



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 698**

51 Int. Cl.:
A61K 39/04 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06700223 .8**
96 Fecha de presentación : **05.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1833507**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Composición para inmunizar contra Mycobacterium.**

30 Prioridad: **05.01.2005 GB 0500102**
03.02.2005 US 649804 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.09.2011

73 Titular/es: **ISIS INNOVATION LIMITED**
University Offices, Wellington Square
Oxford OX1 2JD, GB

72 Inventor/es: **Mcshane, Helen;**
Pathan, Ansar A.;
Hill, Adrian y
Gilbert, Sarah C.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 698 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para inmunizar contra *Mycobacterium*

La presente invención hace referencia a una composición inmunogénica para su uso en la prevención de infección o enfermedad micobacteriana induciendo una respuesta inmune de células T de memoria central que persiste durante al menos un año. También se proporcionan vacunas vectorizadas que son capaces de inducir una respuesta inmune que persiste durante al menos un año.

Antecedentes para la Invención

La tuberculosis está causada por el patógeno respiratorio *Mycobacterium tuberculosis* y mata dos millones de personas cada año, predominantemente en el mundo en desarrollo (<http://www.who.int/gtb/publications/globrep01/index.html>). La vacuna autorizada sólo contra *M. tuberculosis*, bacilo Calmette-Guerin (BCG) (Calmette, A., C. Guerin. (1924) Ann. Inst. Pasteur. 38:371), es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que en los países en desarrollo se administra típicamente intradérmicamente como una dosis única para niños recién nacidos. La revisión de muchos estudios sugiere que la vacunación contra BCG es protectora contra tuberculosis meningíticas pediátricas y formas sistémicas de la enfermedad. Sin embargo, la eficacia protectora es variable (oscilando desde 0 hasta 80%) (Colditz, G. A. y cols. (1994). JAMA 271:698) contra enfermedad pulmonar de adultos, la causa global principal de mortalidad por tuberculosis y declina con el tiempo (Sterne, J. A. y cols. (1998) Int. J. Tuberc. Pulmón Dis. 2:200). Las bases de la variabilidad son inciertas. Aun así, el 80% de bebés por todo el mundo reciben BCG cada año (http://www.who.int/inf-fs/en/fact_104.html).

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular, la eficacia protectora contra el cual está asociada con el mantenimiento de una respuesta mediada por células contra una infección que implica tanto células T CD4+ como células T CD8+ y la capacidad para responder con citocinas de tipo Th1, particularmente IFN- γ (Flynn, J. L., J. Chan. (2001) Annu. Rev. Immunol. 19:93). La vacunación contra BCG induce células T secretoras de IFN- γ , predominantemente del fenotipo de las células T CD4+, que reaccionan de forma cruzada con proteínas de *M. tuberculosis* (Launois P y cols., (1994) Infection and Immunity 62 (9): 3679-87). Los estudios recientes sugieren que BCG administrado parenteralmente puede fallar para inducir respuestas inmunes a células T en la mucosa del pulmón, lo que puede ser crítico para la protección contra la enfermedad pulmonar.

Existe por lo tanto la necesidad de desarrollar vacunas adicionales contra enfermedad micobacteriana.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que los vectores víricos que expresan antígeno micobacteriano 85A (Ag85A) pueden inducir una respuesta inmune de células T de memoria central en un paciente humano cuando se administra como una composición inmunógena. Por lo tanto un primer aspecto de la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un vector de poxvirus no replicativo o con su capacidad para replicarse dañada que expresa el producto de traducción de un gen micobacteriano Ag85A para su uso en la prevención de infección micobacteriana o enfermedad micobacteriana induciendo una respuesta inmune de células T de memoria central en un paciente, en la que el vector viral expresa Ag85A con una marca en el extremo C-terminal de PK, una secuencia líder de TPA, y una truncación C-terminal de 10-20 aminoácidos y en la que dicha respuesta inmune persiste durante al menos un año. El primer aspecto de la presente invención también proporciona el uso de una composición inmunógena que comprende un vector de poxvirus no replicativo o con su capacidad para replicarse dañada que expresa el producto de traducción de un gen micobacteriano Ag85A en la elaboración de un medicamento para la prevención de una infección micobacteriana o enfermedad micobacteriana en un paciente induciendo una memoria central de células T de respuesta inmunitaria en el paciente, en la que el vector viral expresa Ag85A con una marca en el extremo C-terminal de PK, una secuencia líder de TPA y una truncación C-terminal de 10-20 aminoácidos y en la que dicha respuesta inmune persiste durante al menos un año. Preferentemente, la composición inmunógena es una vacuna. Este enfoque de vacuna nuevo mejora significativamente la magnitud y la duración de la respuesta inmune de células T.

El antígeno 85A (Ag85A) (N.ºs de Acceso CAA17868 y BX842584) es un miembro del complejo Ag 85. Ésta es una familia de proteínas que comprende Ags 85A, 85B y 85C secretados por *M. tuberculosis*, BCG, y muchas otras especies de micobacterias (Harth, G. y cols., (1996) Infect. Immun. 64: 3038-3047). El antígeno 85A (Ag85A) está altamente conservado entre todas las especies micobacterianas y es inmunodominante en estudios de animales y de seres humanos. Ag 85A (Ag85A) está codificado por el gen *fbpA*. El antígeno 85A (Ag85A) de *Mycobacterium tuberculosis* se enumera en SEC ID N.ºs 1 y 2 en el presente documento).

Estrategias recientes para inducir respuestas de células T potenciadas en investigación de la vacuna de la tuberculosis han aprovechado tecnología de ADN recombinante, utilizando vectores plasmídicos, bacterianos o víricos y proteínas recombinantes para expresar antígenos de *M. tuberculosis*. La vacunación de ratones con ADN de Ag85A reforzado con un vector de MVA que expresa Ag85A ha mostrado proporcionar un grado de protección equivalente a BCG tras puesta a prueba con *M. tuberculosis* (McShane, H. y cols., (2002). Infect. Immun. 70: 1623-1626). Sin embargo, las respuestas inmunitarias generadas por inmunización individual o repetida con el vector de MVA recombinante solo fueron débiles. Las vacunas dotadas de vectores que expresan el antígeno Ag85A han

estado mostrando inducir respuestas inmunes a corto plazo (McShane, H. y cols. (2004) *Nature Medicine*, 10; 1240-1244 y Malin, A., y cols. (2000) *Microbes and Infection*, 2; 1677-1685).

Para la protección a largo plazo contra enfermedad micobacteriana tal como tuberculosis se considera importante mantener "células T de memoria", que pueden continuar estimulando inmunidad protectora por décadas.

- 5 Las respuestas inmunes de memoria se atribuyen de forma clásica a la reactivación de linfocitos T específicos de antígeno, de larga vida que surgen directamente de células T efectoras diferenciadas y persisten en un estado quiescente uniforme. Se piensa que las células T efectoras y de memoria están distribuidas por todos los tejidos del cuerpo, particularmente en las superficies epiteliales (tales como la piel y el intestino), donde es probable que se reencuentren los patógenos. Se ha encontrado que las células T de memoria son heterogéneas y que comprenden
- 10 al menos dos subgrupos, dotados con diferente capacidad migratoria y función efectora (Reinhardt, R.L. y cols., (2001) *Nature*. 410, 101-105). Las células del primer subgrupo se asemejan a las células efectoras generadas en la respuesta principal porque ellas carecen de los receptores que los dirigen a regresar a los nódulos linfáticos L-selectina y CCR7 y porque expresan receptores para migración al interior de los tejidos inflamados. Tras en reencuentro con el antígeno, estas "células T de memoria efectoras" (TEM) pueden producir rápidamente IFN- γ o IL-4 o liberar la perforina pre-almacenada. Las células del segundo subgrupo expresan L-selectina y CCR7 y carecen de función efectora inmediata. Estas "células T de memoria central" (TCM) tienen un umbral de activación bajo y después de reestimulación en los órganos linfoides secundarios, proliferan y se diferencian a efectoras (Iezzi, G. y cols., (2001). *J. Exp. Med.* 193, 987-994).

- 20 Los inventores de la presente invención han encontrado que un vector viral dañado de replicación que expresa Ag 85 A (Ag85A) (en este caso, ejemplificado con "MVA85A") puede inducir niveles elevados de células T de memoria que segregan interferón- γ específicas de antígeno -tanto células T de memoria efectoras como células T de memoria centrales- cuando se usan solo en voluntarios sanos que no están inmunizados contra BCG.

- 25 Se han establecido durante los últimos 10 años nuevos ensayos inmunológicos para medir y cuantificar respuestas de células T. Los autores de la presente invención utilizaron el ensayo ELISPOT de interferón gamma (IFN- γ) como la principal lectura de salida inmunológica para ensayos clínicos con MVA85A, debido a que la secreción de IFN- γ desde las células T específicas de antígeno es el mejor correlato disponible de protección contra *M. tuberculosis*. Además, el ensayo ELISPOT es un procedimiento muy reproducible y sensible de cuantificar el número de células T específicas de antígeno que segregan IFN- γ .

- 30 Los inventores de la presente invención utilizaron dos ensayos de ELISPOT: el ensayo de ELISPOT *ex-vivo* (recién preparado), en el que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se incuban durante 18 horas con antígeno para determinar los niveles plasmáticos de células T efectoras circulantes CCR7- y el ensayo de ELISPOT cultivado, en el que PBMC se incuban con antígeno durante 10-14 días para medir niveles plasmáticos de células T de memoria centrales de CCR7+ (Godkin y cols., *Jl*, 2002).

- 35 Los inventores de la presente invención han descubierto que la vacunación con MVA85A induce una memoria central fuerte de células T de respuesta específica para antígeno 85A (Ag85A) que es aún detectable 3 semanas después de la vacunación, cuando la respuesta de células T efectoras circulantes es casi indetectable.

Esta es la primera demostración de que la población de células T de memoria centrales de largo plazo puede potenciarse significativamente en un paciente por la administración de una composición inmunógena que expresa un antígeno micobacteriano.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "célula T de memoria" se desea para incluir tanto las subpoblaciones de células T CCR7- (células T de memoria efectoras) como las subpoblaciones de células T CCR7+ (células T de memoria centrales). Esta definición incluye también tanto células T de memoria CD4 restringidas por las moléculas de MHC de clase II como las células T de memoria CD8 restringidas por las moléculas de MHC de clase I. Preferentemente, las células T de memoria inducidas por las vacunas vectorizadas de la invención se caracterizan por expresión en superficie celular de CCR7+. Éstas se refieren para el presente documento como
- 45 células T de memoria centrales.

- Preferentemente, la respuesta de células T de memoria indicada por las composiciones inmunógenas de la invención es una respuesta de células T protectora. Una respuesta inmune protectora puede medirse por inmunoensayo de secreción de IFN- γ , preferentemente desde las células T específicas de antígeno.
- 50 Preferentemente, las respuesta de células T de memoria es de duración larga y persiste durante al menos 1 año. Preferentemente, la respuesta de células T de memoria persiste durante al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25 ó más años. Más preferentemente, la respuesta inmune protectora es para toda la vida.

El gen Ag85A está expresado en un vector de poxvirus no replicativo o de replicación dañada.

- 55 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una vacuna vectorizada que comprende un vector de poxvirus no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N.º: 4, y que incluye adicionalmente una marca del extremo C-terminal de PK y una secuencia líder de TPA, en la que dicha vacuna vectorizada es capaz de inducir una respuesta inmune que persiste

durante al menos un año. El término "vacunas vectorizadas" se conoce bien en la técnica. El término "no replicativo" o "con la replicación dañada" como se usa en el presente documento quiere decir incapaz de replicación en cualquier grado significativo en la mayoría de las células humanas normales. Virus que son no replicativos o dañados en la replicación pueden haber llegado a ser así de forma natural (es decir pueden aislarse como tales de la naturaleza) o artificialmente por ejemplo por cría *vitroo* por manipulación genética, por ejemplo por delección de un gen que sea importante para la replicación. Habrá generalmente uno o unos pocos tipos celulares en los que los virus puedan cultivarse, tales como células CEF para virus Ankara modificados (MVA). En general, el vector viral debería ser capaz de estimular una respuesta de células T.

Ejemplos de vectores virales que son útiles en este contexto son vectores de virus vaccinia tales como MVA o NYVAC. Un vector viral preferido es la cepa de vaccinia MVA o una cepa derivada de MVA. Alternativas a vectores de vaccinia incluyen otros vectores de poxvirus que incluyen vectores de avipox tales como vectores de la viruela aviar o de vectores de la viruela de los canarios. Particularmente adecuado como un vector de avipox es una cepa de la viruela de los canarios conocida como ALVAC (comercialmente disponible como Kanapox) y las cepas derivadas de ALVAC y también una cepa de la viruela aviar conocida como FP9.

Se prefiere que el vector viral sea incapaz de causar una infección grave en el paciente humano.

La replicación de un virus se mide generalmente en dos formas: 1) Síntesis de ADN y 2) valoración viral. De forma más precisa, el término "no replicativo o de replicación dañada" como se usa en el presente documento y como se aplica a poxvirus quiere decir virus que satisfacen uno de los dos o ambos de los siguientes criterios:

1) presentan una reducción logarítmica de 1 (10 veces) en síntesis de ADN comparadas con la cepa Copenhague de virus vaccinia en células MRC-5 (una línea celular humana);

2) presentan una reducción logarítmica de 2 en valoración viral en células HELA (una línea celular humana) comparadas con la cepa Copenhague de virus vaccinia.

Ejemplos de poxvirus que están dentro de esta definición son virus MVA, NYVAC y avipox, mientras que un virus que está fuera de la definición es la cepa de vaccinia atenuada M7.

La invención también proporciona el uso de una composición inmunógena que comprende un vector de poxivirus no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de un gen Ag85A micobacteriano en la elaboración de un medicamento para la prevención de una infección o enfermedad micobacteriana en un paciente induciendo una respuesta inmune de células T de memoria central en el paciente, en el que el vector viral expresa Ag85A con una marca del extremo C-terminal de PK, una secuencia líder de TPA y una truncación C-terminal de 10-20 aminoácidos, en el que dicha respuesta inmune persiste durante al menos un año. Preferentemente la composición inmunógena es una vacuna vectorizada. La composición inmunógena y la vacuna vectorizada actúan induciendo una respuesta inmune de las células T en el paciente.

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para evitar la infección) o post-exposición (es decir para tratar después de la infección pero antes de la enfermedad).

Las enfermedades micobacterianas que se pueden evitar por la vacuna vectorizada de la presente invención incluyen; tuberculosis, lepra, infección con *Mycobacterium avium*, infección micobacteriana no tuberculótica, úlcera de Buruli, infección o enfermedad con *Mycobacterium bovis*, infección o enfermedad relacionada con *Mycobacterium paratuberculosis*. Otras enfermedades (es decir, enfermedades no micobacterianas) incluyen enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, enfermedad autoinmune, cáncer, cáncer de vejiga, viruela y viruela de los monos. Se pueden usar construcciones de vectores virales especializados para facilitar la preparación y utilidad de la vacuna vectorizada. Las vacunas vectorizadas que comprenden estas construcciones virales están también abarcadas como aspectos de la invención.

El antígeno Ag85A está truncado en su parte C-terminal por 10-20 aminoácidos. Esto puede tener el efecto de facilitar clonación y construcción de la vacuna vectorizada y alternativamente o adicionalmente, puede conducir a eficacia incrementada. Los procedimientos para truncación serán conocidos por aquellos de habilidad en la técnica. El modo más simple para llevar a cabo truncaciones de este tipo es usar las diversas técnicas bien conocidas de ingeniería genética para eliminar selectivamente la secuencia ácidos nucleicos codificante en cada extremo del gen de antígeno y después insertar la secuencia de codificación deseada dentro del vector viral. Por ejemplo, se crearon truncaciones de la proteína candidata usando estrategias de exonucleasa 3' y/o 5' selectivamente para desgastar los extremos 3' y/o 5' del ácido nucleico codificante, respectivamente. Preferentemente, la secuencia de genes de tipo silvestre está truncada de tal forma que el antígeno expresado está truncado en 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos en relación al antígeno parental. Lo más preferentemente, el gen del antígeno es Ag85A que está truncado en 15 aminoácidos en el extremo C-terminal en relación al antígeno Ag85A de tipo silvestre (SEC ID N.º: 3, el producto de expresión de la SEC ID N.º: 4).

