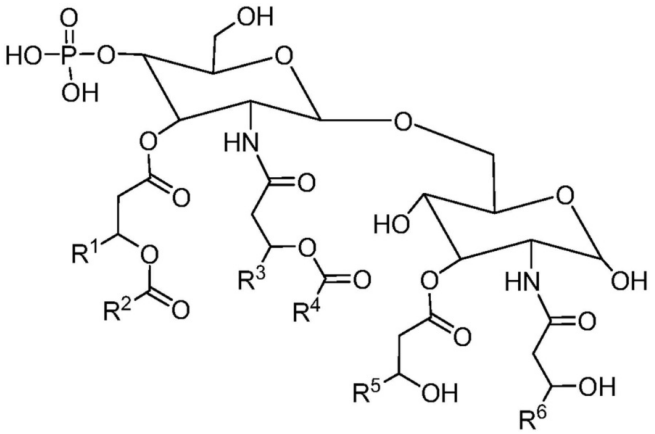
1. Una composición de vacuna contra la varicela o el herpes zóster, que comprende:

glicoproteína E del virus de la varicela zóster;

un adyuvante lipídico de glucopiranosilo de la siguiente fórmula 1; y

un aceite metabolizable:

[Fórmula 1]



en donde,

R^1, R^3, R^5 y R^6 son cada uno independientemente alquilo de C_{10}-C_{12}; y R^2 y R^4 son cada uno independientemente alquilo de C_8-C_{14}.

2. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de la Fórmula 1 en donde R^1, R^3, R^5 y R^6 son alquilo de C_{11}.

3. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de la Fórmula 1 en donde R^2 y R^4 son alquilo de C_{13}.

4. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo es el de la Fórmula 1 en donde R^2 y R^4 son alquilo de C_9.

5. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo está contenido en una cantidad de 7.5 µg a 20 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

6. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 4, en donde el adyuvante lipídico de glucopiranosilo está contenido en una cantidad de 9 µg a 18 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

7. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceite metabolizable es escualeno.

8. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 7, en donde el escualeno está contenido en una cantidad de 1% (v/v) a 7% (v/v) de la composición de vacuna total.

9. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 7, en donde el escualeno está contenido en una cantidad de 1% (v/v) a 4% (v/v) de la composición de vacuna total.

10. La composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 1, en donde la glicoproteína E está contenida en una cantidad de 5 µg a 100 µg en una dosis única de la composición de vacuna.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición de vacuna contra el herpes zóster, que comprende la glucoproteína E del virus de la varicela zóster, un adyuvante lipídico de glucopiranosilo y un aceite metabólico, y aumenta selectivamente una reacción inmune mediada por células sin tener las desventajas de las vacunas vivas atenuadas, por lo que presenta alta seguridad y un alto efecto preventivo contra el herpes zóster.