VARIANTE DE ANTÍGENO DE VIRUS DE VARICELA ZÓSTER Y USO DE LA MISMA

Campo técnico

La presente invención se refiere a una variante de antígeno de virus de varicela zóster y un uso de la misma, y muy particularmente a una variante de antígeno de virus de varicela zóster que tiene un alto nivel de expresión y alta inmunogenicidad, que se selecciona entre las variantes de antígeno de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela zóster, y una composición de vacuna para prevenir o tratar varicela o herpes zóster que comprende la variante de antígeno de virus de varicela zóster como ingrediente activo.

Antecedentes de la invención

El virus de varicela zóster (VZV) es un virus que causa la varicela principalmente en niños y adolescentes. Una vez que se produce la infección, el VZV permanece latente en las células de los ganglios de los nervios craneales y la raíz sensorial durante varios años, y se reactiva y causa herpes zóster en la edad adulta cuando la inmunidad disminuye. La varicela es muy contagiosa; y una vez que ocurre la infección, causa un sarpullido similar a una ampolla en todo el cuerpo con fiebre y malestar. En la mayoría de los niños normales, la varicela rara vez progresa a una condición grave y con el

tiempo progresa a una enfermedad autolimitada. Sin embargo, se sabe que muchos casos en los que la varicela progresa a síntomas graves ocurren en pacientes que han sido sometidos a un trasplante de órganos o quimioterapia (Adriana Weinberg et al., J Infectious Diseases, 200 (7): 1068, 2009; Judith Breuer et al., Expert Review of Vaccines, 2017, DOI: 10.1080/14760584.2017.1394843).

El herpes zóster tiene síntomas iniciales de dolores y molestias en todo el cuerpo, como dolores corporales o sensaciones de picazón, hormigueo y ardor intensos, con un dolor intenso como si lo apuñalaran con un cuchillo. El herpes zóster es una enfermedad en la que se desarrollan ampollas después de unos días, el dolor aumenta a medida que aumentan las lesiones cutáneas y los pacientes mayores tienden a quejarse de un dolor más intenso. Incluso en el caso de que el herpes zóster se cure, puede dejar neuralgia como secuela. Se sabe que en personas de 60 años o más, la neuralgia puede hacer que duerman irregularmente, hacer que se quejen de fatiga crónica, hacer que sientan dolor severo incluso con un contacto leve o fricción, o incluso causar depresión, aunque dicha neuralgia es relativamente rara en adultos de 40 años o menos.

Las vacunas preventivas representativas contra la varicela incluyen productos tales como VARIVAX (Merck & Co, Inc.) y VARILRIX (GlaxoSmithKline Biologicals SA), que se

desarrollaron usando la cepa Oka, una cepa atenuada desarrollada en 1970. En Corea, un producto tal como Suduvax (Green Cross), que se produjo usando la cepa MAV/06 desarrollada en 1980, está comercialmente disponible. Las vacunas vivas comercialmente disponibles en cuestión muestran una eficacia protectora promedio de 80%, lo que significa que la infección ocurre en 20% de los vacunados incluso después de la vacunación. Constantemente se han señalado problemas de estabilidad, tales como la aparición de varicela y herpes zóster provocados por virus vivos contenidos en las vacunas.

ZOSTAVAX (Merck & Co, Inc.), que es una vacuna viva atenuada producida con la cepa Oka, se desarrolló como una vacuna preventiva contra el herpes zóster. Esta vacuna ha sido aprobada y vendida en los E.U.A. y Corea con la condición de que debe usarse para adultos de 50 años o más, no para niños o adolescentes, debido al hecho de que la vacuna contiene una gran cantidad de virus. Recientemente, GlaxoSmithKline Biologicals SA desarrolló una vacuna compuesta por una proteína de superficie viral (gE) y un adyuvante, que está destinada a adultos de 50 años o más, y ha demostrado tener eficacia preventiva en ensayos clínicos (patente de E.U.A. No. 7,939,084, expedida el 7 de enero de 2011).

En las primeras etapas del desarrollo de la vacuna, las células vivas atenuadas o las células muertas se usaron

principalmente como antígenos. Sin embargo, debido a problemas de seguridad y sustancias inmunosupresoras presentes en patógenos, el desarrollo de esos antígenos se está desplazando hacia el desarrollo de antígenos proteicos que tienen una estructura y composición claras y pueden establecer una inmunidad esencial para la defensa contra enfermedades.

Por consiguiente, los inventores de la presente invención han realizado esfuerzos intensivos para desarrollar antígenos proteicos con un alto nivel de expresión en las células hospederas, que pueden contribuir a la mejora de la productividad sin afectar la inmunogenicidad, a partir de los antígenos de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela zóster. Como resultado, los inventores de la presente invención han producido variantes de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster de diversas longitudes y han medido los niveles de expresión de las mismas, identificando así secuencias de aminoácidos específicas con un alto nivel de expresión, entre las variantes de antígeno; y de esta manera haber completado la presente invención.

Descripción de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proveer una variante de antígeno específico que tiene un alto nivel de

expresión y alta inmunogenicidad, que se selecciona entre variantes de antígeno de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela zóster.

Otro objeto de la presente invención es proveer un gen que codifique la variante de antígeno, un vector recombinante que comprenda el gen y una célula hospedera transformada con el vector recombinante.

Otro objeto más de la presente invención es proveer una composición de vacuna para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo.

Otro objeto más de la presente invención es proveer un método para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, usando una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo.

Otro objeto más de la presente invención es proveer un uso de una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo, para la prevención o el tratamiento de varicela o herpes zóster.

Otro objeto más de la presente invención es proveer un uso de una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster.

Solución al problema

Para lograr los objetivos anteriores, en la presente invención, se provee una variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster que se caracteriza porque la variante de antígeno incluye una variación que es el truncamiento del extremo carboxi terminal de cualquier residuo de aminoácido seleccionado entre grupo que consiste en el 525° al 543° residuos de aminoácidos en el antígeno de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela zóster representado por la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 1.