Los antígenos adecuados para usar en la invención también incluyen fragmentos del antígeno parental, siempre y cuando esos fragmentos tengan un determinante antigénico o epitopo en común con o sean inmunológicamente identificables con el antígeno parental. Los polinucleótidos que codifican estos fragmentos son también adecuados

para usar las composiciones inmunogénicas y las vacunas vectorizadas de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma como parte, pero no toda, de la secuencia de aminoácidos del antígeno parental del que se deriva o uno de sus equivalentes funcionales. Los fragmentos deberían comprender al menos *n* aminoácidos consecutivos desde la secuencia y, dependiendo de la secuencia particular, *n* preferentemente es 7 ó más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ó más). Small forma un determinante antigénico.

Los genes antigénicos también pueden codificar las variantes de los equivalentes funcionales del antígeno parental. Una molécula de ácidos nucleicos tal puede ser una variante que se da en la naturaleza tal como una variante alélica, o la molécula puede ser una variante que no se conoce que se dé en la naturaleza. Tales variantes que no se dan en la naturaleza de la molécula del ácido nucleico pueden hacerse por técnicas de mutagénesis, incluyendo aquellas aplicadas a moléculas de ácidos nucleicos, células u organismos.

Entre las variantes a este respecto son variantes que difieren de las secuencias génicas de antígenos anteriormente mencionadas por sustituciones, deleciones o inserciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o inserciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden alterarse en regiones codificantes o no codificantes o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o inserciones aminoácidas conservadoras o no conservadoras.

Además del uso de una truncación génica, el gen que codifica el antígeno Ag85A comprende un ácido nucleico que codifica una marca polipeptídica tal que esta está unida covalentemente al antígeno tras la traducción. El polipéptido de marca es una marca de PK. La marca de PK tiene preferentemente la secuencia Pro-Asn-Pro-Leu-Gly-Leu-Asp. Una marca de este tipo puede facilitar la detección de expresión de antígeno y de clones que expresan el antígeno y alternativamente o adicionalmente, puede conducir a aumentos en la eficacia.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de tag se coloca de tal forma que, tras la traducción, la marca está localizada en el extremo C-terminal del antígeno expresado. Los nucleótidos que codifican una secuencia de engarce se pueden insertar entre el ácido nucleico que codifica la marca polipeptídica y el ácido nucleico que codifica el antígeno expresado. Preferentemente, la secuencia de engarce, cuando se expresa comprende los aminoácidos Gly-Ser-Ile.

El gen que codifica el antígeno Ag85A incluye también una secuencia líder de TPA (activador del plasminógeno tisular) (Malin A.S. y cols. (2000) *Microbes Infect.* 2000 Nov.; 2 (14): 1677-85). La secuencia líder puede afectar el procesamiento del transcrito primario a ARNm, la estabilidad de ARNmR o la eficacia de traducción del ARNm. Preferentemente, la secuencia líder potencia expresión y/o inmunogenicidad del antígeno. La inmunogenicidad potenciada puede determinarse a través por ejemplo de ensayos *ex vivo* de ELISPOT. Un nivel potenciado de expresión puede determinarse por ejemplo usando un anticuerpo monoclonal para detectar la cantidad de proteína producida. Preferentemente, la expresión y/o inmunogenicidad está potenciada dos veces, tres veces o más cuando se compara con el antígeno expresado sin la secuencia líder.

El vector viral de la invención expresa una secuencia truncada en su parte C-terminal de Ag85A condensada a una secuencia líder de TPA y a una secuencia de marca de PK. Preferentemente, la secuencia líder está condensada al extremo N-terminal del antígeno. En una realización especialmente preferida, la construcción del vector viral comprende un polinucleótido que codifica Ag85a (Ag85A) truncado en su extremo C-terminal por 15 aminoácidos condensados con una secuencia de TPA y con una marca de PK C-terminal de secuencia Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp en la que los residuos aminoácidos Gly-Ser-Ile están presentes entre la secuencia Ag85A y la marca de PK (SEQ ID N.º: 5). Preferentemente, el producto de expresión del vector viral tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6.

Se ha encontrado que el efecto protector de las células T destacado por los autores de la presente invención es particularmente potente en pacientes humanos que han estado previamente expuestos a un antígeno micobacteriano. Las estrategias de inmunización iniciada-reforzada heteróloga inducen niveles más altos de respuestas de células T efectoras en animales y seres humanos que se refuerzan de forma homóloga con la misma vacuna (Schneider, J. y cols. (1998) *Nat. Med.* 4, 397-402, McShane, H. y cols. (2001) *Infect. Immun.* 69, 681-686).

El mecanismo que subyace a la pérdida gradual de efectividad de BCG a medida que el individuo (inoculado neonatalmente) alcanza 10 a 15 años de edad se comprende escasamente. Una suposición posible es que la inmunidad generada por BCG ha desaparecido y el individuo llega a ser equivalente a un huésped no inmunizado que puede vacunarse con una vacuna candidata nueva diseñada para inducir inmunidad primaria. Aunque la vacunación repetida con BCG no parece mayor potenciar la protección contra TB (ref. Rodrigues L y cols., *Lancet* 2005), incorporar BCG en un régimen iniciado-reforzado de forma heteróloga retendría los efectos protectores de BCG. La inmunogenicidad y la eficacia protectora de estimular BCG con vectores virales que expresan antígeno 85A (Ag85A) en varios modelos animales se ha documentado previamente (Goonetilleke, N.P. y cols. (2003) *J. Immunol.* 171, 1602-1609; Williams A y cols. *Infection and Immunity* (73 (6): 3814-6), pero no se documentó la inducción de una respuesta de células T de memoria protectoras.

Por lo tanto, la invención también proporciona la composición o el uso de acuerdo con el primer aspecto o con la

vacuna vectorizada de acuerdo con el segundo aspecto en el que el vector viral expresa adicionalmente el producto de traducción de al menos un gen antigénico adicional de una especie micobacteriana.

5 La invención también proporciona la composición o el uso del primer aspecto de la presente invención en el que la composición inmunogénica es para administración con al menos un antígeno adicional y/o antimicrobiano. La vacuna vectorizada y el/los antígeno(s) micobacteriano(s) pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. Por ejemplo, el/los antígeno(s) micobacteriano(s) puede(n) administrarse para iniciar al paciente antes o después de la administración de la vacuna vectorizada para reforzar la respuesta inmune del paciente a la vacuna vectorizada. Además, la invención también proporciona la composición inmunogénica o el uso del primer aspecto de la presente invención, en el que el paciente se ha pre-expuesto al menos a un antígeno micobacteriano.

10 El antígeno de las micobacterias puede ser de *M. tuberculosis* y/o puede ser de una o más micobacterias distintas tales como *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum* y/o *M. ulcerans*. Donde los pacientes han estado pre-expuestos a sólo un antígeno, el antígeno puede ser un antígeno que confiere una respuesta inmune protectora contra infección micobacteriana. En una realización de la invención, el antígeno al que el paciente se ha pre-expuesto no es Ag85A.

15 Alternativa o adicionalmente, el paciente puede haberse pre-expuesto a una o más micobacterias por sí mismo. Por ejemplo, la pre-exposición de un paciente a al menos un antígeno micobacteriano puede comprender la exposición anterior a *M. tuberculosis*. Alternativamente o adicionalmente, la pre-exposición de un paciente a al menos un antígeno puede comprender la exposición anterior a micobacterias ambientales tales como *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum* y/o *M. ulcerans*.

20 Preferentemente, el paciente está infectado de forma latente con las micobacterias. Por ejemplo, el paciente puede haber estado pre-expuesto a *M. tuberculosis* y estar infectado de forma latente con tuberculosis. Donde el medicamento es para el tratamiento de un paciente que está infectado de forma latente con las micobacterias, el tratamiento erradica preferentemente la infección micobacteriana.

25 Alternativa o adicionalmente, la pre-exposición puede comprender vacunación neonatal o pre-vacunación con BCG. Los autores de la presente invención han encontrado que en los voluntarios que habían sido vacunados previamente con BCG y que recibieron una dosis de refuerzo de la vacuna vectorizada de la presente invención, se indujeron niveles sustancialmente más altos de células T secretoras de interferón- γ y en las 24 semanas después de la vacunación estos niveles fueron 5-30 veces mayores que en las vacunas administradas en una vacunación contra BCG única.

30 El paciente puede exponerse a al menos un antígeno micobacteriano y la respuesta inmune puede reforzarse por administración de una composición de refuerzo que comprende una composición inmunógena de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

En una realización de la invención, donde el paciente no está pre-expuesto a sólo un antígeno micobacteriano, el antígeno es un antígeno que confiere una respuesta inmune protectora, pero no es Ag85A.

35 La pre-exposición puede tener lugar a cualquier edad, por ejemplo, neonatalmente, durante la infancia, durante la adolescencia o durante la edad adulta. Preferentemente, el paciente se expone neonatalmente a al menos un antígeno micobacteriano.

40 La administración de una composición inmunógena puede tener lugar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más semanas o 0,25, 0,5, 0,75, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 o más años después de pre-exposición a al menos un antígeno micobacteriano. Preferentemente, donde tiene lugar pre-exposición cuando el paciente está en la infancia, la administración de la composición inmunógena se lleva a cabo durante la infancia o la adolescencia.

45 Cuando se administra más de una dosis de una composición de refuerzo al paciente, las más de una dosis se pueden administrar durante un corto periodo de tiempo o durante un largo periodo de tiempo. Por ejemplo, la dosis de composición de refuerzo puede administrarse durante un periodo de horas, días, semanas, meses o años. Por ejemplo, la segunda dosis de refuerzo puede administrarse entre 0,5 y 24 horas después de la primera dosis de refuerzo, entre 1 día y 7 días después de la primera dosis de refuerzo, entre 1 semana y 1 mes después de la primera dosis de refuerzo, entre 1 mes y 6 meses después de la primera dosis de refuerzo, entre 6 meses y 1 año después de la primera dosis de refuerzo, o entre 1 a 2, 2 a 5, 6 a 10, o más de 10 años después de la primera dosis de refuerzo. Estos intervalos de tiempo preferentemente se aplican también cambiando lo que haya que cambiar al periodo entre cualesquiera dosis subsiguientes.

50 Además de la respuesta inmune inducida frente al antígeno 85a (Ag85A), el vector viral puede estimular una respuesta de células T específicas de vector. La administración de la vacuna vectorizada de la invención puede promover respuesta inmune de células T contra el virus del que se deriva el vector viral. Por ejemplo, el uso de un vector MVA en la vacuna vectorizada de la invención promueve una respuesta inmune de células T contra el virus vaccinia. Preferentemente, esta respuesta de células T es una respuesta de células T protectoras. Un efecto de este tipo no se ha comunicado previamente y es claramente ventajoso porque la vacuna vectorizada tiene un papel dual; primeramente en proteger contra enfermedades micobacterianas, y segundo en proteger contra una enfermedad

mediada por virus relacionados con el vector. En el caso del vector MVA, una enfermedad tal es smallpox.

Las enfermedades derivadas de virus que se pueden tratar o evitar por la vacuna vectorizada de la presente invención estarán claras para aquellos de habilidad en la técnica; los ejemplos incluyen viruela, viruela de los monos e infección por vaccinia diseminada.

- 5 Así, una respuesta inmune de células T se puede inducir contra un antígeno micobacteriano y un virus administrando una composición inmunógena de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la respuesta inmune de células T es una respuesta inmune de células T de memoria.

10 Las vacunas de la invención administran una cantidad inmunológicamente efectiva de al menos un antígeno a un paciente. Por 'cantidad inmunológicamente efectiva', se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratarse, la edad, la capacidad del sistema inmune de los individuos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del doctor que está atendiendo al individuo de la situación médica y otros factores relevantes. Es de esperar que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio de tiempo que pueda determinarse por ensayos de rutina.

15 El vector viral puede expresar adicionalmente el producto de traslación de al menos un gen de antígeno adicional que se pueda usar para inducir una respuesta inmune específica de antígeno contra tales antígenos adicionales. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune de las CD8+, de las CD4+ y/o de anticuerpos. Preferentemente, los uno o más genes de antígeno adicionales se deriva(n) de fuentes de *M. tuberculosis*, *Plasmodium sp*, virus influenza, VIH, virus de la *Hepatitis C*, *Cytomegalovirus*, virus del papiloma humano, malaria, parásitos leishmania o, preferentemente, cualquier *Mycobacterium spp*. Preferentemente, los uno o más genes de antígenos adicionales codifican un antígeno seleccionado desde el grupo constituido por; un antígeno de la familia del antígeno 85 de cualquier micobacteria o cualquier antígeno expresado por *Mycobacterium spp.*; más preferentemente uno o más antígenos de latencia tales como el antígeno de 16 kDa o hemaglutinina de unión a heparina (HBHA) o ESAT6 o la proteína de condensación conocida como 72F.

20 También se prevé que el antígeno adicional puede derivarse endógenamente de tal manera que la respuesta inmune inducida se dirija contra un tumor. Antígenos derivados endógenamente que son adecuados para usar con la presente invención son; proteínas de choque térmico humanas y antígenos asociados con tumores tales como CEA, PSA, Muc-1, Her2neu.

30 El vector viral puede estar diseñado para expresar el gen Ag85A y los uno o más genes de antígenos adicionales como una cadena de epitopos. Ventajosamente, los epitopos en una cadena de múltiples epitopos están unidos juntos sin secuencias que intervengan de tal forma que se evita material de ácidos nucleicos y/o material de aminoácidos. La creación de la cadena de epitopos puede lograrse preferentemente usando una construcción de ADN recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena de epitopos, con el ADN codificando el Ag85A en la misma fase de lectura en la que el ADN codifica el/los antígeno(s) adicionales(s). Alternativamente, el Ag85A y el/los antígeno(s) adicionales(s) pueden expresarse como polipéptidos separados.

35 En este aspecto de la invención, el al menos un antígeno adicional se expresa para la prevención de al menos una enfermedad adicional en un paciente.

40 De acuerdo con este aspecto de la invención, la vacuna vectorizada puede usarse para proteger tanto contra enfermedad micobacteriana, como contra una o más enfermedades seleccionadas del grupo constituido por VIH, malaria y viruela a través de la inducción de una respuesta inmunitaria de células T en un paciente humano, preferentemente una respuesta inmune de células T de memoria.

45 Aunque la vacuna vectorizada de la presente invención puede usarse en aislamiento, puede combinarse también con otros regímenes de vacunación o terapéuticos para tratar o evitar una enfermedad adicional. Por lo tanto, así como proporciona las vacunas vectorizadas según se describen anteriormente, la invención proporciona una composición que comprende una vacuna vectorizada de la invención y uno o más antígenos o epitopos adicionales derivados de un agente que causa enfermedades.

50 Antígenos y epitopos adecuados para su uso en las composiciones de la invención pueden ser de origen bacteriano o viral. Los antígenos adecuados pueden clasificarse adicionalmente como antígenos proteicos, antígenos de carbohidratos o antígenos glucoconjugados. Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos o epitopos adicionales. Son ejemplos:

- un antígeno o epitopo micobacteriano diferente.
- un antígeno o epitopo de VIH.
- un antígeno o epitopo de Plasmodium.
- un antígeno o epitopo de malaria.

- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae*.
- un antígeno proteico de *S.pneumoniae* (por ejemplo desde PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133).
- un antígeno o epitopo del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado.
- 5 - un antígeno o epitopo del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o de núcleo.
- un antígeno o epitopo del virus de la hepatitis C.
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* de tipo b.
- antígeno(s) de polio o epitopos tales como en IPV.
- vacuna de difteria o sus epitopos constituyentes o antígenos o toxoide.
- 10 - vacuna del tétanos o sus epitopos constituyentes o antígenos o toxoide.
- antígenos o epitopos de sarampión, paperas y/o rubéola.
- antígeno(s) o epitopos de gripe tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa. El antígeno gripal puede seleccionarse a partir de una cepa pandémica, por ejemplo, a partir de gripe aviar, por ejemplo, cepa H5N1.
- 15 - un antígeno o epitopo desde *Staphylococcus aureus*.
- un antígeno o epitopo de cáncer.