Además, en la presente invención, se provee un gen que codifica la variante de antígeno, un vector recombinante que comprende el gen y una célula hospedera transformada con el vector recombinante.

Además, en la presente invención, se provee una composición de vacuna para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo.

Además, en la presente invención, se provee un método para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, usando una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo.

Además, en la presente invención, se provee el uso

de una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo, para la prevención o el tratamiento de varicela o herpes zóster.

Además, en la presente invención, se provee el uso de una composición de vacuna que comprende la variante de antígeno como ingrediente activo, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un proceso experimental de conformidad con la presente invención.

La Figura 2 ilustra secuencias de aminoácidos de antígenos de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela-zóster de diversas longitudes.

La Figura 3 ilustra los resultados de la transferencia Western realizada para comparar los niveles de expresión de los fragmentos de gE que son antígenos del virus de varicela zóster.

La Figura 4 ilustra los resultados de la transferencia Western realizada para comparar los niveles de expresión de un antígeno de proteína de superficie (GSK gE 546 aa), que está contenido en Shingrix, que es una vacuna contra el virus de varicela zóster fabricada por GlaxoSmithKline

Biologicals SA, y una variante de antígeno (mogam gE 537 aa) producida por los inventores de la presente invención.

La Figura 5 ilustra los resultados del ELISA de IgG específico anti-gE realizado para comparar las respuestas inmunitarias humorales de un antígeno de proteína de superficie (GSK gE 546 aa), que está contenido en Shingrix, que es una vacuna contra el virus de varicela zóster fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals SA, y una variante de antígeno (mogam gE 537 aa) producida por los inventores de la presente invención.

La Figura 6 ilustra los resultados del ELISA de IFN-γ de ratón realizado para comparar las respuestas inmunitarias mediadas por células (CMI) de un antígeno de proteína de superficie (GSK gE 546 aa), que está contenido en Shingrix, que es una vacuna contra el virus de varicela zóster fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals SA, y una variante de antígeno (mogam gE 537 aa) producida por los inventores de la presente invención.

La Figura 7 ilustra los resultados del ELISA de IgG específico anti-gE realizado para comparar las respuestas inmunitarias humorales de los fragmentos de gE que son antígenos del virus de varicela zóster.

La Figura 8 ilustra los resultados obtenidos al realizar un ELISA de IgG específico anti-gE para comparar las

respuestas inmunitarias humorales de los fragmentos de gE que son antígenos del virus de varicela zóster, y luego resumir el número de respondedores que muestran una respuesta de anticuerpos específicos del antígeno.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que son entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a los que compete la presente invención. En general, la nomenclatura usada aquí es bien conocida y comúnmente usada en la técnica.

En la presente invención, para desarrollar antígenos con un alto nivel de expresión en las células hospederas, que pueden contribuir a la mejora de la productividad sin afectar la inmunogenicidad, a partir de los antígenos proteicos del virus de varicela zóster, se realizó un experimento, en el que se produjeron variantes de antígeno de la proteína de superficie (gE) de varias longitudes y luego se midieron los niveles de expresión de las mismas. Como resultado, se identificó que entre las variantes de antígenos de la proteína de superficie del virus de varicela zóster producidas por los inventores de la presente invención, los antígenos representados por secuencias de aminoácidos específicas

presentaban un nivel de expresión más alto que los otros antígenos (Figura 3).

Además, se realizaron la medición del título de anticuerpos (Figura 7) y la medición del respondedor específico de antígeno (Figura 8) para seleccionar variantes de antígeno que tienen alta inmunogenicidad. Como resultado, se identificó que mogam gE 534 aa a gE 540 aa tenían una mayor inmunogenicidad.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, se provee una variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela Zóster que incluye una variación que es el truncamiento del extremo carboxi terminal de cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en el 525° al 543° residuo de aminoácidos en el antígeno de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela Zóster representado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Específicamente, en la presente invención, se provee una variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster que se caracteriza porque la variante de antígeno incluye una variación seleccionada del grupo que consiste en:

a) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 525° residuo de aminoácido;

b) el truncamiento del extremo carboxi terminal del

526° residuo de aminoácido;

c) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 527° residuo de aminoácido;

d) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 528° residuo de aminoácido;

e) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 529° residuo de aminoácido;

f) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 530° residuo de aminoácido;

g) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 531° residuo de aminoácido;

h) el truncamiento de los carboxi terminal del 532° residuo de aminoácido;

i) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 533° residuo de aminoácido;

j) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 534° residuo de aminoácido;

k) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 535° residuo de aminoácido;

l) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 536° residuo de aminoácido;

m) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 537° residuo de aminoácido;

n) el truncamiento del extremo carboxi terminal del

538° residuo de aminoácido;

o) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 539° residuo de aminoácido;

p) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 540° residuo de aminoácido;

q) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 541° residuo de aminoácido;

r) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 542° residuo de aminoácido; y

s) el truncamiento del extremo carboxi del 543° residuo de aminoácido.

La variante antigénica se puede caracterizar porque incluye preferiblemente una variación seleccionada del grupo que consiste en J) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 534° residuo de aminoácido; k) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 535° residuo de aminoácido; l) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 536° residuo de aminoácido; m) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 537° residuo de aminoácido; n) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 538° residuo de aminoácido; o) el truncamiento del extremo carboxi terminal del 539° residuo de aminoácido; y p) truncamiento del extremo carboxi terminal del 540° residuo de aminoácido; sin embargo, la variación no se limita a ello.