Cuando se utiliza un antígeno sacarídico, está preferentemente conjugado a un vehículo con el fin de potenciar inmunogenicidad. Los antígenos proteicos tóxicos pueden detoxificarse donde sea necesario por ejemplo por medios químicos y/o genéticos.

- 20 Los antígenos sacarídicos están preferentemente en forma de conjugados. Las proteínas transportadoras preferidas para conjugados son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoide de difteria o toxoide tetánico. El mutante CRM197 de toxina diftérica es un vehículo particularmente preferido, ya que es un toxoide diftérico. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis*, péptidos sintéticos, proteínas de choque térmico, proteínas de pertussis, citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento,
- 25 proteínas artificiales que comprenden epitopos de células T CD4+ humanos múltiples a partir de diversos antígenos derivados de patógenos tales como la proteína N19, la proteína D de *H. influenzae*, la proteína pneumocócica de superficie PspA, la pneumolisina, las proteínas de captación de hierro, toxina A o B de *C. difficile*, etc.

- Antígenos adicionales en la composición estarán presentes típicamente a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para facilitar una respuesta inmune contra ese antígeno.
- 30

- Como alternativa a usar antígenos de proteínas adicionales en la mezcla, se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno. Los componentes de proteína de la mezcla pueden reemplazarse así por ácidos nucleicos (preferentemente ADN por ejemplo en forma de un plásmido) que codifican la proteína. De forma similar, las composiciones de la invención pueden comprender proteínas que imitan antígenos sacarídicos por ejemplo mimotopos o anticuerpos antiidiotípicos.
- 35

Además, la invención también proporciona una composición que comprende una vacuna vectorizada de la invención y uno o más compuestos antimicrobianos. Ejemplos de antimicrobianos adecuados para usar en las composiciones de la invención son compuestos quimioterapéuticos antituberculosos tales como rifampicina, isoniazida, etambutol, pirizinamida, etc.

- 40 La presente memoria descriptiva revela un procedimiento de elevar una respuesta inmune de células T contra al menos un antígeno en un paciente humano que comprende la etapa de administrar una vacuna vectorizada que comprende un vector viral no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de un gen Ag 85 A (Ag85A) micobacteriano, en combinación con al menos un antígeno y/o producto antimicrobiano adicional, al paciente.

- 45 La presente invención puede usarse para inducir o potenciar una diversidad de respuestas inmunes, como se describe anteriormente. En particular, es un objetivo de esta invención identificar un medio efectivo de inmunizar contra las enfermedades en las que las micobacterias están implicadas. Tales enfermedades incluyen Enfermedad de Hansen, tuberculosis, osteomielitis, Enfermedad de Crohn, lepra, linfadenitis, enfermedad de Johne.

- Los aspectos anteriormente descritos de la invención son aplicables a una diversidad de pacientes diferentes, incluyendo por ejemplo, niños, pacientes que tienen VIH, SIDA, están inmunocomprometidos/inmunosuprimidos, o
- 50

que han sufrido trasplantes de órganos, trasplantes de médula ósea o que sufren de inmunodeficiencias genéticas. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el paciente puede ser un niño (por ejemplo un infante o niño entre 1-5 años), un niño mayor o un adolescente; donde la vacuna es para uso terapéutico, el paciente es preferentemente un adulto. Una vacuna destinada a niños puede administrarse también a adultos por ejemplo para valorar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende (1) una composición inmunógena de la invención y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El compuesto farmacéutico puede prepararse usando un procedimiento, que comprende las etapas de: (i) preparar una vacuna vectorizada de la invención; y (ii) mezclar la composición inmunógena con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Vehículo (2) puede ser cualquier sustancia que no induzca por sí misma la producción de anticuerpos dañinos para el paciente que recibe la composición, y que pueda administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. Tales vehículos se conocen bien por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH, y similares, pueden estar presentes también en tales vehículos. Los agentes estabilizadores, tales como trehalosa o sustancias que permitan formación de cristales de azúcar solubles en agua a temperatura ambiente pueden estar presentes también. Lo último incluye el uso de tecnología de estabilización de vidrio soluble mezclada en formato de microesferas suspendidas en líquidos de perfluorocarbono. Los liposomas son también vehículos adecuados. Una discusión minuciosa de vehículos farmacéuticos está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª ed., ISBN: 0683306472.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también utilizarse preventivamente por ejemplo en una situación donde se espera contacto con microbios y donde se está evitando el establecimiento de infección. Por ejemplo, la composición puede administrarse antes de la cirugía.

La composición farmacéutica es preferentemente estéril. Está preferentemente libre de pirógeno. Está tamponada preferentemente a entre pH 6 y pH 8, generalmente a alrededor de pH 7. Preferentemente, la composición es sustancialmente isotónica con seres humanos.

Las composiciones de la invención puede administrarse por medio de una diversidad de diferentes vías. Ciertas vías puede favorecerse para ciertas composiciones, según den como resultado la generación de una respuesta más efectiva, o según sea menos probable que induzcan efectos secundarios, o según sean más fáciles para administración.

Por ejemplo, las composiciones utilizadas en esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías incluyendo, pero no limitadas a, aplicaciones orales, intravenosas, intramusculares, intra-arteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicas o transcutáneas, medios subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, intravaginales o rectales. Las composiciones pueden estar preparadas para administración intranasal, como pulverizador nasal, gotas nasales, gel o polvo, como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden estar preparadas formas sólidas adecuadas para solución en, o de suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se lleva a cabo generalmente por inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, intranasalmente, o se administra al espacio intersticial de un tejido. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

Diversos aspectos y realizaciones de la presente invención se describirán ahora en más detalle a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras:

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Respuestas medianas de ELISPOT de IFN- γ después de la vacunación en cada grupo de vacunación: BCG solo; MVA85A solo; inicio de BCG-refuerzo de MVA85A. (a) cronología para vacunaciones (semanas) en cada grupo; (b) respuestas de derivado de proteína purificada (PPD) de tuberculina ; (c) respuestas de proteína antígeno 85 (Ag85A) purificada (d) respuestas de péptidos almacenados sumadas; (e) para cada uno de los tres antígenos medidos, las respuestas entre cada grupo de la vacuna en cada punto temporal se compararon usando estadística de Mann-Whitney. Se indican las comparaciones estadísticamente significativas; (f) presentación de epitopos de células T después de refuerzo con MVA en individuos vacunados con BCG. Todas las respuestas de péptidos individuales se quedaron sin efecto completamente por agotamiento de células T CD4+;

Figura 2: Respuestas de ELISPOT cultivadas en rastreo de sangre a PPD de M. tb; PPD de M. avium y antígeno

recombinante 85A (Ag85A); desde 4 voluntarios en el estudio de MVA85A solo, antes de proceder a la vacunación; cada voluntario está identificado por un código TXXXXXX, donde las tres primeras X corresponden al número de ensayo y las tres últimas X corresponden al número de voluntario, por ejemplo, T002022 significa que T002 es número de ensayo y 022 es número de voluntario;

- 5 Figura 3: Las respuestas de ELISPOT de cultivos ("cultivo" marcado) y *ex vivo* a reservas de péptidos Ag85A (marcadas con letras mayúsculas) en cinco voluntarios (identificado cada uno por un código TXXXX, donde XXXX es un número de cuatro dígitos, correspondiendo el dígito uno al número de ensayo y correspondiendo los dígitos dos, tres y cuatro al número de voluntario, por ejemplo T2003 significa que T2 es el número de ensayo y 003 es el número de voluntario (T2 es la misma que T002 en la Figura 2 anterior) tres semanas después de la administración de una inmunización con MVA85A única. Las respuestas post-vacunación son muy altas y son más altas que las respuestas pre-vacunación. Los voluntarios no se vacunaron previamente con BCG;

Figura 4: Seguimiento de respuestas de células T a MVA-Lac-z usado como el antígeno en un ensayo de ELISPOT *ex vivo* en voluntarios sanos inmunizados con MVA-85A una vez en la semana 1.

Los voluntarios se han vacunado previamente con BCG;

- 15 Figura 5 (a) respuestas de ELISPOT medianas a PPD, antígeno recombinante 85A (Ag85A) y reservas de péptido de Antígeno 85A (Ag85A) sumadas después de una vacunación individual con MVA85A en sujetos infectados de forma latente con *M. tb*;

Figura 5(b) Comparación de respuestas de péptidos almacenados de Antígeno 85A (Ag85A) sumadas inducidas por MVA85A en sujetos iniciados con BCG (T005, es decir, ensayo 5; ver ejemplo 1) y sujetos infectados de forma latente por *M. tb* (T007, es decir, ensayo 7);

Figura 5 (c) Comparación de respuestas a Antígeno 85A (Ag85A) recombinante inducidas por MVA85A en sujetos iniciados con BCG (T005) y sujetos infectados de forma latente por *M. tb* (T007);

Figura 6a: Persistencia de las respuestas inmunes inducidas MVA85A durante al menos 1 año después de la vacunación en un grupo de sujetos con un intervalo largo entre inicio (BCG) y refuerzo (MVA85A);

- 25 Figura 6(b): Persistencia de las respuestas inmunes inducidas por MVA85A durante al menos 1 año después de vacunación en un grupo sujeto con un intervalo corto (1 mes) entre inicio (BCG) y refuerzo (MVA85A);

Figura 7(a) Falta de correlación entre intervalo entre vacunación de BCG y de MVA85A y 1 semana después de MVA85A respuestas de células T a reservas de péptidos sumadas de antígeno 85A (Ag85A);

- 30 Figura 7(b) Falta de correlación entre intervalo entre vacunación de BCG y vacunación de MVA85A y 24 semanas después de respuestas de células T a reservas de péptidos sumados de antígeno 85A (Ag85A);

La Figura 8a muestra niveles medios de IFN- γ después de la vacunación; la Figura 8b muestra niveles medios de IFN- γ tras la vacunación; la Figura 9(a) muestra respuestas de ELISPOT IFN- γ *ex vivo* a MVA85A en voluntarios del Reino Unido que no están inmunizados contra BCG; y la Figura 9(b) muestra respuestas de ELISPOT IFN- γ *ex vivo* a MVA85A en voluntarios de Gambia que no están inmunizados contra BCG.

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1

La vacuna de MVA85A

- La construcción de MVA85A se ha descrito previamente (McShane, H. y cols. (2002) *Infect. Immun.* 70, 1623-1626). Se produjo MVA85A de grado clínico para estándar de buenas prácticas por Impfstoffwerke Dessau-Tornau. Se emitió un Certificado de Exención de Médicos y Dentistas de la Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, Londres, para el uso de MVA85A en ensayos clínicos.

Ensayos clínicos

- Se reclutaron voluntarios para estudios de inmunización con protocolos aprobados por el Oxfordshire Research Ethics Committee e inscritos sólo después de obtener consentimiento informado por escrito. El intervalo de edad para inclusión fue 18-55 y todos los voluntarios puestos a prueba fueron seronegativos para VIH, VHB y HCV en rastreo. Se realizaron hematología y bioquímica de laboratorio de rutina antes de la vacunación y todos los valores estuvieron dentro de los límites normales. Todos los voluntarios se investigaron durante 6 meses, con muestras de sangre tomadas a puntos temporales regulares. Aquellos que recibieron inmunizaciones de MVA85A completaron una tarjeta diaria registrando efectos secundarios locales y sistémicos y temperatura corporal durante siete días tras la vacunación.

Vacunaciones

Los primeros dos estudios se llevaron a cabo en voluntarios sanos no inmunizados contra BCG según se determinó usando la prueba de Heaf. La prueba de Heaf implica situar derivado de proteína purificada (PPD) de tuberculina sobre la piel y después usar una pistola para la producción de punciones múltiples. Una reacción positiva es más de 4 pápulas en los sitios de punción en 72 horas. Una prueba de la piel positiva es indicativa de infección de tuberculosis activa o de vacunación contra BCG anterior. Voluntarios con una prueba de Heaf negativa (Grado 0) (equivalente a un ensayo de piel de tuberculina de 0 mm) se vacunaron bien con BCG (una sola inmunización con cepa Glaxo de BCG, 100 µl administrada intradérmicamente, n = 11) o bien con MVA85A (5×10^7 ufp administradas intradérmicamente, 2 inmunizaciones dadas separadas por 3 semanas, n = 14). En el tercer estudio, se inscribieron los voluntarios que se habían vacunado previamente con BCG (n = 17). El tiempo mediana entre la vacunación con BCG y la inmunización con MVA85A fue de 18 años (intervalo 0,5-38 años). Voluntarios con una prueba de Heaf no mayor de grado II (equivalente a un ensayo cutáneo de tuberculina de <15 mm) en fuerza se incluyeron en el estudio y se inmunizaron con una dosis única de 5×10^7 ufp de MVA85A intradérmicamente en la piel que recubre el deltoides en el brazo contralateral para vacunación con BCG. En total, se vacunaron 31 voluntarios sanos con MVA85A. 11 de los 14 voluntarios no inmunizados contra BCG recibieron 2 inmunizaciones, dadas separadas 3 semanas. Los 3 que quedaban recibieron una inmunización individual. Todos los 17 voluntarios iniciados con BCG recibieron una única inmunización de MVA85A. Todos los voluntarios completaron el periodo de seguimiento de 6 meses y no hubo eventos adversos serios o graves en ninguno de estos estudios.

Medidas de inmunogenicidad

La medida inmunológica principal usada determinando la inmunogenicidad de las vacunas fue el ensayo de ELISPOT de IFN- γ ex vivo. Esto se realizó en sangre tomada en los siguientes puntos temporales: en el rastreo antes de la prueba cutánea de tuberculina, y después a 1, 4, 12 y 24 semanas después de la vacunación. Estas medidas se llevaron a cabo en tubos de PBMC recién preparados usando PPD de tuberculina (20 µg/ml, SSI), complejo de antígeno purificado 85 (Ag85A) (10 µg/ml) y 7 reservas de 9-10 péptidos 15-meros, solapándose en 10 aminoácidos (concentración final de 10 µg/ml de cada péptido en pocillo de ELISPOT). Brevemente, 300.000 PBMC por pocillo en 100 µl de R10 (RPMI más suero de ternero fetal al 10%) se plaquearon directamente sobre la placa de ELISPOT (MAIP S4510, Millipore) en la presencia de antígeno y se incubaron durante 18 horas. Estreptoquinasa (250 U/ml)/estreptodornasa (12,5 U/ml) y fito-hemaglutinina (10 µg/ml) se usaron en todos los ensayos como controles positivos. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y los resultados se promediaron.

Mapeo de epitopos

Se probaron respuestas a péptidos individuales para la primera muestra o para la muestra subsiguiente después de la vacunación. Se llevaron a cabo agotamientos de perlas magnéticas (Dynal) en las respuestas de péptidos individuales. Se llevaron a cabo agotamientos de células T CD4⁺ y CD8⁺ por incubación de 30 minutos con anticuerpos monoclonales para CD4 y CD8 conjugados a perlas ferrosas en una proporción de 5 perlas: 1 célula usando M-450 (Dynal, Oslo, Noruega) en 200 µl de R10 sobre hielo. Se retiraron células recubiertas de anticuerpos usando un imán (Dynal). Se analizaron las muestras de acuerdo con grupos no agotados, agotados en células T CD4⁺ y agotados en células T CD8⁺. Los agotamientos celulares se confirmaron por escaneo de FACS y fueron siempre >90% para células T CD8⁺ y >97% para células T CD4⁺ (datos no mostrados).

Análisis de inmunogenicidad

Los datos de ELISPOT se analizaron sustrayendo el número promedio de manchas en el medio y pocillos de control solos de células a partir de cuentas promedio de manchas en pocillos con antígenos o reserva de péptidos y células. Se despreciaron las cuentas de menos de 5 manchas/pocillo. Un pocillo se consideró positivo si la cuenta fue al menos el doble que en los pocillos de control negativo y al menos 5 manchas más que los pocillos de control negativo. Para los pocillos de reserva de péptidos, los resultados se sumaron a través de todas las reservas de péptidos para cada voluntario en cada punto temporal. Por ejemplo, donde hay 7 reservas de péptidos, cada una de ellas conteniendo 9-10 péptidos, cada es reserva se puso a prueba por duplicado. Se calcula la media de este duplicado para cada reserva y se resta la media del pocillo del control negativo, dando el resultado para esa reserva. Los resultados para las 7 reservas individuales se añadieron conjuntamente después. Esto contará potencialmente dos veces una célula T que responda a cualquiera de las regiones solapantes 10-meros que aparezcan en dos reservas con péptidos adyacentes.