SEQ ID NO: 1: mgtvnkpvvg vlmgfgiitg tlritnpvra svlryddfhX$_1$ dedkldtnsv yepyyhsdha esswvnrges srkaydhnsp yiwprndydg flenahehhg vynqgrgids gerlmqptqm saqedlgddt gihviptlng ddrhkivnvd qrqygdvfkg dlnpkpqgqr lievsveenh pftlrapiqr iygvrytetw sflpsltctg daapaiqhic lkhttcfqdv vvdvdcaent kedqlaeisy rfqgkkeadq pwivvntstl fdeleldppe iepgvlkvlr tekqylgvyi wnmrgsdgts tyatflvtwk gdektrnptp avtpqprgae fhmwnyhshv fsvgdtfsla mhlqykihea pfdlllewly vpidptcqpm rlystclyhp napqclshmn sgctftsphl aqrvastvyq ncehadnyta yclgishmep sfglilhdgg ttlkfvdtpe slsglyvfvv yfnghveava ytvvstvdhf vnaieergfp ptagqppatt kpkeitpvnp gtsplX$_2$ryaa wtgglaavvl lclviflict akrmrvkayr vdkspynqsm yyaglpvddf edsestdtee efgnaiggsh ggssytvyid ktr (en donde X$_1$ es T o I, y X$_2$ es L o I).

En la presente invención, la variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster puede caracterizarse porque es una variante de antígeno de la proteína de la superficie del virus de varicela zóster que consta de 534 a 540 aminoácidos, que se deriva del antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster representado por el secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que consta de 623 aminoácidos o una variación que es el truncamiento del extremo carboxi terminal en algunos residuos de aminoácidos. Por ejemplo, como se usa en el presente

documento, el término "variación que es el truncamiento del extremo carboxi terminal del 534° residuo de aminoácido" significa que en la dirección desde el extremo amino terminal (N-terminal) al extremo carboxi terminal (C-terminal), 1° al 534° residuo de aminoácidos permanecen y residuos de aminoácidos contiguos del 535° residuo de aminoácido al etremo carboxi terminal se truncan.

De conformidad con una modalidad específica de la presente invención, el 40° residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es treonina.

De conformidad con una modalidad específica de la presente invención, el 536° residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es la leucina.

En la presente invención, la variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster puede caracterizarse porque está representada por cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 a 8 y las SEQ ID NO: 21 a 23, como sigue:

a) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 534° residuo de aminoácido;

b) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que se obtiene

mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 535° residuo de aminoácido;

c) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 536° residuo de aminoácido;

d) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 537° residuo de aminoácido;

e) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 538° residuo de aminoácido;

f) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 539° residuo de aminoácido;

g) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 540° residuo de aminoácido;

h) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, que se obtiene

mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 525° residuo de aminoácido;

i) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 530° residuo de aminoácido; o

j) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 543° residuo de aminoácido.

La proteína de superficie de la presente invención se deriva de una glicoproteína que constituye la envoltura del virus de varicela zóster derivado del clado 1, y es un fragmento peptídico (proteína truncada) que consta de 534 a 540 aminoácidos que se obtiene por truncamiento de una parte del término carboxi.

Dadas las variaciones de aminoácidos biológicamente equivalentes, se interpreta que la secuencia de aminoácidos usada en la presente invención incluye secuencias que tienen una identidad sustancial con las secuencias de SEQ ID NO: 2 a 8 y SEQ ID NO: 21 a 23. La identidad sustancial antes mencionada significa que en un caso en el que la secuencia de la presente invención como se describió anteriormente y cualquier otra secuencia se alinean para una correspondencia máxima y las

secuencias alineadas se analizan usando un algoritmo comúnmente usado en la técnica, la otra secuencia tiene al menos 70% de homología, muy particularmente 80% de homología, incluso muy particularmente 90% de homología, y muy particularmente 95% de homología con la secuencia de la presente invención mientras tiene la misma función.

En una modalidad de la presente invención, se identificó que la siguiente variante de antígeno tiene alta inmunogenicidad: a) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que se obtiene por truncamiento del extremo carboxi terminal del 534 residuo de aminoácido; b) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 535° residuo de aminoácido; c) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 536° residuo de aminoácido; d) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 537° residuo de aminoácido; e) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 538° residuo de aminoácido; f) una variante de antígeno representada

por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 539° residuo de aminoácido; o g) una variante de antígeno representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, que se obtiene mediante el truncamiento del extremo carboxi terminal del 540° residuo de aminoácido.

En las primeras etapas del desarrollo de la vacuna, las células vivas atenuadas o las células muertas se usaron principalmente como antígenos. Sin embargo, debido a problemas de seguridad, el desarrollo de dichos antígenos se está desplazando hacia el desarrollo de antígenos proteicos que tienen una estructura y composición claras. Sin embargo, los antígenos proteicos son generalmente problemáticos porque tienen baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas convencionales. Desde el punto de vista de ser excelente tanto en estabilidad como de inmunogenicidad y de expresarse a un alto nivel en las células hospederas, la variante de antígeno de conformidad con la presente invención puede usarse eficazmente como vacuna para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster inducidos por el virus de varicela zóster.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un gen que codifica la variante antigénica, un vector recombinante que lo comprende y una célula hospedera transformada con el vector recombinante.

En la presente invención, el gen puede caracterizarse porque está representado por cualquier secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 9 a 15.

Como se usa en este documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está operativamente unida a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de la secuencia de ADN en un hospedero adecuado. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedero adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedero o, en algunos casos, puede integrarse en el genoma mismo. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan a veces de manera intercambiable, ya que un plásmido es actualmente la forma de vector más comúnmente usada. Para el propósito de la presente invención, se prefiere usar un vector plasmídico. Los vectores plasmídicos típicos, que pueden usarse para este propósito, tienen una estructura que incluye (a) un origen de replicación que permite la replicación efectiva de tal manera que se producen varios cientos de vectores plasmídicos por célula hospedera, (b) un gen resistente a antibióticos que permite la selección de una célula hospedera transformada con el vector plasmídico, y (c) un sitio de escisión de enzima de restricción que permite

insertar un fragmento de ADN extraño. Incluso si no existe un sitio de escisión de enzima de restricción apropiado en un vector, el uso de un adaptador o enlazador de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con un método convencional permite la ligación fácil del vector y el ADN extraño.