Análisis estadístico

El análisis de varianza para medidas repetidas usando el resultado de línea base rastreando como una covariable se realizó en datos transformados logarítmicos comparando entre grupos. Una prueba de Mann-Whitney se usó después para todas las comparaciones entre grupos y se usó un ensayo de Wilcoxon para la comparación por parejas de rastreo y muestras de 24 semanas en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A.

Procedimiento de ELISPOT cultivado

Para ELISPOT cultivado, 1×10^6 PBMC criopreservados se estimularon con 20 µg/ml de PPD de *M. tb* ("PPD-T"), PPD de *M. avium* ("PPD-A") o 10 µg/ml de antígeno recombinante 85A (Ag85A) en una placa de 24 pocillos. Después de un periodo de incubación de 3 días a +37°C en atmósfera de CO₂ al 5% se retiraron 500 µl del

sobrenadante de cultivo celular y se reemplazaron con 5 UI/ml de Lymphocult-T (Biotest, Dreieich, Alemania) en R10. Esto se repitió en el día 7. En el día 9 las células se lavaron tres veces y se dejaron reposar durante toda una noche a +37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en R10. En el día 10, las células se lavaron y resuspendieron en 2 ml de R10, 50 µl de células cultivadas (2,5 x 10⁴ de las células plaqueadas inicialmente) se transfirieron a pocillos por duplicado de una placa de ELISPOT y se estimularon durante 18 horas con 20 µg/ml de PPD-T, 20 µg/ml de PPD-A y 10 µg/ml de Ag85A. La placa de ELISPOT se desarrolló después como se describe anteriormente.

Resultados

La inmunización con MVA85A fue segura y bien tolerada (Tabla 1). Se comparó la cinética y la magnitud de la respuesta específica de células T específica de antígeno inducida por la vacunación con BCG solo, por MVA85A solo y por inicio con BCG-refuerzo con MVA85A. Los tres regímenes de vacunación inducen respuestas inmunes significativas usando bien PPD-T, bien proteína antigénica 85 (Ag85A) o bien péptidos solapantes de antígeno 85A (Ag85A) como antígeno en los ensayos (Tabla 2, Figura 1). Hubo un efecto principal significativo de vacuna en el PPD-T (F = 3,624; P = 0,037), antígeno 85 (Ag85A) (F = 16,605; P < 0,001) y grupo peptídico antigénico 85A (Ag85A) almacenado sumado (F = 39,982; P < 0,001). La inmunización con BCG indujo niveles moderados de células T secretoras de IFN-γ específicas de antígeno, que alcanzaron su máximo 4 semanas después de la inmunización (Tabla 2, Figura 1b-d). Las respuestas a los péptidos antigénicos 85A (Ag85A) almacenados fueron notablemente débiles tras la vacunación con BCG (Figura 1d). Sólo 4 de los 11 voluntarios respondieron a cualquiera de las 7 reservas de péptidos en el ensayo de ELISPOT ex vivo. Estas reservas de péptidos fueron todas atribuibles a péptidos 12, 13, 27 y 28, y se abolieron completamente por agotamiento de células T CD4+.

Tabla 1: Eventos adversos solicitados después de inmunización con MVA85A. No hubo diferencias ni en la frecuencia ni en la gravedad de eventos adversos entre los grupos no inmunizados contra BCG y los grupos iniciados con BCG.

	Acontecimiento adverso	N.º de sujetos (n = 31)
Locales	Enrojecimiento	31
	Prurito	31
	Dolor	30
	Induración.	31
Sistémicos ^a	Fiebre ^b	5
	Similar a la gripe	11
	Artralgia	10
	Dolor de cabeza	11
	Mialgia	12
	Náuseas	3
	Síncope vaso-vagal	1 (historial anterior de ataques vaso-vagales)
	Alteraciones hematología/bioquímica	en 0

^aTodos los síntomas sistémicos se resolvieron en el plazo de 7 días^b

Intervalo 37,7-38,1°C; todos se resolvieron espontáneamente en 24 horas

En voluntarios no inmunizados con BCG, una única inmunización con MVA85A indujo niveles elevados de células T secretoras de IFN-γ específicas de antígeno IFN-γ que alcanzaron su máximo 7 días después de la vacunación en 13/14 voluntarios, (Tabla 2, Figura 1b-c). Durante 4 semanas esta respuesta ha caído a un nivel justo por encima de la línea base. No se vio efecto de refuerzo de la segunda vacunación con MVA85A, administrada en la semana 3. Un voluntario no desarrolló células T específicas de inserto tras inmunización con MVA85A, sin embargo este voluntario desarrolló respuestas específicas de células T al vector MVA, a pesar de no tener historial anterior de inmunización con vacunas (datos no mostrados). Las respuestas a MVA-lac-Z en voluntarios vacunados con MVA85A se investigaron adicionalmente llevando a cabo ensayos de ELISPOT ex vivo usando antígeno MVA-lac-Z. La metodología de ensayo es como se discute anteriormente en "Immunogenicity measures". Los voluntarios sanos

vacunados con MVA85A demostraron respuestas de células T anti-MVA fuertes que duran hasta 24 semanas después de la vacunación.

5 En contraste con la vacunación de BCG, la vacunación con MVA85A indujo respuestas fuertes a varias reservas peptídicas en todos los 13/14 voluntarios que respondieron (Tabla 2, Figura 1d). Se vieron respuestas en un amplio intervalo de péptidos a lo largo de la longitud completa de antígeno 85A (Ag85A). Estas respuestas a péptidos individuales se abolieron completamente por agotamiento de células T CD4+ (datos no mostrados).

10 En 16/17 voluntarios en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A, se vio un aumento significativo en células T específicas de antígeno 1 semana después de la vacunación (Tabla 2, Figura 1). La respuesta máxima 1 semana después de la inmunización fue significativamente mayor en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A que bien en el grupo de BCG solo o bien en el grupo de MVA85A solo, (Figura 1b-e). Estas respuestas se mantuvieron a un nivel significativamente más alto que después de la vacunación bien con BCG solo o bien con MVA85A solo, durante al menos 24 semanas (Figura 1e). Las respuestas de línea base en el momento de rastreo fueron mayores en los voluntarios previamente vacunados con BCG, que en el grupo no inmunizado contra BCG, como sería de esperar. No obstante, las respuestas 24 semanas después de la vacunación con MVA85A en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A fueron significativamente más altas que los recuentos de línea base en este grupo para PPD (Wilcoxon $z = -3,010$, $P = 0,003$), Antígeno 85 (Ag85A) (Wilcoxon $z = -3,516$, $P < 0,001$) y los péptidos almacenados sumados (Wilcoxon $z = -3,408$, $P = 0,001$).

20 La anchura de las respuestas peptídicas vista en los grupos de MVA85A solo (no mostrado) y de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A (Figura 1f) fueron muy similares. Sin embargo, la magnitud de respuestas fue significativamente más alta en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A (Figura 1e). PBMC desde 12 voluntarios en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A se ensayaron con todos los 66 péptidos a partir del antígeno 85A (Ag85A). Varios de estos péptidos se reconocieron por más del 50% de los sujetos (Figura 1f)), ilustrando el reconocimiento promiscuo de estos péptidos por diferentes moléculas de Clase II de HLA, como se comunicó previamente (Launois, P. y cols. (1994) *Infecten. Immun.* 62, 3679-3687).

Tabla 2. Respuesta media aritmética (SE) y respuesta mediana (IQR) ELISPOT a PPD, antígeno 85 (Ag85A) y péptidos almacenados sumados en cada grupo de vacunación en cada punto temporal.

Tiempo después de vacunación (semanas)	Grupo de vacunas	Número	Media aritmética PPD (EE)	mediana (25-75%)	Media aritmética (EE) antígeno 85	mediana (25-75%)	Media aritmética péptidos almacenados sumados (EE)	mediana (25-75%)
0	BCG	11	15 (6)	0 (0-28)	6 (5)	0 (0-0)	15 (4)	20 (0-22)
	MVA85A	14	18 (7)	0 (0-22)	4 (4)	0 (0-0)	3 (3)	0 (0-0)
	BCG-MVA85A	17	129 (33)	60 (28-218)	24 (6)	18 (0-37)	26 (11)	0 (0-50)
1	BCG	11	173 (52)	132 (42-249)	79 (22)	82 (23-122)	38 (9)	28 (20-52)
	MVA85A	14	460 (93)	434 (175-553)	419 (98)	338 (140-540)	1365 (378)	1153 (531-1432)
	BCG-MVA85A	17	917 (148)	783 (403-1653)	895 (150)	707 (438-1653)	3248 (592)	2455 (1315-5187)
4	BCG	11	233 (50)	182 (104-314)	64 (12)	67 (37-94)	31 (7)	35 (13-40)
	MVA85A	14	107 (21)	81 (53-167)	117 (42)	65 (33-138)	306 (95)	156 (60-533)
	BCG-MVA85A	17	362 (86)	343 (165-421)	341 (76)	322 (180-405)	1123 (266)	953 (609-1219)
12	BCG	11	76 (25)	47 (27-85)	21 (8)	15 (0-33)	15 (9)	0 (0-17)
	MVA85A	14	70 (25)	41 (22-92)	56 (26)	27 (18-52)	167 (58)	68 (21-205)
	BCG-MVA85A	17	299 (83)	223 (68-387)	227 (72)	92 (42-287)	739 (199)	390 (212-910)
24	BCG	11	58 (17)	53 (10-95)	12 (6)	0 (0-22)	23 (7)	20 (0-35)
	MVA85A	14	62 (19)	38 (26-63)	32 (13)	18 (0-45)	113 (27)	105 (32-152)
	BCG-MVA85A	16	328 (89)	249 (150-385)	240 (77)	199 (82-293)	669 (177)	385 (223-1043)

La magnitud de respuestas de células T vistas en el grupo de MVA85A solo es más fuerte por un factor de aproximadamente 10 que aquellas vistas con otros MVA recombinantes usados hasta la fecha (McConkey, S.J. y cols., "Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans", Nat. Med., 9, 729-735 (2003)); Mwau, M. y cols., "A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans", J. Gen. Virol., 85, 911-919 (2004)). Un MVA recombinante que expresa un antígeno de *P. falciparum* indujo una respuesta peptídica sumada de 90 SFC/106 PBMC 7 días después de la vacunación (McConkey, S.J. y cols. (2003) Nat. Med. 9, 729-735). En contraste, inventores aprecian una respuesta media a los péptidos sumados de 1365 SFC/106 PBMC 7 días después de la vacunación con MVA85A (Tabla 2). Una explicación para esto es que estos voluntarios tienen alguna inmunidad antimicrobiana preexistente, que se está reforzando por inmunización con MVA85A. Los inventores aprecian un ensayo ELISPOT cultivado, mejor que uno ex vivo para investigar esto adicionalmente. Se ha mostrado previamente que el ensayo de ELISPOT cultivado mide células T de tipo de memoria central, más que las células T efectoras activadas que se miden por ELISPOT ex vivo (Reece, W.H. y cols. (2004) Nat. Med. 10, 406-410, Godkin, A.J. y cols. (2002) J. Immunol. 169, 2210-2214).

Se llevó a cabo un ensayo de ELISPOT de IFN- γ en las PBMC de rastreo de pre-vacunación a partir de 4 de los voluntarios en el grupo de MVA85A solo. Las células se cultivaron con PPD de *M. tb*, PPD de *M. avium* y antígeno recombinante 85A (Ag85A). Los 4 voluntarios respondieron a PPD de *M. avium*, 2/4 respondieron a PPD de *M. tb* y 2/4 respondieron a antígeno recombinante 85A (Ag85A) (Figura 2). Ninguno de estos voluntarios tuvo ninguna respuesta de línea base bien a PPD de *M. tb* o bien a antígeno 85 (Ag85A) purificado sobre el ELISPOT ex vivo de rastreo.

Para continuar investigando la inducción de una respuesta de células T de memoria tras vacunación con MVA85A, se llevaron a cabo un ensayo ex vivo y un ensayo de ELISPOT cultivado en la tercera semana tras vacunación con PBMC. Las células se cultivaron con PPD de *M. tb*, PPD de *M. avium* y antígeno 85A (Ag85A) recombinante. En 3 semanas la respuesta ex vivo es muy baja o indetectable, sin embargo en todos los 5 voluntarios probados hubo respuestas fuertes en el ELISPOT cultivado indicando la inducción por vacunación de células T de memoria central específicas para antígeno 85A (Ag85A) (Figura 3).

Ejemplo 2

Datos de seguridad e inmunogenicidad en sujetos que están infectados de forma latente con *M. tb*.

9 adultos sanos que estaban infectados de forma latente con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) fueron vacunados con MVA85A. Se midieron marcadores inflamatorios séricos a intervalos regulares después de la vacunación en cada sujeto durante un periodo de doce meses. Un escaneado CT de alta resolución de los pulmones se llevó a cabo en cada sujeto antes de la vacunación y 10 semanas después de la vacunación. Estas pruebas se llevaron a cabo con el fin de detectar cualesquiera signos subclínicos de inflamación pulmonar. Los resultados del ELISPOT ex vivo de los 9 voluntarios infectados de forma latente se muestran en la Figura spa.

La seguridad de MVA85A en este grupo es idéntica a aquella vista en los ensayos anteriores descritos en el Ejemplo 1. No se detectó incremento bien en efectos secundarios locales o bien en efectos secundarios sistémicos y ninguno de los dos fueron signos de cualquier inflamación pulmonar detectada. Los marcadores inflamatorios no cambiaron después de la vacunación y no hubo inflamación pulmonar detectable por escaneado CT post-vacunación.

Como comparación, 17 adultos sanos que habían recibido previamente una inyección de BCG hace 0,5 a 37 años se reforzaron con la vacunación MVA85A. Los resultados se describen en el Ejemplo 1. Las respuestas inmunes tras la vacunación vistas en el grupo infectado de forma latente (ensayo 7, "T007") son de magnitud similar a aquella vista en el grupo iniciado con BCG (ensayo 5, "T005"). Los resultados se muestran en las Figuras 5b y 5c.

Este dato es significativo porque es importante que cualquier nueva vacuna de TB sea segura en sujetos infectados de forma latente, dada la prevalencia de la infección latente por todo el mundo en desarrollo. Además, la inmunogenicidad alentadora respalda la aplicación de esta vacuna como una vacuna después de la exposición, administrada a personas infectadas de forma latente, con el objetivo de erradicar tal infección latente.

Duración de la respuesta inmune

Las respuestas de ELISPOT ex vivo en voluntarios iniciados con BCG después de refuerzo con MVA85A final duran al menos durante 1 año después de la vacunación, tanto con un intervalo corto (1 mes) como con un intervalo largo (más de 10 años) entre inicio (BCG) y refuerzo (MVA85A).

Se muestra el seguimiento a largo plazo de datos sobre 12 voluntarios vacunados con MVA85A más de 10 años después de BCG y sobre 10 voluntarios vacunados con MVA85A 1 mes después de BCG en la Figura 6. Los datos de ambos grupos de voluntarios muestran persistencia de respuestas inmunes a 1 año después de la vacunación están a la misma magnitud que se ve a 6 meses después de la vacunación.

La persistencia de respuestas inmunes inducidas por vacuna demuestra la inducción de una respuesta de memoria.

Alguien no esperaría ver respuestas inducidas por vacuna persistentes 1 año tras la vacunación con una vacuna no replicativa, a menos que se haya inducido una respuesta de memoria.

Correlación entre intervalo de inicio-refuerzo y nivel de respuesta inmune

5 Los datos presentados en la Figura 3 indican que el refuerzo de respuestas inmunes inducidas por BCG visto después de vacunación de refuerzo con MVA85A no depende del intervalo entre la iniciación con BCG y el refuerzo con MVA85A. Se vio igual refuerzo con un intervalo de refuerzo corto (1 mes) y con un intervalo de refuerzo largo (más de 10 años).

No hay ninguna correlación entre el intervalo entre vacunación de inicio (BCG) y vacunación de refuerzo (MVA85A) y respuestas inmunes inducidas por MVA85A bien de pico (1 semana) o bien de meseta (6 meses) (Figura 7).