Como se usa en este documento, el término "vector recombinante" normalmente se refiere a un portador recombinante en el que se inserta un fragmento de ADN heterólogo, estando el portador recombinante generalmente en forma de un fragmento de ADN de doble cadena. Aquí, el ADN heterólogo se refiere a ADN extraño que no se encuentra naturalmente en una célula hospedera. El vector recombinante, una vez en una célula hospedera, puede replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedero, de modo que se pueden producir varias copias del vector y del ADN (heterólogo) insertado en el mismo.

Después de la ligación, el gen o el vector recombinante se transforma o transfecta en una célula hospedera. Para la "transformación" o "transfección", se pueden usar varios tipos de diversas técnicas comúnmente usadas para introducir un ácido nucleico exógeno (ADN o ARN) en células hospederas procariotas o eucariotas, y ejemplos de las mismas incluyen electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y lipofección.

Como es bien conocido en la técnica, para aumentar el nivel de expresión de un gen transfectado en una célula hospedera, el gen en cuestión debe estar operativamente ligado a una secuencia de control de la expresión transcripcional y traduccional que ejerza su función en un hospedero de expresión seleccionado.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la introducción de ADN en un hospedero de modo que el ADN pueda replicarse como un factor extracromosómico o mediante integración cromosómica. Desde luego, debe entenderse que no todos los vectores funcionan por igual en la expresión de la secuencia génica de la presente invención. Del mismo modo, no todos los hospederos funcionan de la misma manera con respecto al mismo sistema de expresión. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden realizar una selección apropiada entre varios vectores, secuencias de control de expresión y hospederos sin apartarse del alcance de la presente invención sin una carga experimental indebida. Por ejemplo, un vector se debe seleccionar teniendo en cuenta un hospedero, porque el vector debe replicarse en él. A este respecto, también se debe considerar el número de copias del vector, su capacidad para regular el número de copias y la expresión de otras proteínas codificadas por el vector.

En la presente invención, la célula hospedera que se

va a transformar se selecciona preferiblemente de, pero no se limita a, el grupo que consiste en células animales, células vegetales, levadura, *E. coli* y células de insectos.

Específicamente, en la presente invención, como microorganismo usado como célula hospedera que se va a transformar, se puede usar cualquier microorganismo siempre que sea un microorganismo no tóxico o atenuado cuando se aplique a un organismo vivo. Ejemplos de las mismas pueden incluir bacterias Gram negativas tales como *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium bovis* y *Shigella*; y bacterias Gram positivas tales como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus*. Un ejemplo preferido del mismo puede incluir bacterias del ácido láctico que son microorganismos comestibles. Sin embargo, el microorganismo no se limita a los mismos.

Las bacterias del ácido láctico pueden incluir *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* y *Bifidobacterium sp.* Ejemplos representativos de *Lactobacillus sp.* pueden incluir *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus casei*; ejemplos representativos de *Streptococcus sp.* pueden incluir *Streptococcus thermophiles*; y

ejemplos representativos de *Bifidobacterium sp.* pueden incluir *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium adolescentis*, siendo más preferido *Lactobacillus casei*. Sin embargo, las bacterias del ácido láctico no se limitan a los mismos.

El microorganismo también puede ser células eucariotas, que incluyen hongos tales como *Aspergillus sp.*, Levaduras tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp.* y *Neurospora crassa*, otras células eucariotas inferiores y células eucariotas superiores tales como células de insectos.

El microorganismo puede derivar de plantas o mamíferos. Ejemplos preferidos de los mismos pueden incluir células de riñón de mono (células COS-7), células NS0, SP2/0, células de ovario de hámster chino (CHO), W138, células de riñón de hámster bebé (BHK), MDCK, líneas celulares de mieloma, células HuT78 y células HEK293, prefiriéndose las células CHO. Sin embargo, el microorganismo no se limita a las mismas.

En otro aspecto más de la presente invención, se provee un método para producir un antígeno del virus de varicela zóster, que comprende una etapa de cultivo de la célula hospedera.

En el caso de que se introduzca un vector

recombinante capaz de expresar el antígeno del virus de varicela zóster en una célula hospedera, el antígeno se puede producir cultivando la célula hospedera durante un período suficiente para permitir que el antígeno se exprese en ella, o muy preferiblemente, durante un período suficiente para permitir que el antígeno se secrete en el medio de cultivo en el que se cultiva la célula hospedera.

En algunos casos, el antígeno expresado puede aislarse de la célula hospedera y purificarse hasta homogeneidad. El aislamiento o purificación del antígeno se puede realizar mediante métodos convencionales de aislamiento y purificación usados para proteínas, por ejemplo, cromatografía. Ejemplos de cromatografía pueden incluir cromatografía de afinidad que incluye columna de proteína A o columna de proteína G, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. El antígeno puede aislarse y purificarse mediante la combinación adicional de filtración, ultrafiltración, desalinización, diálisis y similares, además de la cromatografía anterior.

En otro aspecto más de la presente invención, se provee una composición de vacuna para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, que comprende, como ingrediente activo, la variante de antígeno de virus de varicela zóster.

En otro aspecto más de la presente invención, se

provee un método para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster, usando una composición de vacuna que comprende, como ingrediente activo, la variante de antígeno de virus de varicela zóster.

En otro aspecto más de la presente invención, se provee el uso de una composición de vacuna que comprende, como ingrediente activo, la variante de antígeno de virus de varicela zóster, para la prevención o el tratamiento de la varicela o el herpes zóster.

En otro aspecto más de la presente invención, se provee el uso de una composición de vacuna que comprende, como ingrediente activo, la variante de antígeno, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster.

Como se usa en el presente documento, el término "prevención" significa inhibir la aparición de una condición o enfermedad en un sujeto al que no se le ha diagnosticado la condición o enfermedad y es probable que tenga dicha condición o enfermedad.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" significa (a) inhibir el progreso de una condición o enfermedad, o síntomas de la misma; (b) aliviar una condición o enfermedad, o síntomas de la misma; o (c) eliminar una condición o enfermedad, o síntomas de la misma.

La composición de la presente invención activa una respuesta inmunitaria contra el virus de varicela zóster en un individuo que padece varicela o herpes zóster, que es una enfermedad causada por la infección por el virus de varicela zóster, por lo que actúa para inhibir el progreso, eliminar o aliviar los síntomas de la enfermedad. Por consiguiente, la composición de la presente invención puede ser en sí misma una composición terapéutica para la varicela o el herpes zóster, o puede aplicarse como ayuda terapéutica para la enfermedad que se administra en combinación con otros ingredientes farmacológicos.

Por tanto, en la presente memoria descriptiva, el término “tratamiento” o “agente terapéutico” también incluye el significado de “tratamiento adyuvante” o “ayuda al tratamiento”.

Como se usa en este documento, el término “ingrediente activo” se refiere a una composición de vacuna suficiente para producir un efecto deseado que incluye, pero no se limita a, inducir o aumentar una respuesta inmunitaria contra el virus de varicela zóster en un paciente, prevenir, aliviar o eliminar la reactivación del virus de varicela zóster en un paciente infectado con el mismo virus o al que se le administró una vacuna viva del virus de varicela zóster, previniendo el herpes zóster (HZ) y/o la neuralgia

postherpética (PHN), y disminuyendo la gravedad o duración de HZ y/o PHN. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de dicho efecto deseado puede variar.

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por células (células T) y/o una respuesta de anticuerpos (células B).

La composición de la vacuna de la presente invención es útil para prevenir varicela y/o HZ y/o PHN, o disminuir la gravedad o duración de varicela y/o HZ y/o PHN, en poblaciones de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos que incluyen, pero no lo se limitan a individuos sanos y pacientes inmunodeprimidos que han sido sometidos a un trasplante de células hematopoyéticas (HCT) o trasplante de órganos sólidos (SOT), pacientes infectados por VIH, pacientes con una enfermedad autoinmune e individuos con cáncer de sangre; individuos que son sometidos a quimioterapia para una amplia variedad de cánceres sólidos; y pacientes que son sometidos a terapia inmunosupresora crónica para una amplia variedad de condiciones, que incluyen artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Crohn, psoriasis y esclerosis múltiple.

En la presente invención, la composición de la vacuna se puede caracterizar porque comprende además un vehículo,

excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición de vacuna de la presente invención se puede preparar en una forma de dosificación unitaria formulándose usando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método que puede ser llevado a cabo fácilmente por un experto en la técnica al que compete la presente invención, o puede prepararse en forma de colocarse en un recipiente multidosis. Aquí, la forma de dosificación puede formularse en forma de preparaciones orales tales como polvos, gránulos, tabletas, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes y aerosoles, preparaciones para uso externo, supositorios y soluciones inyectables estériles de acuerdo con métodos convencionales, y usarse. Las formulaciones adecuadas conocidas en la técnica pueden ser las descritas en Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA.

Las preparaciones sólidas para administración oral incluyen tabletas, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas y similares, y estas preparaciones sólidas se preparan mezclándose con al menos un excipiente tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa y gelatina. Además de los excipientes simples, también se usan lubricantes tales como estearato de magnesio y talco para las preparaciones sólidas.

Las preparaciones líquidas para administración oral

incluyen suspensiones, líquidos orales, emulsiones, jarabes y similares, y estas preparaciones líquidas pueden contener varios excipientes tales como agentes humectantes, agentes edulcorantes, fragancias y conservantes, además de agua y parafina líquida que son comúnmente utilizó diluyentes simples.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas y supositorios. Como base para supositorios, se pueden usar Witepsol, Macrogol, Tween 61, grasa de cacao, laurinum, glicerogelatina y similares.

En la presente invención, la composición de la vacuna se puede caracterizar porque comprende además un adyuvante. En general, una respuesta inmunitaria no es fuertemente inducida por un antígeno proteico solo y, por lo tanto, el efecto de la composición de la vacuna aumenta al mezclarse con el adyuvante.

Como se usa en este documento, el término “adyuvante” se refiere a una sustancia que promueve de manera no específica una respuesta inmunitaria a un antígeno en un proceso de activación inicial de células inmunes, incluyendo un agente, una molécula y similares, cada uno de los cuales no es un inmunógeno a un hospedero y potencia la inmunidad aumentando la actividad de las células en el sistema inmunológico (Warren y col., Annu. Rev. Immunol, 4: 369, 1986). El adyuvante usado

en la presente invención, que puede potenciar una respuesta inmunitaria, puede administrarse simultáneamente con la composición de vacuna o puede administrarse secuencialmente en un intervalo de tiempo.

El adyuvante de la presente invención se puede caracterizar porque se selecciona de, pero no se limita a, el grupo que consiste en hidróxido de fosfato cálcico, aceite mineral, escualeno, antagonista del receptor tipo toll (TLR), detergente, liposoma, saponina, citocina y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto más de la presente invención, se provee un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un paciente, que comprende un paso de administrar, al paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna.

Una dosis óptima de la composición de vacuna de la presente invención puede determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de una respuesta inmunitaria adecuada en un sujeto. Después de la vacunación inicial, el sujeto puede someterse a una o varias inmunizaciones de refuerzo a intervalos apropiados.

Una dosis adecuada de la composición de la vacuna de la presente invención varía dependiendo de factores tales como el método de formulación, el modo de administración, la edad

del paciente, el peso, el sexo, la condición patológica, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta, y puede ser determinada apropiadamente por los expertos en la técnica en consideración de los factores anteriormente mencionados.