10 Así la inmunidad micobacteriana de refuerzo bien pronto después de vacunación con BCG (por ejemplo en la infancia en el mundo en desarrollo) o bien en un punto temporal más tardío (por ejemplo en la adolescencia), es igualmente factible. Tanto el refuerzo en la infancia como el refuerzo en la adolescencia son opciones posibles para pruebas de eficacia e indicaciones potenciales para una vacuna TB de refuerzo.

Inmunogenicidad y eficacia protectora de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A en macacos rhesus

15 En un experimento de inmunogenicidad y de puesta a prueba, los macacos rhesus (6/grupo) se vacunaron bien con i) BCG solo, ii) BCG y después se reforzaron 9 semanas más tarde con MVA85A, o iii) solución salina (grupo de control). Todos los animales se pusieron a prueba intra-traquealmente 18 semanas después de vacunación con BCG (o vacunación salina para el grupo control) y después se siguieron durante 16 semanas antes de someterse a eutanasia. Los resultados de inmunogenicidad se muestran en la Figura 8.

20 Figura 8a muestra niveles medios de IFN- γ después de la vacunación (según se miden por una prueba de estimulación de linfocitos de 3 días) en todos los tres grupos dentro de este experimento de puesta a prueba. Aunque los niveles plasmáticos de IFN- γ en respuesta a PPD en el grupo de BCG y en el grupo de inicio con BCG-MVA85A parecen comparables, las respuestas de A85A son claramente más altas en el grupo de inicio de BCG-refuerzo de MVA85A. Por lo tanto, hay un aumento significativo en secreción de IFN- γ específico de Ag85A después
25 de vacunación con MVA85A (grupo ii) que no se observa en el grupo de BCG solo (grupo i) (Fig. 8a).

Figura 8b muestra niveles medios de IFN- γ tras puesta a prueba (según se mide por una prueba de estimulación de linfocitos de 3 días) en todos los tres grupos dentro de este experimento de puesta a prueba. Después de la puesta a prueba con *M. tb.*, el grupo BCG-MVA85A (grupo ii) tuvo respuestas específicas de Ag85A significativamente mayores que el grupo de BCG solo (grupo i). Además las respuestas con ESAT6/CFP10 (proteína objetivo antigénica segregada pronto/filtrado de cultivo de proteína 10), que son las respuestas inmunes específicas de Mtb (la magnitud hace referencia a la carga bacteriana), son menores en los grupos BCG y los grupos BCG-MVA85A, comparados con el grupo de medio salino. Las respuestas de PPD son comparables entre estos dos grupos. Los resultados de ESAT6/CFP10 son importantes (panel más bajo) ya que estos antígenos son específicos de TB y los niveles de las respuestas inmunes para estos antígenos correlacionan con la carga bacteriana (es decir, cuanto más alta es la carga bacteriana (grupo de medio salino), más alta es la respuesta inmune a ESAT6 y CFP10). La eficacia protectora de la vacuna está implicada por el nivel relativamente menor de la respuesta a ESAT6/CFP10 en los grupos de BCG y de BCG-MVA85A, comparados con el grupo de medio salino.

35 En la autopsia, hubo considerablemente menos patología vista en el grupo BCG-MVA85A que en el grupo de BCG solo. La reducción en carga bacteriana en estos 2 grupos fue 0,97 para el grupo BCG-MVA85A y 0,42 para el grupo
40 de BCG solo.

El macaco rhesus es un buen modelo de enfermedad humana y esta mejora prometedor en la eficacia protectora, a pesar de los números pequeños de animales sugiere que los resultados de eficacia similar se esperarían en seres humanos.

Datos de seguridad e inmunogenicidad a partir de estudios de Fase II en adultos en Sudáfrica

45 Se ha comenzado un estudio de seguridad e inmunogenicidad en Fase II en Western Cape, Sudáfrica. Este ensayo es en adultos y el objetivo son 24 sujetos. Las personas que están infectadas de forma latente están excluidas de este estudio. Hasta la fecha, se han vacunado 12 sujetos. Todos los 12 sujetos tuvieron respuestas inmunes inducidas por MVA85A significativas en su semana 1 tras el ensayo de ELISPOT de vacunación.

50 El perfil de seguridad hasta la fecha es el mismo que se ve en los estudios del Reino Unido y Gambia. Los resultados de los estudios del Reino Unido se muestran en la Figura 1 y la Figura 9a y los resultados del estudio de Gambia se muestran en la Figura 9b.

En total, 11 voluntarios no inmunizados contra BCG y 10 voluntarios iniciados con BCG se vacunaron en Gambia. Los resultados de inmunogenicidad del grupo no inmunizado de BCG (Figura 9b) se parecían a los resultados del grupo iniciado de BCG en el Reino Unido (Figuras 1b, 1c, 1d), porque éstos permanecen por encima de la línea

base durante la duración del seguimiento. Esto es probablemente para reflejar un grado más alto de iniciación por micobacterias ambientales en la línea base y también la exposición en curso a micobacterias experimentales que están manteniendo la respuesta.

5 No hay diferencias significativas entre los grupos no inmunizados contra BCG e iniciados con BCG en Gambia, que se explica como anteriormente por el grado mayor de iniciación ambiental en este grupo. En contraste, en el Reino Unido, los resultados de la inmunogenicidad del grupo no inmunizado contra BCR volvieron a la línea base durante el seguimiento (Figura 9a y Figuras 1b, 1c y 1d), mientras que el grupo iniciado con BCG permanece por encima de la línea base durante la duración del seguimiento (Figuras 1b, 1c y 1d).

10 En toda la bibliografía sobre BCG, hay muchos ejemplos de la gran variabilidad en la eficacia protectora entre los distintos países y continentes. El perfil de seguridad e inmunogenicidad consistente de MVA85A en el Reino Unido, África Occidental y Sudáfrica es muy significativo.

Inmunogenicidad en ratones de adenovirus expresando antígeno 85A (Ag85A)

15 Se ha mostrado que un adenovirus recombinante (cepa humana 5, E1 y E3 delecionados) que expresa antígeno 85A (Ag85A) induce fuertes respuestas inmunes en ratones cuando se administra solo (respuesta de CD4 c 800 manchas/millón de esplenocitos; respuesta de CD8 c 1200 manchas/millón de esplenocitos). Cuando se administra a ratones que han recibido previamente BCG, este adenovirus que expresa antígeno 85A (Ag85A) estimula una respuesta incluso más fuerte (respuesta de CD4 c 1400 manchas/millón de esplenocitos; respuesta de CD8 c 2.500 manchas/millón de esplenocitos). Por lo tanto, este vector de adenovirus, sorprendentemente, se demuestra aquí que induce, además de respuestas de células T CD4 muy fuertes, respuestas de células T CD8 muy fuertes y la inducción de éstas por la misma vacuna es probable que sea de beneficio tanto en prevención como en tratamiento de enfermedad micobacteriana. Previamente se han visto los vectores de adenovirus, como un buen medio de inducir respuestas de células T CD8 pero mostraron aquí que tanto las respuestas de CD4 como las respuestas de CD8 están poderosamente inducidas. Estos datos sugieren que los vectores adenovirales pueden ser un refuerzo potente para respuestas de células T iniciadas con BCG.

25 La invención se ha descrito anteriormente a modo de ejemplo solamente. Se apreciará que se pueden hacer modificaciones del detalle sin apartarse del ámbito de la invención.

SECUENCIAS ESPECÍFICAS de AG85A

SEC ID N.º: 1 (SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE AG85A)

MQLVDRVRGAVTGMSRRLVVGAVGAALVSGLVGAVGGTATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMG
 RDIKVQFQSGGANSALYLLDGLRAQDDFSGWDINTPAFEWYDQSGLSVVMVGGQSSFYS
 WYQPACGKAGCQTYKWETFLTSELPGWLQANRHVKPTGSAVVGLSMAASSALTLAIYHPQQF
 VYAGAMSGLLDPSQAMGPTLIGLAMGDAGGYKASDMWGPKEPAWQRNDPLLNVGKLIANNT
 RVVVYCGNGKPSDLGGNNLPAKFLLEGFVRTSNIKFQDAYNAGGGHNGVDFDPDSGTHSWEYW
 GAQLNAMKPDQLRALGATPNTGPAPQGA

30 SEC ID N.º: 2 (SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE AG85A)

atgcagcttggtgacaggggttcgtggcgccgtcacgggtatgtcgcgtcgactcgtg
gtcggggccgtcggcgcgccctagtgtcgggtctggtcggcgccgtcgggtggcacg
gcgaccgcgggggcattttcccggccgggcttgccgggtggagtagctgcaggtgccg
tcgccgtcgatgggcccgtgacatcaaggtccaattccaaagtgggtggcgccaactcg
cccgcctgtacctgctcgacggcctgcgcgcgcaggacgacttcagcggctgggac
atcaacacccccggcggttcgagtggtacgaccagtcgggcctgtcgggtggcatgccg
gtgggtggccagtcagcttctactccgactggtaccagcccgcctgcggcaaggcc
ggttgccagacttacaagtgggagaccttcctgaccagcgagctgccgggggtggctg
caggccaacaggcacgtcaagcccaccggaagcgccgtcgtcggctcttcgatggct
gcttcttcggcgctgacgctggcgatctatcacccccagcagttcgtctacgcggga
gcatgctcgggcctggtggaccctcccaggcgatgggtcccaccctgatcggcctg
gcatgggtgacgctggcggtacaaggcctccgacatgtggggcccgaaggaggac
ccggcggtggcagcgcaacgaccgctggtgaacgtcgggaagctgatcgccaacaac
accgcgctcgggtgtactgcggaacggcaagccgtcggatctgggtggcaacaac
ctgccggccaagttcctcgagggttcgtgcggaccagcaacatcaagttccaagac
gcctacaacgcccgggtggcggccacaacggcgtggtcacttcccggacagcggtagc
cacagctgggagtagctggggcgcgagctcaacgctatgaagcccgacctgcaacgg
gactgggtgccacgcccacaccgggcccgcgccccagggcgccctag

SEC ID N.º: 3 (SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE TRUNCACIÓN DE AG85A DE 15 AMINOÁCIDOS)

MQLVDRVRGAVTGMSRRLVVGAVGAALVSGLVGAVGGTATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMG
RDIKVQFQSGGANS PALYLLDGLRAQDDFSGWDINTPAFEWYDQSGLSVVMPVGGQSSFYSD
WYQPACGKAGCQTYKWETFLTSELPGWLQANRHVKPTGSAVVGLSMAASSALTLAIYHPQQF
VYAGAMSGLLDPSQAMGPTLIGLAMGDAGGYKASDMWGPKEPAWQRNDPLLNVGKLIANNT
RVVVYCGNGKPSDLGGNNLPAKFLEGFVRTSNIKFDAYNAGGGHNGVDFPDSGTHSWEYW
GAQLNAMKPDLQR

SEC ID N.º: 4 (SECUENCIA POLIPEPTÍDICA DE TRUNCACIÓN DE AG85A DE 15 AMINOÁCIDOS)

atgcagcttgttgacagggttcgtggcgccgtcacgggtatgtcgcgctcactcgtggtcgg
 ggccgtcggcgccgcttagtgtcgggtctggtcggcgccgtcgggtggcacggcgaccgcg
 gggcattttcccggccgggcttgccgggtggagtacctgcaggtgccgtcgcgctcgatggg
 cgtgacatcaaggtccaattccaaagtgggtgggtgccaactcggccgacctgtacctgctga
 cggcctgcgcgcgacaggacgacttcagcgggtgggacatcaacaccccggcgcttcgagtgt
 acgaccagtcgggcctgtcgggtgggtcatgccgggtgggtggccagtcagcttctactccgac
 tggtagcagcccgctgcggcaaggccggttgccagacttacaagtgggagaccttctgac
 cagcgagctgccgggggtgggtgcaggccaacaggcacgtcaagcccaccggaagcgccgtcg
 tcggctcttcgatgggtgcttcttcggcgctgacgctggcgatctatcacccccagcagttc
 gtctacgcgggagcgatgtcgggcctgttggaaccctcccaggcgatgggtcccaccctgat
 cggcctggcgatgggtgacgctggcggtacaaggcctccgacatgtggggcccgaaggagg
 accggcggtggcagcgcaacgaccgctgttgaacgtcgggaagctgatcgccaacaacacc
 cgcgtctgggtgtaactgcggcaacggcaagccgtcggatctgggtggcaacaacctgccggc
 caagttcctcgagggcttcgtgcggaccagcaacatcaagttccaagacgcctacaacgccg
 gtggcgccacaacggcggttcgacttcccggacagcggtagcacagctgggagtactgg
 ggcgagctcaacgctatgaagcccgcacctgcaacgg

SEC ID N.º: 5. La secuencia de 1176 del inserto es como sigue (secuencia expresada en letras mayúsculas, subrayada secuencia codificante de Ag85A):

tctgtacgggcccgtaccggtaccgagctcggatctgcgcgccgccaccATGGATGCA
ATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCC
AGCCAGGAAATCCATGCCCGATTTCAGAAGAGGATCTATGCAGCTTGTGACAGGGTT
CGTGGCGCCGTCACGGGTATGTCGCGTCGACTCGTGGTCCGGGCGGTCGGCGCGGCC
CTAGTGTCCGGTCTGGTCCGGCGCCGTCGGTGGCACGGCGACCGCGGGGGCATTTTCC
CGGCCGGGCTTGCCGGTGGAGTACCTGCAGGTGCCGTCCCGTCGATGGGCCGTGAC
ATCAAGGTCCAATTCCAAAGTGGTGGTGCCTGCGCCCGCCCTGTACCTGCTCGAC
GGCCTGCGCGCGCAGGACGACTTCAGCGGCTGGGACATCAACACCCCGGCGTTCGAG
TGGTACGACCAGTCGGGCCTGTCCGTGGTGCCTGCGCCGTGGGTGGCCAGTCAAGCTTC
TACTCCGACTGGTACCAGCCCGCCTGCGGCAAGGCCGGTTGCCAGACTTACAAGTGG
GAGACCTTCCTGACCAGCGAGCTGCCGGGGTGGCTGCAGGCCAACAGGCACGTCAAG
CCCACCGGAAGCGCCGTCGTCCGTCTTTCGATGGCTGCTTCTTCGGCGCTGACGCTG
GCGATCTATACCCCCAGCAGTTCGTCTACGCGGGAGCGATGTCGGGCCTGTTGGAC
CCCTCCCAGGCGATGGGTCCCACCCTGATCGGCCTGGCGATGGGTGACGCTGGCGGC
TACAAGGCCTCCGACATGTGGGGCCCGAAGGAGGACCCGGCGTGGCAGCGCAACGAC
CCGCTGTTGAACGTCCGGAAGCTGATCGCCAACAACACCCGCGTCTGGGTGTAAGTGC
GGCAACGGCAAGCTGTCGGATCTGGGTGGCAACAACCTGCCGGCCAAGTTCCTCGAG
GGCTTCGTGCGGACCAGCAACATCAAGTTCGAAGACGCCTACAACGCCGGTGGCGGC
CACAACGGCGTGTTCGACTTCCCAGGACAGCGGTACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGC
GCGCAGCTCAACGCTATGAAGCCCCGACCTGCAACGT

GGATCCATTCCAAACCCCTTTGCTGGGATTGGACTgactgcagatatccatcacactg

SEC ID N.º: 6

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRRGSMQLVDRVRGAVTGMSRRLVVGAV
GAALVSGLVGAVGGTATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGANSPLY
LLDGLRAQDDFSGWDINTPAFEWYDQSGLSVMPVGGQSSFYSDWYQPACGKAGCQT
YKWETFLTSELPGWLQANRHVKPTGSAVVGLSMAASSALTLAIYHPQQFVYAGAMSG
LLDPSQAMGPTLIIGLAMGDAGGYKASDMWGPKEDEPAWQNDPLLNVGKLIANNTRVWV
YCGNGKLSDLGGNNLPAKFLEGFVRTSNIKFQDAYNAGGGHNGVDFDFPDSGTHSWEY
WGAQLNAMKPDQLQRGSI PNPLLGLD

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> ISIS INNOVATION LIMITED
- <120> PROCEDIMIENTO PARA GENERAR UNA RESPUESTA DE CÉLULAS T DE MEMORIA
- <130> P039686WO
- <141> 5-1-2.006
- <150> GB 0500102.9
- 10 <151> 5-1-2.005
- <150> US 60/649804
- <151> 3-2-2.005
- <160> 8
- <170> SeqWin99, version 1.02
- 15 <210> 1
- <211> 338
- <212> PRT
- <213> Mycobacterium tuberculosis
- <400> 1