La composición de vacuna de la presente invención puede administrarse a través de una ruta comúnmente usada en el campo de la medicina. Se prefiere la administración parenteral y la administración puede realizarse, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, oral, intracardíaca, intramedular, intradural, transdérmica, intestinal, subcutánea, sublingual o tópica. En general, la composición de vacuna de la presente invención se puede caracterizar porque comprende, como ingrediente activo, la variante de antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster de conformidad con la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Modo de la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle a modo de ejemplos. Estos ejemplos son sólo con fines ilustrativos y será evidente para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no se considera limitado por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Producción de construcciones de proteína de superficie (gE)

Para producir construcciones de proteína de superficie (gE), se realizó PCR para obtener los fragmentos de gE deseados. Luego, cada uno de los fragmentos de gE se escindió con una enzima de restricción y se insertó en el vector pcDNA3.1. Se identificó una secuencia del fragmento gE insertado en el vector pcDNA3.1 mediante secuenciación. El ADN del vector pcDNA3.1 que comprende el fragmento gE de secuencia identificada se obtuvo mediante midiprep. Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de proteína de superficie (gE) se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Variante de antígeno de gE de VZV	Variación en antígeno de gE de VZV de SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
gE 534 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 534° residuo de aminoácido	2
gE 535 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 535° residuo de aminoácido	3
gE 536 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 536° residuo de aminoácido	4
gE 537 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 537° residuo de aminoácido	5
gE 538 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 538° residuo de aminoácido	6
gE 539 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del	7

	539° residuo de aminoácido	
gE 540 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 540° residuo de aminoácido	8
gE 500 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 500° residuo de aminoácido	16
gE 505 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 505° residuo de aminoácido	17
gE 510 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 510° residuo de aminoácido	18
gE 515 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 515° residuo de aminoácido	19
gE 520 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 520° residuo de aminoácido	20
gE 525 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 525° residuo de aminoácido	21
gE 530 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 530° residuo de aminoácido	22
gE 543 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 543° residuo de aminoácido	23
gE 546 aa	Truncamiento de extremo carboxi terminal del 546° residuo de aminoácido	24

Ejemplo 2: Transfección transitoria

Para identificar los niveles de expresión de los fragmentos de gE, la transfección transitoria de los mismos en células 293 se realizó usando Lipofectamine 3000. 5 x 10^5 células se añadieron a cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se realizó el cultivo. Luego, al día siguiente, se prepararon muestras para transfección. Se añadieron 0.2 µg de ADN y 0.4 µg de P3000 a un tubo y luego se diluyeron con 125 µL de optiMEM; y se añadieron 3.75 µl de Lipofectamine 3000 a otro

tubo y luego se diluyó con 125 µl de optiMEM. El ADN diluido se transfirió al tubo con una cantidad igual de Lipofectamine 3000 diluido. Luego, el tubo se incubó con mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos para preparar una mezcla de ADN-lipofectamina. Después de la terminación de la incubación, la mezcla de ADN-lipofectamina se añadió a la placa de 6 pocillos que contenía células 293, y después el cultivo se realizó en una incubadora con CO_2 durante 2 días. Después de la finalización del cultivo, se obtuvo un sobrenadante, 4x de regulador de pH de muestra que contenía b-mercaptoetanol se añadió al mismo, y después se realizó calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Después de calentar, el resultante se mantuvo congelado hasta que se realizó la transferencia Western.

Ejemplo 3: Transferencia Western

Se realizó una transferencia Western para comparar los niveles de expresión de los fragmentos de gE. Cada muestra se corrió en NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel y luego se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó durante 1 hora en leche desnatada al 5%, se incubó con anticuerpo monoclonal gE (1 µg/mL) durante 2 horas, se lavó con TBST (Tween 0.05%) y luego se incubó durante 1 hora con IgG anti-ratón de cabra. HRP diluido 5000x. La membrana incubada se lavó con TBST y

luego se reveló con sustrato ECL. La detección se realizó con una máquina Chemidoc. Como resultado de realizar una transferencia Western, como se ilustra en la Figura 3, se encontró que los antígenos, gE 534 aa, gE 537 aa y gE 540 aa, presentaban un nivel de expresión más alto.

Ejemplo 4: Comparación, en términos de nivel de expresión, con el antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster de GlaxoSmithKline Biologicals SA

Para comparar, en términos de nivel de expresión, un antígeno de proteína de superficie (GSK gE 546 aa) contenido en Shingrix, que es una vacuna contra el virus de varicela zóster comercializada actualmente de GlaxoSmithKline Biologicals SA, y un antígeno (mogam gE 537 aa) producido por los inventores de la presente invención, la transferencia Western se realizó de la misma manera como se describe en el Ejemplo 3. Las diferencias entre el antígeno de la proteína de superficie (GSK gE 546 aa) contenido en Shingrix de GlaxoSmithKline Biologicals SA y el antígeno (mogam gE 537 aa) producido por los inventores de la presente invención son como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Como resultado de realizar una transferencia Western, como se ilustra en la Figura 4, se encontró que el antígeno producido por los inventores de la presente invención presentaba un nivel de expresión más alto que el antígeno de la proteína de superficie de GlaxoSmithKline Biologicals SA.