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

Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
 195 200 205

Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
 210 215 220

Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
 225 230 235 240

Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
 245 250 255

Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
 260 265 270

Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
 275 280 285

Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
 290 295 300

His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
 305 310 315 320

Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln
 325 330 335

Gly Ala

<210> 2

<211> 1017

<212> ADN

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

atgcagcttg ttgacagggt tcgtggcgcc gtcacgggta tgtecgctcg actcgtggtc 60
 ggggccgtcg gcgcggccct agtgtcgggt ctggtcggcg ccgtcgggtg cacggcgacc 120
 gcgggggcat tttcccggcc gggcttgccg gtggagtacc tgcagggtgcc gtcgccgtcg 180
 atgggcccgtg acatcaaggt ccaattccaa agtgggtggtg ccaactcgcc cgccctgtac 240
 ctgctcgacg gcctgcgcgc gcaggacgac ttcagcggct gggacatcaa caccocggcg 300
 ttcgagtggg acgaccagtc gggcctgtcg gtggatcatgc cgggtgggtg ccagtcaagc 360
 ttctactccg actggtacca gccgcctgc ggcaaggccg gttgccagac ttacaagtgg 420
 gagaccttcc tgaccagcga gctgccgggg tggctgcagg ccaacaggca cgtcaagccc 480
 accggaagcg ccgtcgtcgg tctttcgatg gctgcttctt cggcgtgac gctggcgatc 540
 tatcaccccc agcagttcgt ctacgcggga gcgatgtcgg gctgttgga cccctcccag 600
 gcgatgggtc ccaccctgat cggcctggcg atgggtgacg ctggcggcta caaggcctcc 660
 gacatgtggg gcccggaagga ggaccggcg tggcagcgca acgaccgct gttgaacgtc 720
 ggggaagctga tcgccaacaa caccgcgctc tgggtgtact gcggcaacgg caagccgtcg 780
 gatctgggtg gcaacaacct gccggccaag ttcctcgagg gcttcgtgcg gaccagcaac 840
 atcaagtcc 'aagacgccta caacgccggt ggcggccaca acggcgtgtt cgacttcccg 900
 gacagcggta cgcacagctg ggagtactgg ggcgcgcagc tcaacgctat gaagcccagc 960
 ctgcaacggg cactgggtgc cacgcccac accgggcccc cgccccaggg cgccctag 1017

<210> 3

<211> 323

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 3

Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
 1 5 10 15
 Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
 20 25 30
 Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly
 35 40 45
 Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
 50 55 60
 Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile
 85 90 95
 Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val
 100 105 110
 Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
 115 120 125
 Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
 145 150 155 160
 Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu
 165 170 175
 Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met
 180 185 190
 Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
 195 200 205
 Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
 210 215 220
 Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
 245 250 255
 Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
 260 265 270
 Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
 275 280 285
 Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
 290 295 300
 His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
 305 310 315 320
 Leu Gln Arg

<210> 4

<211> 969

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

```

atgcagcttg ttgacagggt tcgtggcgcc gtcacgggta tgtcgcgctcg actcgtggtc 60
ggggccgctcg gcgcggccct agtgtcgggt ctggtcggcg ccgtcgggtgg cacggcgacc 120
gcgggggcat tttcccggcc gggcttgccg gtggagtacc tgcagggtgcc gtcgccgctcg 180
atggggcctg acatcaaggc ccaattccaa agtgggtggg ccaactcgcc cgccctgtac 240
ctgctcgacg gcctgcgcgc gcaggacgac ttcagcggct gggacatcaa caccocggcg 300
ttcagatggt acgaccagtc gggcctgtcg gtggatcatgc cgggtgggtgg ccagtcaagc 360
ttctactccg actggtacca gcccgcctgc ggcaaggccg gttgccagac ttacaagtgg 420
gagaccttcc tgaccagcga gctgccgggg tggctgcagg ccaacaggca cgtcaagccc 480
accggaagcg ccgctcgtcg tctttcgatg gctgcttctt cggcgctgac gctggcgatc 540
tatcaccccc agcagttcgt ctacgcggga gcgatgtcgg gctgttggg cccctcccag 600
gcgatgggtc ccaccctgat cggcctggcg atgggtgacg ctggcggtta caaggcctcc 660
gacatgtggg gcccggaagg ggaaccggcg tggcagcgca acgaccgct gttgaacgctc 720
gggaagctga tcgccaacaa caccgcgctc tgggtgtact gcggcaacgg caagccgctcg 780
gatctgggtg gcaacaacct gccggccaag ttcctcgagg gcttcgtgcg gaccagcaac 840
atcaagttcc aagacgccta caacgccggt ggcggccaca acggcgtggt cgacttcccg 900
gacagcggta cgcacagctg ggagtactgg ggcgcgcagc tcaacgctat gaagcccgac 960
ctgcaacgg 969
    
```

5

<210> 5

<211> 1176

<212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

```

tctgtacggg cccgtacggg accgagctcg gatctgcgcg ccgccaccat ggatgcaatg 60
aagagagggc tctgctgtgt gctgctgctg tgtggagcag tcttcgtttc gccagaccag 120
gaaatccatg cccgattcag aagaggatct atgcagcttg ttgacagggt tcgtggcgcc 180
gtcacgggta tgtcgcgctc actcgtggtc ggggcccgtc gcgcggccct agtgtcgggt 240
ctggtcggcg ccgctcgggtg cacggcgacc gcgggggcat tttcccggcc gggcttgccg 300
gtggagtacc tgcagggtgcc gtcgccgctc atgggcccgtg acatcaaggc ccaattccaa 360
agtgggtggg ccaactcgcc cgccctgtac ctgctcgacg gcctgcgcgc gcaggacgac 420
ttcagcggct gggacatcaa caccocggcg ttcagatggt acgaccagtc gggcctgtcg 480
gtggatcatgc cgggtgggtg ccagtcaagc ttctactccg actggtacca gcccgcctgc 540
ggcaaggccg gttgccagac ttacaagtgg gagaccttcc tgaccagcga gctgccgggg 600
tggctgcagg ccaacaggca cgtcaagccc accggaagcg ccgctcgtcg tctttcgatg 660
gctgcttctt cggcgctgac gctggcgatc tatcaccccc agcagttcgt ctacgcggga 720
gcgatgtcgg gctgttggg cccctcccag gcgatgggtc ccaccctgat cggcctggcg 780
atgggtgacg ctggcggcta caaggcctcc gacatgtggg gcccggaagg ggaccocggcg 840
tggcagcgca acgaccgct gttgaacgct ggaagctga tcgccaacaa caccocgctc 900
tgggtgtact gcggcaacgg caagctgctg gatctgggtg gcaacaacct gccggccaag 960
ttcctcgagg gcttcgtgcg gaccagcaac atcaagttcc aagacgccta caagcgcgtg 1020
ggcggccaca acggcgtggt cgacttcccg gacagcggta cgcacagctg ggagtactgg 1080
ggcgcgcagc tcaacgctat gaagcccgac ctgcaacgtg gatccattcc aaaccctttg 1140
ctgggattgg actgactgca gatatccatc aactg 1176
    
```

<210> 6

<211> 367

<212> PRT

10

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg
 20 25 30
 Gly Ser Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met
 35 40 45
 Ser Arg Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly
 50 55 60
 Leu Val Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg
 65 70 75 80
 Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly
 85 90 95
 Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala
 100 105 110
 Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp
 115 120 125
 Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser
 130 135 140
 Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr
 145 150 155 160
 Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr
 165 170 175
 Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val
 180 185 190
 Lys Pro Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser
 195 200 205
 Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly
 210 215 220
 Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met
 245 250 255
 Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Asn Asp Pro Leu Leu Asn
 260 265 270
 Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly
 275 280 285
 Asn Gly Lys Leu Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe
 290 295 300
 Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly
 325 330 335

Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro
 340 345 350

Asp Leu Gln Arg Gly Ser Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp
 355 360 365

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marca de PK

<400> 7

Pro Asn Pro Leu Gly Leu Asp

10 15

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Marca de PK

<400> 8

Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunógena que comprende un vector de poxvirus no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de un gen Ag85A micobacteriano para su uso en la prevención de la infección o enfermedad micobacteriana induciendo una respuesta inmune de células T de memoria central en un paciente, en la que un vector viral expresa Ag85A con una marca C-terminal de PK, una secuencia líder de TPA y una truncación C-terminal de 10-20 aminoácidos y en la que dicha respuesta inmune persiste durante al menos 1 año.
- 10 2. Uso de una composición inmunogénica que comprende un vector de poxvirus no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de un gen Ag85A micobacteriano en la elaboración de un medicamento para la prevención de una infección o enfermedad micobacteriana en un paciente induciendo una respuesta inmune de células T de memoria central en el paciente, en la que el vector viral expresa Ag85A con una marca C-terminal de PK, una secuencia líder de TPA y una truncación C-terminal de 10-20 aminoácidos y en la que dicha respuesta inmune persiste durante al menos 1 año.
- 15 3. La composición o uso de cualquier reivindicación precedente en la que el vector viral no replicativo es MVA.
4. La composición o uso de cualquier reivindicación anterior en la que el vector viral expresa el producto de traducción de SEC ID N.º: 5.
5. La composición o uso de cualquier reivindicación anterior en la que la vector viral expresa adicionalmente el producto de traducción de al menos un gen(es) antigénico(s) adicional(es) de una especie micobacteriana.
- 20 6. La composición o uso de cualquier reivindicación anterior en la que la composición inmunógena es para administración con al menos un antígeno adicional y/o antimicrobiano.
7. La composición o uso de la reivindicación 5 en la que al menos un antígeno adicional y/o antimicrobiano es para administración simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- 25 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el vector viral expresa adicionalmente el producto de traducción de al menos un gen antigénico adicional para la prevención de al menos una enfermedad adicional en un paciente.
- 30 9. La composición inmunógena de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2 en la que el medicamento es para ser administrado con al menos un antígeno adicional, adicionalmente para usar en el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en tuberculosis, lepra, infección con *Mycobacterium avium*, infección micobacteriana no tuberculósica, úlcera de Buruli, infección o enfermedad con *Mycobacterium bovis*, viruela, viruela del mono, infección con *Mycobacterium paratuberculosis*, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad autoinmune, cáncer y cáncer de vejiga.
- 35 10. La composición inmunógena o el uso de cualquier reivindicación precedente, en la que el paciente está seleccionado del grupo que consiste en niños, pacientes que tienen infección con VIH o SIDA, están inmunocomprometidos o han sufrido trasplantes de órganos.
11. El uso de composición inmunógena de cualquier reivindicación precedente, en el que el paciente ha estado expuesto previamente a micobacteria.
- 40 12. La composición inmunógena o el uso de la reivindicación 11 en el que el paciente ha estado previamente expuesto a *M. tuberculosis*.
13. La composición inmunógena o el uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el paciente está infectado de forma latente con la micobacteria.
14. La composición inmunógena o el uso de cualquier reivindicación precedente en el que el paciente ha sidopretratado con BCG.
- 45 15. Una vacuna vectorizada que comprende un vector de poxvirus no replicativo o dañado en la replicación que expresa el producto de traducción de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 4 y que incluye adicionalmente una marca C-terminal de PK y una secuencia líder de TPA, en la que dicha vacuna vectorizada es capaz de inducir una respuesta inmune que persiste durante al menos un año.
16. La vacuna vectorizada de la reivindicación 15 en la que el vector vírico expresa el producto de traducción de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 5.
- 50 17. La vacuna vectorizada de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en la que el vector no replicativo viral es MVA.

18. La vacuna vectorizada de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que el vector viral expresa adicionalmente el producto de traducción de al menos un gen(es) antigénico(s) adicional(es) de una especie micobacteriana.

Figura 1(a)

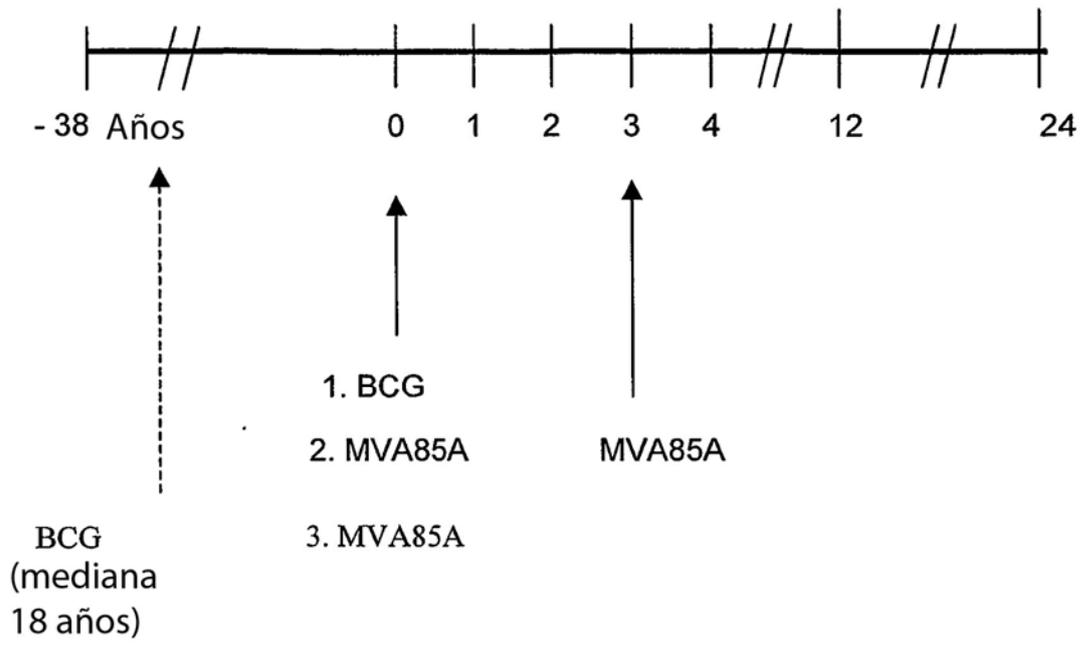


Figura 1(b)

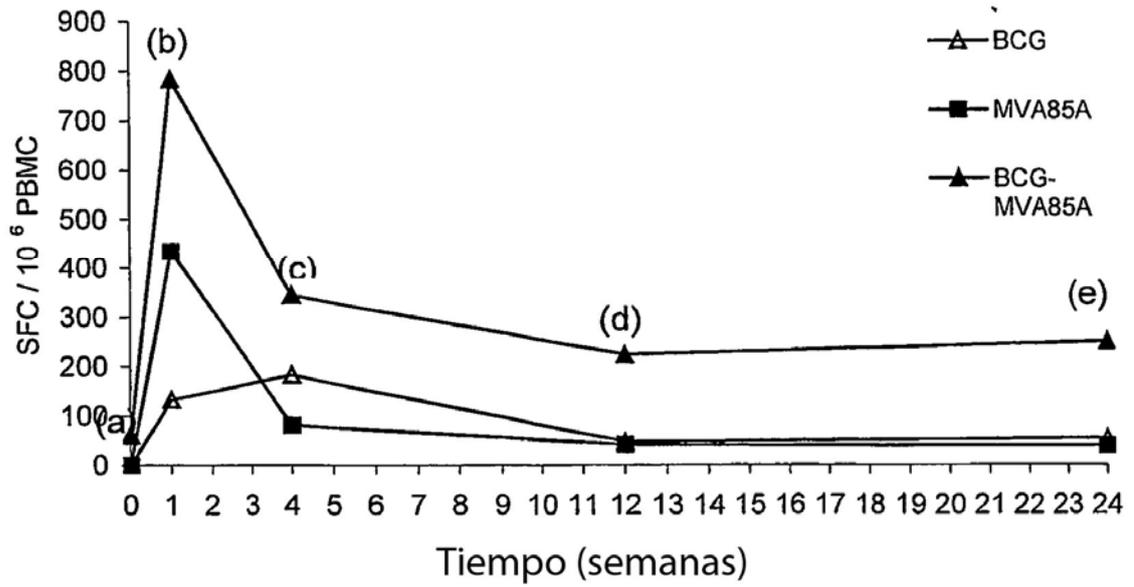


Figura 1 (c)

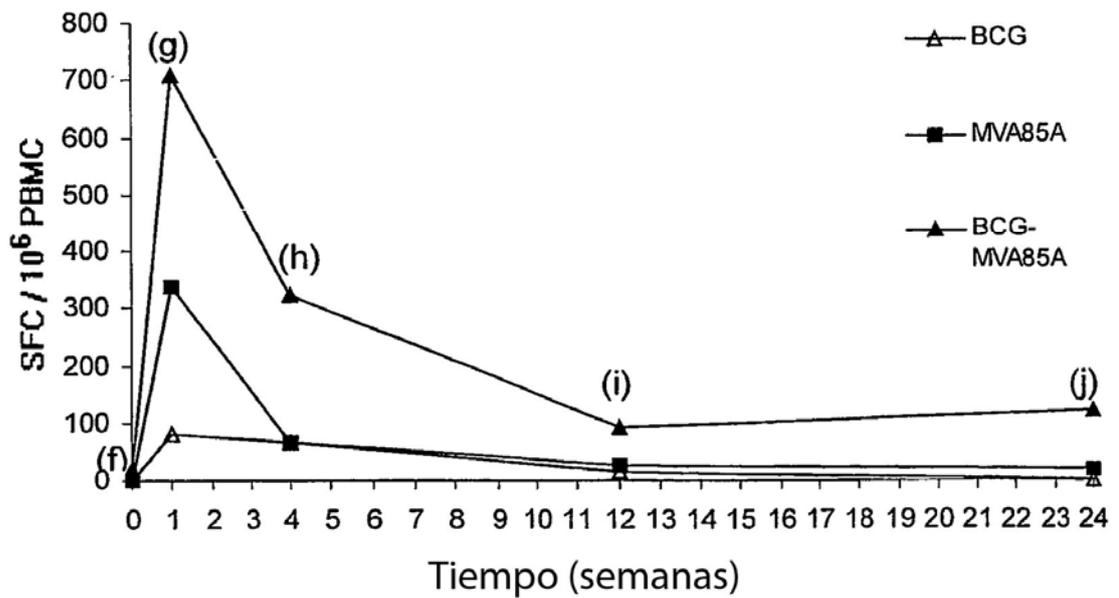


Figura 1(d)

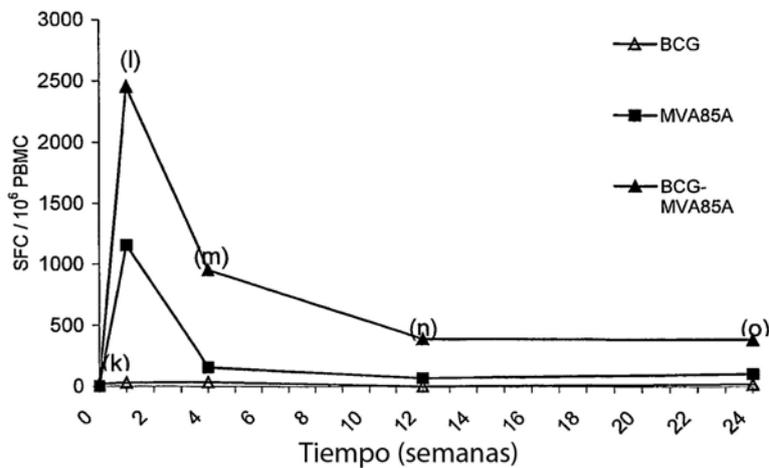


Figura 1(e)

Respuestas de mediana para PPD (Figura 1b)

- (a) B v BM, $P = 0,006$; M v BM, $P = 0,002$
- (b) B v M, $P = 0,021$; B v BM, $P = 0,001$; M v BM, $P = 0,047$
- (c) B v M, $P = 0,042$; M v BM, $P = 0,003$;
- (d) B v M, $P = 0,032$; M v BM, $P = 0,01$;
- (e) B v M, $P < 0,001$; M v BM, $P < 0,001$;

Respuestas de mediana para antígeno 85 purificado (Figura 1c)

- (f) B v BM, $P = 0,018$; M v BM, $P = 0,002$
- (g) B v M, $P = 0,003$; B v BM, $P < 0,001$; M v BM, $P = 0,024$
- (h) B v M, $P < 0,001$; M v BM, $P = 0,004$;
- (i) B v M, $P = 0,003$; M v BM, $P = 0,033$;
- (j) B v M, $P < 0,001$; M v BM, $P < 0,001$;

Respuestas de reservas peptídicas sumadas de mediana (Figura 1d)

- (k) B v BM, $P = 0,007$; M v BM, $P = 0,03$
- (l) B v M, $P = 0,001$; B v BM, $P < 0,001$; M v BM, $P = 0,015$
- (m) B v M, $P = 0,002$; B v BM, $P < 0,001$; M v BM, $P = 0,003$
- (n) B v M, $P = 0,003$; B v BM, $P < 0,001$; M v BM, $P = 0,003$
- (o) B v M, $P = 0,024$; B v BM, $P < 0,001$; M v BM, $P < 0,001$

Figura 1(f)

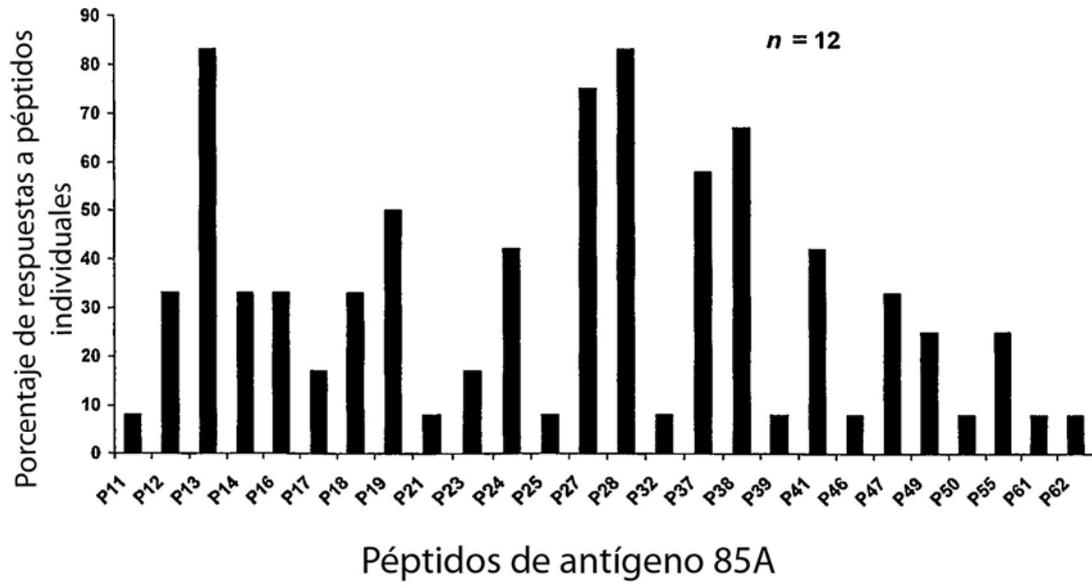


Figura 2

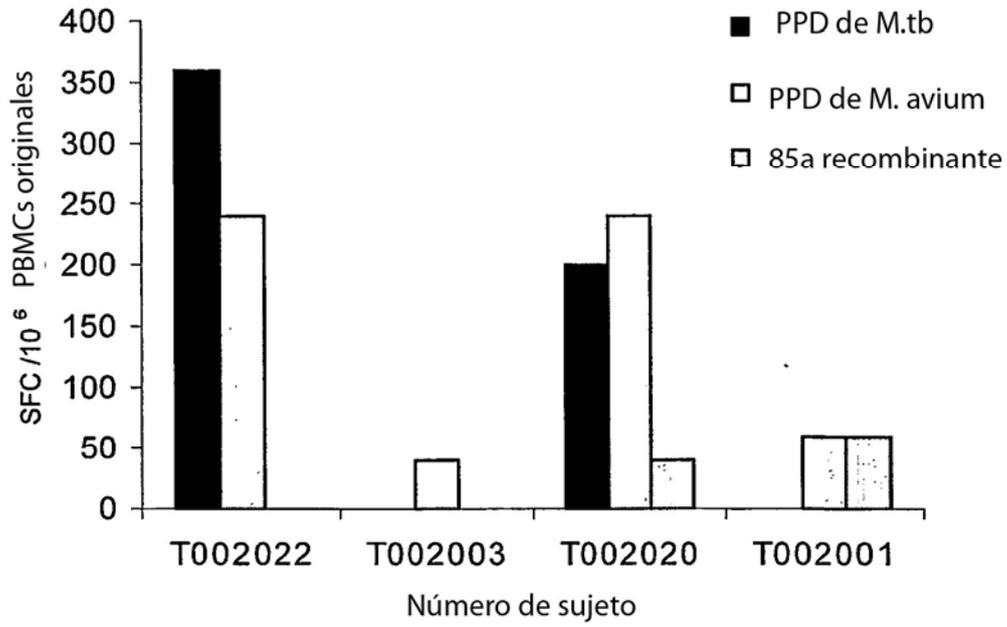
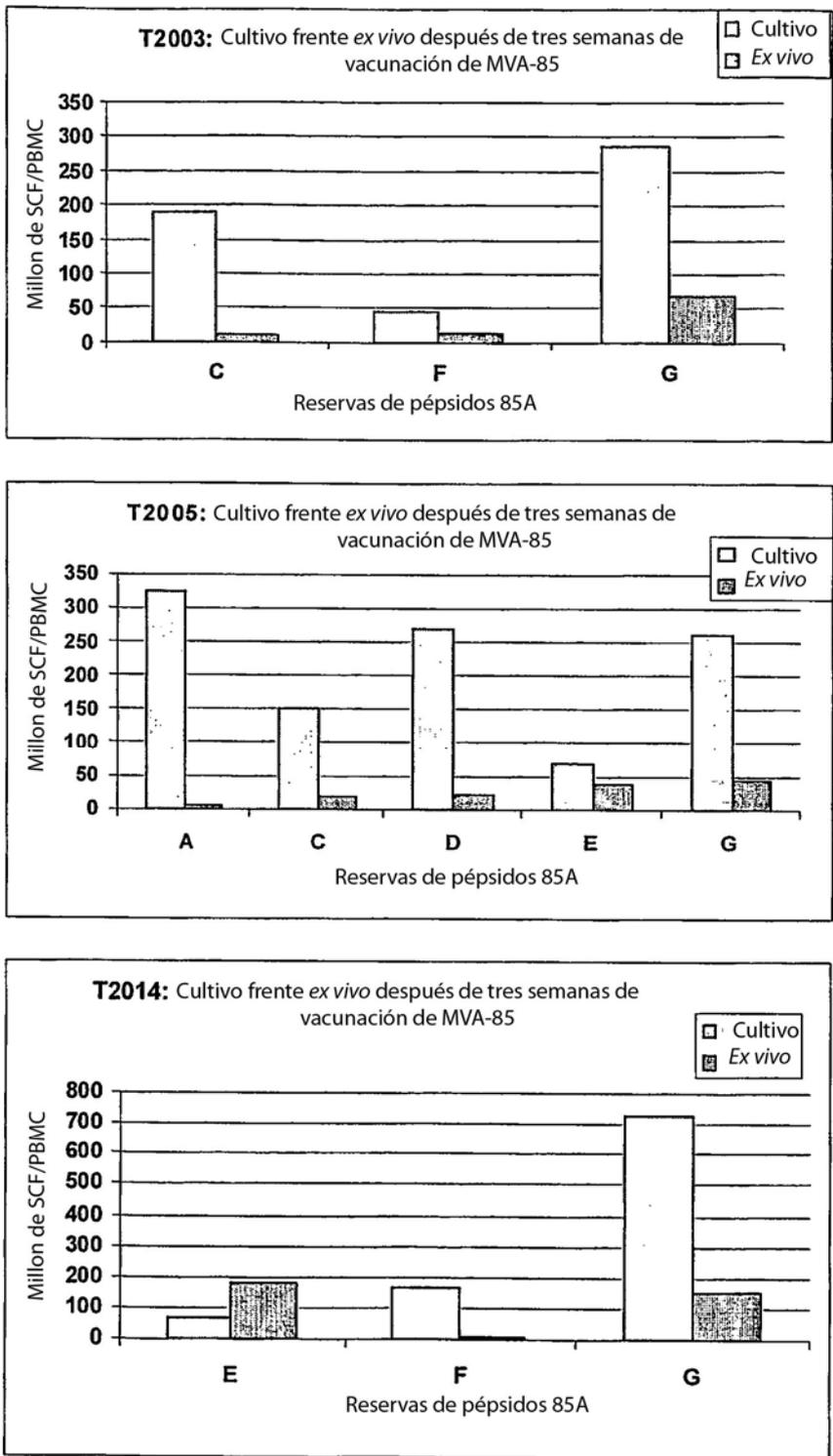


Figura 3



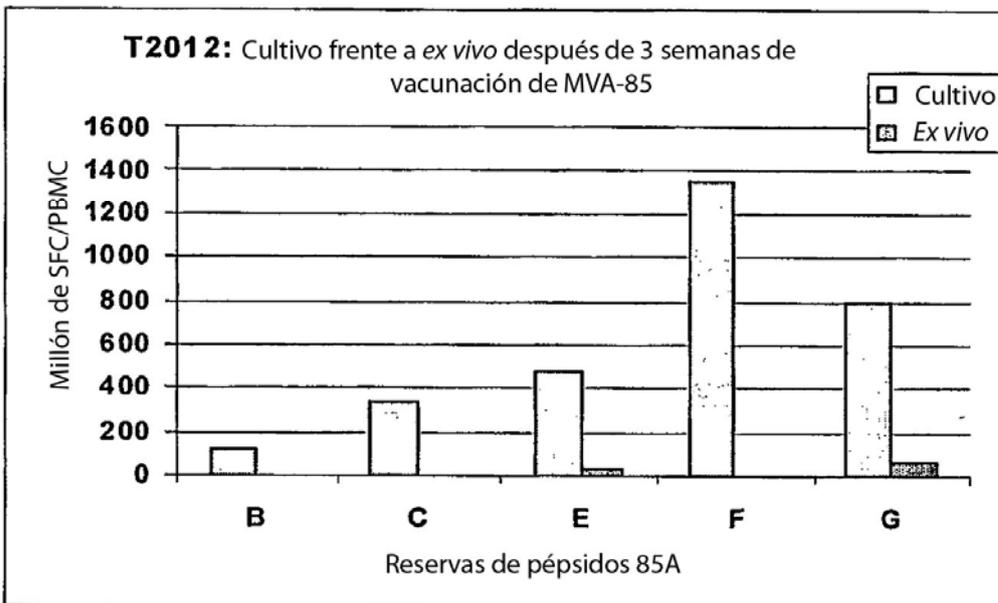
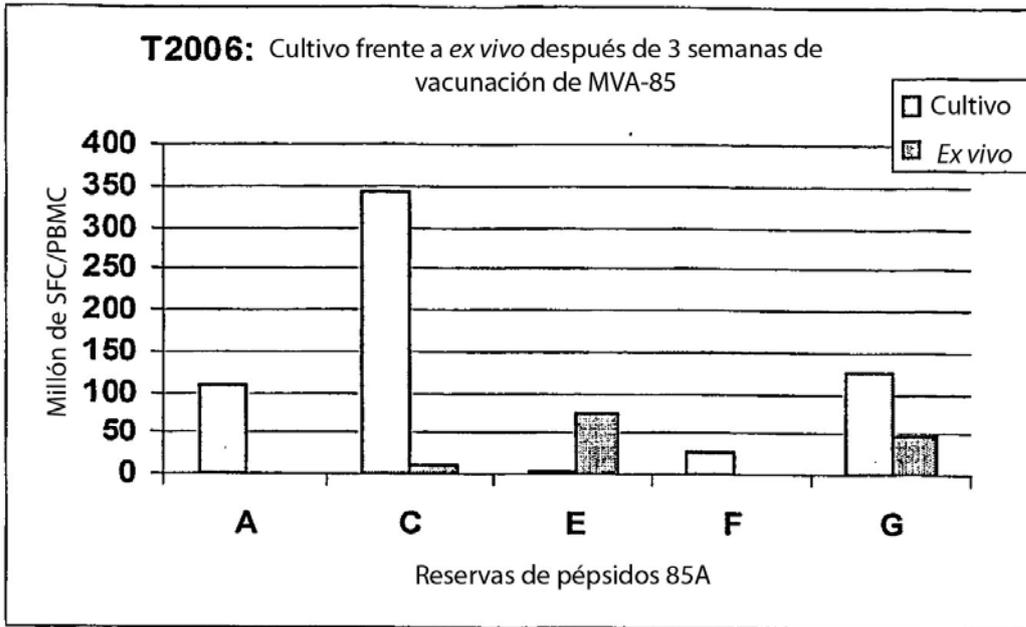