Tabla 2

	mogam gE 537 aa	GSK gE 546 aa
Fuente	Clado 1 (tipo silvestre, cepa Dumas)	Clado 3 (tipo silvestre)
40° aminoácido	T	I

536° aminoácido	L	I
C-terminal	sin YAAWTGGLA	YAAWTGGLA

Ejemplo 5: Comparación, en términos de inmunogenicidad, con el antígeno de la proteína de superficie del virus de varicela zóster de GlaxoSmithKline Biologicals SA

Para comparar, en términos de inmunogenicidad, un antígeno de proteína de superficie (GSK gE 546 aa) contenido en Shingrix, que es una vacuna contra el virus de varicela zóster actualmente comercializada de GlaxoSmithKline Biologicals SA, y un antígeno (mogam gE 537 aa) producido por los inventores de la presente invención, se llevó a cabo un experimento con animales. Desde el punto de vista de que los seres humanos tienen antecedentes de infección por varicela, para imitar la infección por varicela en ratones, las hembras de ratón C57BL/6 se sometieron a inmunización primaria (cebado de LAV) inyectándolas por vía subcutánea una vez con una vacuna viva atenuada (LAV. 3,000 pfu). Después de 28 días desde el cebado de LAV (día 0), los ratones se sometieron a inmunización secundaria inyectándolos por vía intramuscular con una composición de antígeno mogam gE o GSK gE con o sin un adyuvante. Se recogieron muestras de sangre 42 días (día 42) después del cebado de LAV para medir una respuesta inmunitaria humoral a gE; y se recogieron leucocitos de muestras de bazo 42 días (día 42) después del cebado de LAV para medir una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) a gE o VZV. El

día de la inmunización y el día de la recolección de muestras de sangre y bazo se calcularon a partir del día de cebado de LAV que se tomó como Día 0. El método experimental con animales general es como se describe en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Grupo	Inmunización primaria (cebado de LAV*)	Inmunización secundaria		Día de la inmunización secundaria	Día de la recolección de muestras de sangre y del bazo
		Antígeno	Adyuvante		
PBS	PBS-solamente	X	X	Día 28	Día 42
LAV	LAV	LAV (15,000 pfu)	X		
gE (GSK)	LAV	gE (5 μg)	X		
gE (mogam)	LAV	gE (5 μg)	X		
gE (GSK) + adyuvante A	LAV	gE (5 μg)	Adyuvante A		
gE (mogam) + adyuvante A	LAV	gE (5 μg)	Adyuvante A		
* Inmunización primaria (cebado de LAV): dosis de 100 μL/cabeza. 3,000 pfu * Inmunización secundaria: dosis de 100 μL/cabeza					

Ejemplo 5-1: Comparación de respuestas inmunitarias humorales

Después de realizar las inmunizaciones primaria y secundaria, se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a

enzimas (ELISA) para medir la potencia de IgG específica del antígeno gE. Proteínas gE recombinantes (1 mg/ml) se dispensaron en placas de ELISA, y la incubación durante la noche se realizó a 4°C para permitir que los antígenos de proteína recubran la misma. Cada una de las placas de ELISA recubiertas con antígeno se lavó tres veces y luego se bloqueó con una solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 2% durante 1 hora. Una vez completada la reacción de bloqueo con BSA, se lavó la placa de ELISA. Luego, se le añadió una muestra de suero diluido y se realizó una incubación durante 2 horas. A la misma se añadió anticuerpo IgG, IgG1 o IgG2c anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se realizó la incubación durante 1 hora. Después de la incubación final, se lavó la placa de ELISA y se indujo la reacción de HRP mediante la adición de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, fabricada por KPL), que es un sustrato de HRP. Luego, se añadió la solución de detención de TMB para detener la reacción de HRP, y se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm usando un lector de microplacas de ELISA (Spectramax 250, Molecular Device) para comprobar la cantidad de anticuerpo producido. Como resultado, como se ilustra en la Figura 5, se demostró que G6 que contenía el antígeno (mogam gE 537 aa) producido por los inventores de la presente invención y un adyuvante

tenía la mayor intensidad de luminiscencia. A partir de estos resultados, se encontró que la respuesta inmunitaria humoral más alta se indujo en G6.

Ejemplo 5-2: Comparación de respuestas inmunitarias mediadas por células

Después de realizar las inmunizaciones primaria y secundaria, se realizó un ELISA de IFN-γ para comprobar la cantidad secretada de IFN-γ, que es una citocina representativa secretada por las células T tras la estimulación con el antígeno. Los leucocitos recolectados de ratones se estimularon con lisado de VZV durante 3 días. Luego, se realizó una centrifugación para obtener un sobrenadante y el sobrenadante se analizó con un kit ELISA de IFN-γ de ratón. Se dispensó anticuerpo de captura de IFN-γ (4 µg/ml) sobre placas de ELISA y se realizó una incubación durante la noche a temperatura ambiente para permitir que el anticuerpo de captura de IFN-γ las recubriera. Cada una de las placas de ELISA recubiertas de anticuerpo se lavó tres veces y luego se bloqueó con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1 hora. Una vez completada la reacción de bloqueo con BSA, se lavó la placa ELISA. A continuación, se le añadió el sobrenadante obtenido tras la estimulación de los leucocitos y se realizó la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez

completada la incubación, se lavó la placa de ELISA y se realizó la incubación con anticuerpo de detección de IFN-γ de ratón biotinilado (400 ng/ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se realizó el lavado y luego se realizó la incubación con estreptavidina-HRP durante otros 20 minutos. La placa de ELISA finalmente incubada se lavó y luego se hizo reaccionar con una solución de sustrato durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una solución de detención para detener la reacción, y luego se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm usando un lector de microplacas de ELISA (Spectramax 250, Molecular Device) para comprobar la cantidad de citocina IFN-γ producida. Como resultado, como se ilustra en la Figura 6, se demostró que G6 que contenía el antígeno (mogam gE 537 aa) producido por los inventores de la presente invención y un adyuvante presentaba la mayor cantidad de citocina IFN-γ. A partir de estos resultados, se encontró que la respuesta inmunitaria mediada por células más alta se indujo en G6.

Ejemplo 6: Identificación de la inmunogenicidad específica de antígeno de fragmentos de antígeno gE

Ejemplo 6-1: Transfección transitoria para la producción de antígenos

Para expresar los fragmentos de gE, se realizó la transfección transitoria de los mismos en células 293 usando

el kit de transfección Expifectamine™ 293. Las células en 2 x 10^6 células/ml se colocaron en un matraz de 125 ml y se cultivaron. Luego, al día siguiente, se realizó la transfección. Las células 293 se diluyeron hasta un total de 25.5 ml a 2.9 x 10^6 células/ml, y se prepararon complejos para la transfección. 30 µg de ADN fue tomada en un tubo de 15 ml y se ajustó a 1.5 ml usando Opti-MEM. De esta forma se preparó el Complejo 1. Se colocaron 81 µl de reactivo ExpiFectamine™ 293 en otro tubo de 15 ml y se ajustó a 1.5 ml usando Opti-MEM. De esta forma se preparó el Complejo 2. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de 5 minutos, el complejo 1 se transfirió al tubo que contenía el complejo 2 y se realizó la mezcla. Luego, el tubo se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para preparar un complejo ADN-lípido. Una vez completada la incubación, se colocó todo el complejo ADN-lípido en el matraz de 125 ml que contenía células 293 y se realizó el cultivo en una incubadora. 20 horas después se realizó el tratamiento con Enhancers. Se colocaron 150 µl de ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 1 en un tubo de 1.5 ml, y se añadió al mismo ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2 a 1.5 ml. Luego, el resultante se añadió a las células 293 y se realizó la incubación en una incubadora durante 5 días. Después de 5 días, se obtuvo el sobrenadante del cultivo, se filtró a través de un filtro de

0.45 µm y se almacenó congelado hasta su purificación.

Ejemplo 6-2: Purificación para obtener antígenos

La solución de cultivo, que se había almacenado congelada, se descongeló y se añadió una cantidad igual de PBS a la solución de cultivo. La filtración se realizó usando un filtro de 0.22 µm y luego se realizó la Cromatografía de Intercambio Aniónico. Al material eluido se añadió NaCl 5 M y se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba. El material eluido que se había sometido a la cromatografía se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y se almacenó congelado hasta que se realizaron los experimentos con animales.

Ejemplo 6-3: Inmunización

Se realizaron experimentos con animales para identificar la inmunogenicidad de los fragmentos de antígeno de gE. Se inyectaron intramuscularmente a ratones hembra C57BL/6 los fragmentos de antígeno de gE en un intervalo de 2 semanas y se recogieron muestras de sangre de los ratones 2 semanas después de la inmunización secundaria. Los sueros se separaron de las muestras de sangre recolectadas y luego se almacenaron congelados hasta que se midió el título de anticuerpos.

Ejemplo 6-4: Medición de la potencia de IgG específica de antígeno y respondedores

Se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir la potencia de IgG específica de antígeno. Se recubrieron placas de ELISA con proteínas de superficie de VZV (1 µg/ml), se realizó una incubación durante la noche a 4°C y se lavó cada una de las placas de ELISA 3 veces. Luego, la placa de ELISA se bloqueó con una solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 2% durante 1 hora. Se lavó la placa de ELISA. Luego, se le añadió una muestra de suero diluido y se realizó una incubación durante 2 horas. A la misma se añadió anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se realizó la incubación durante 1 hora. Después de la incubación final, se lavó la placa de ELISA y se indujo la reacción de HRP mediante la adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que es un sustrato. A continuación, se le añadió una solución de detención de ELISA para detener la reacción de HRP y se midió la densidad óptica (DO) usando un espectrómetro a 450 nm.

Para identificar si una diferencia en la secuencia entre los fragmentos de antígeno de gE causa una diferencia en la inmunogenicidad específica de antígeno, se realizó la inmunización de un animal mediante el método descrito en el

Ejemplo 6-3. El título de anticuerpo específico de antígeno se midió usando sueros obtenidos en los experimentos con animales de acuerdo con el método de medición de título de anticuerpo anterior. Como resultado, como se ilustra en la Figura 7, el valor de DO después de la inmunización con gE 534 aa o gE 543 aa fue mayor que el valor de DO después de la inmunización con gE 500 aa, gE 510 aa, gE 525 aa o gE 546 aa.

Después de la medición del título de anticuerpos, los individuos con un valor de DO de 0.6 o superior se consideraron respondedores y se resumieron los resultados. Como resultado, no hubo respondedor específico de antígeno para gE 500 aa, y el número de respondedores después de la inmunización con gE 510 aa fue el mismo que después de la inmunización con gE 546 aa. El número de respondedores después de la inmunización con gE 525 aa, gE 534 aa, gE 537 aa o gE 540 aa fue mayor que el número de respondedores después de la inmunización con gE 510 aa o gE 546 aa. Es decir, se identificó que gE 525 aa a gE 540 aa presentaban un mayor número de respondedores (Figura 8).

Como resultado, gE 534 aa a gE 543 aa mostraron valores más altos en la medición del título de anticuerpos, y gE 525 aa a gE 540 aa mostraron valores más altos en respondedores específicos de antígeno. Por lo tanto, en un caso en el que se combinen los dos resultados anteriores, se puede

identificar que gE 534 aa a 540 aa muestran mayor inmunogenecidad.

Aplicabilidad industrial

La variante de antígeno de la proteína de superficie (gE) del virus de varicela zóster de conformidad con la presente invención es un antígeno proteico. En el caso de que se use como composición de vacuna, la variante de antígeno presenta una excelente seguridad y un alto nivel de expresión en las células hospederas en comparación con una vacuna de virus vivo. Por lo tanto, dicha variante de antígeno es útil como vacuna para prevenir o tratar la varicela o el herpes zóster inducidos por el virus de varicela zóster.

Como se indicó anteriormente, se han descrito en detalle partes específicas de la presente invención. Sin embargo, es evidente para los expertos en la técnica que dicha descripción específica es solo para ilustrar las modalidades preferidas, y el alcance de la presente invención no se limita a las mismas. Por consiguiente, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.