Figura 4

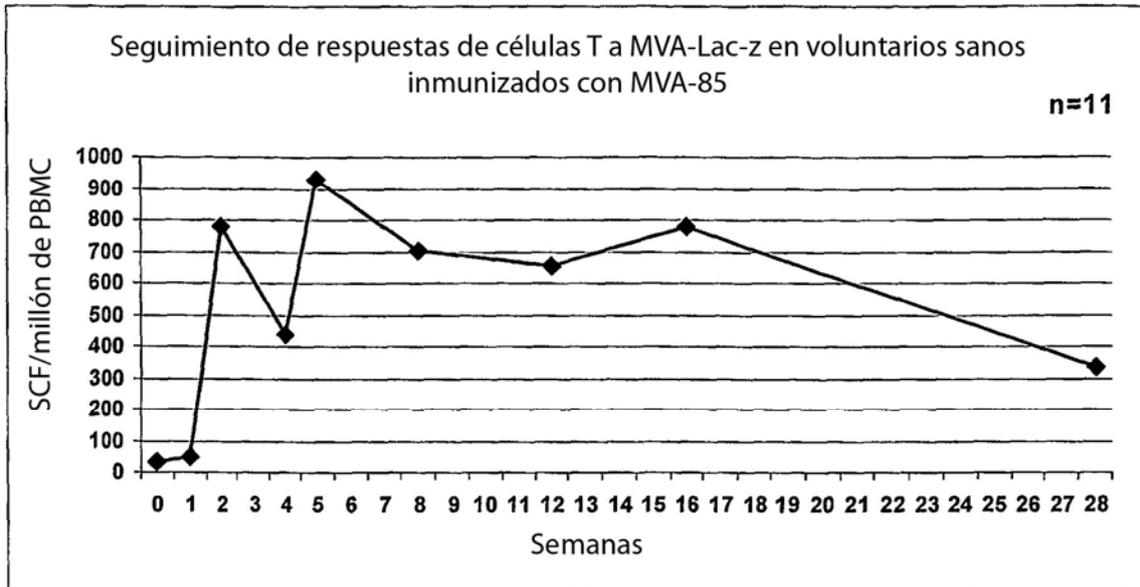


Figura 5a:

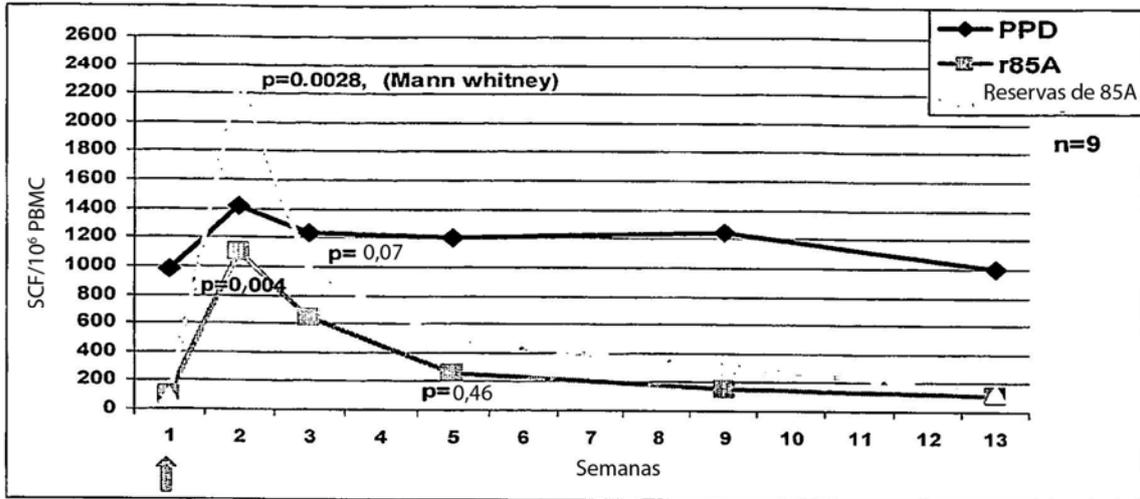


Figura 5b:

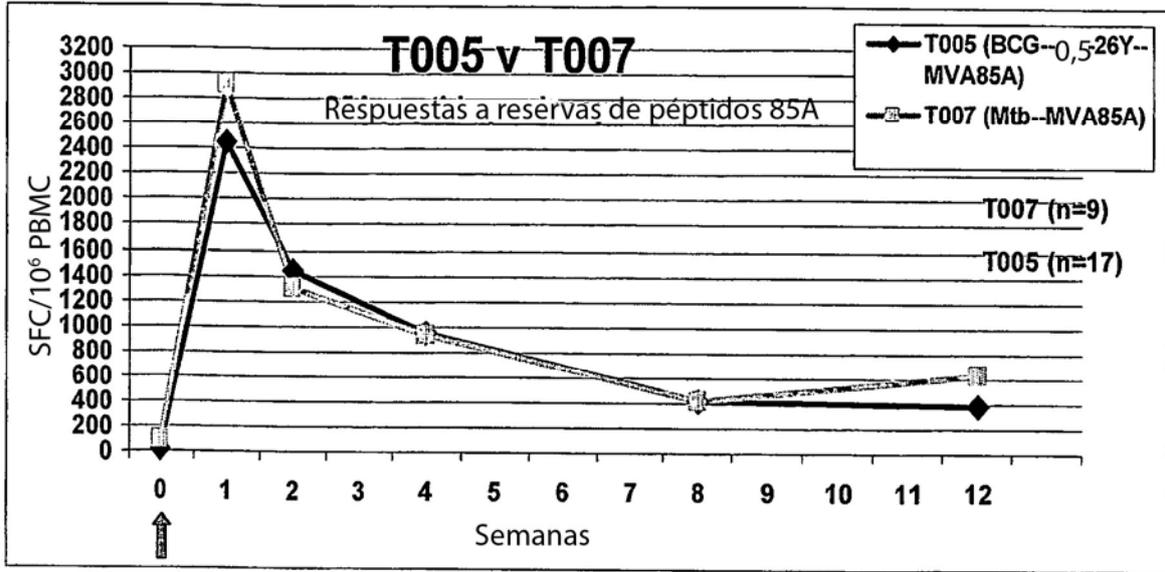


Figura 5c:

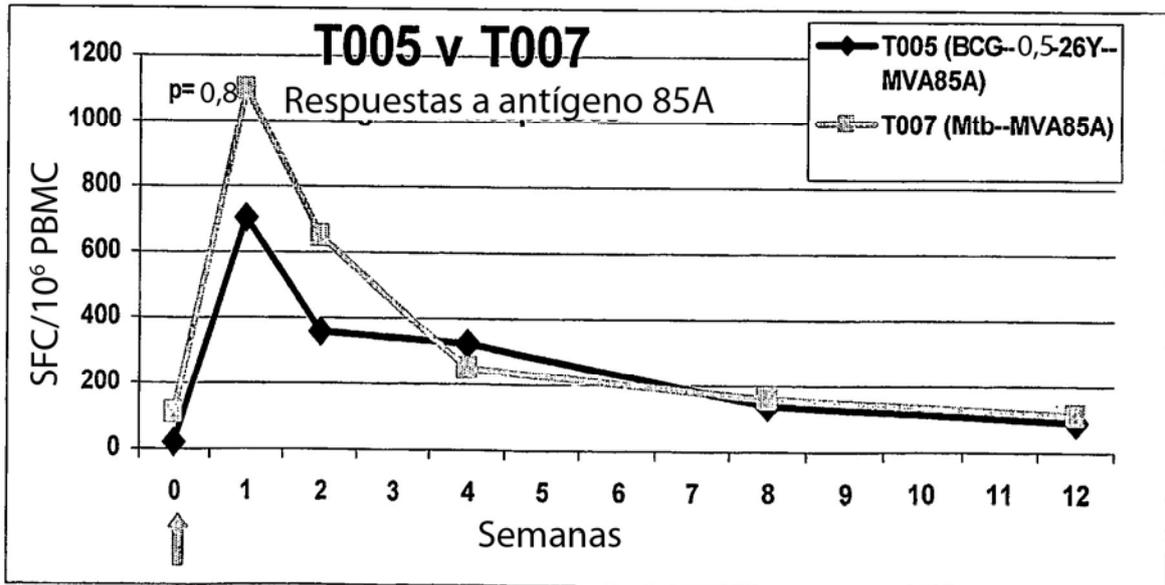


Figura 6a:

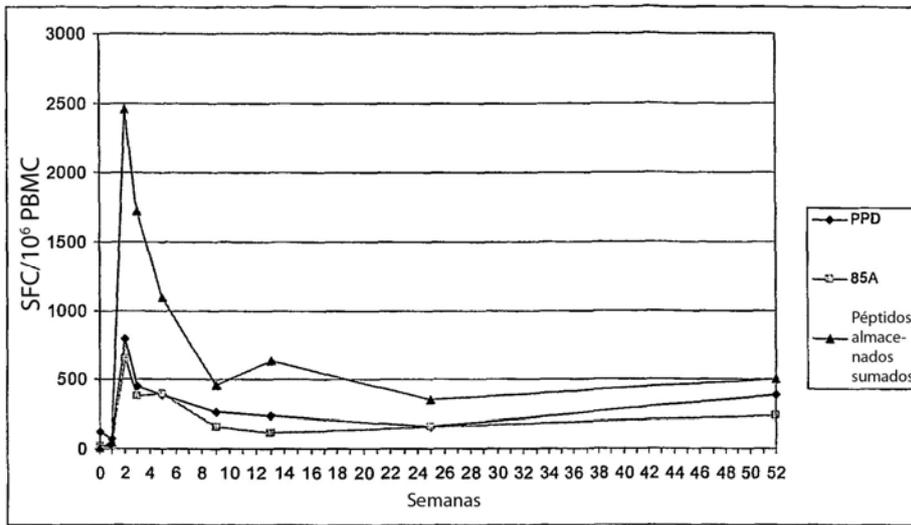


Figura 6b:

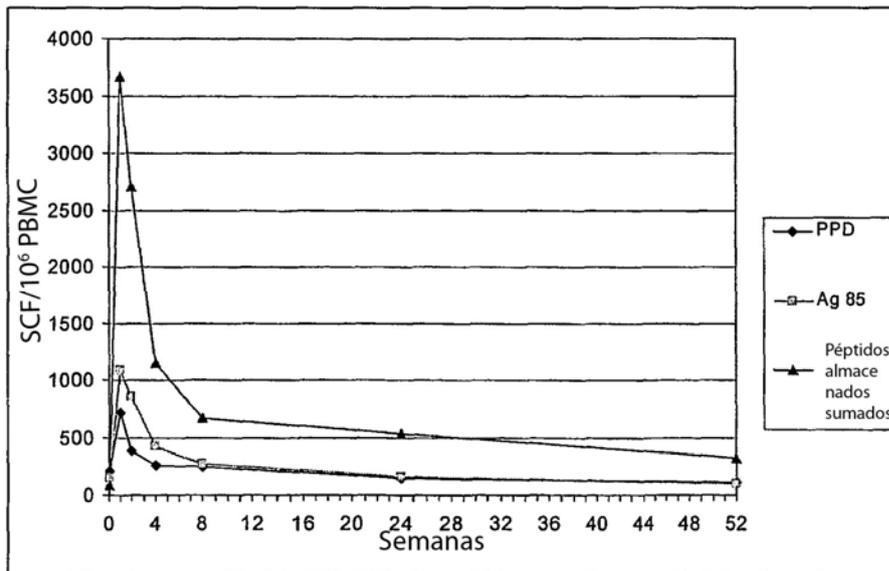


Figura 7a:

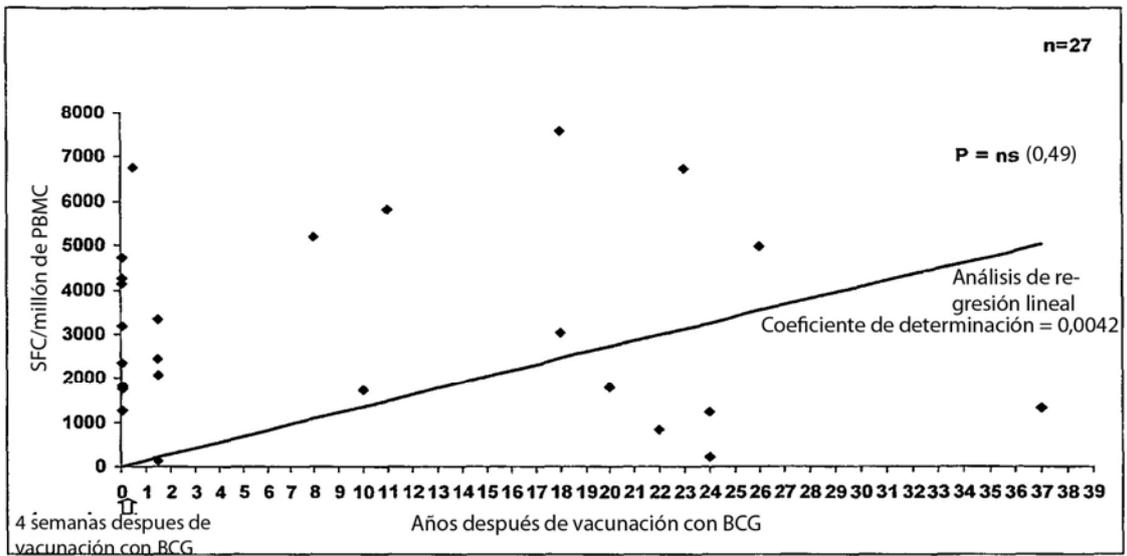


Figura 7b:

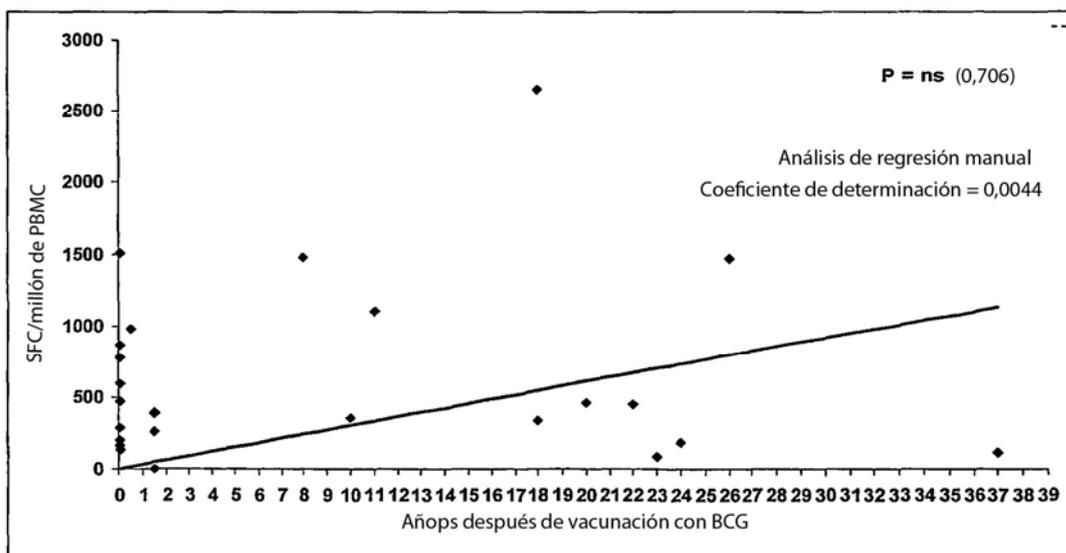


Figura 8a

Respuesta de IFN γ tras vacunación

niveles medios de secreción de IFN γ específica de antígeno en una prueba de estimulación de linfocitos de 3 días (+ error estándar de medida)

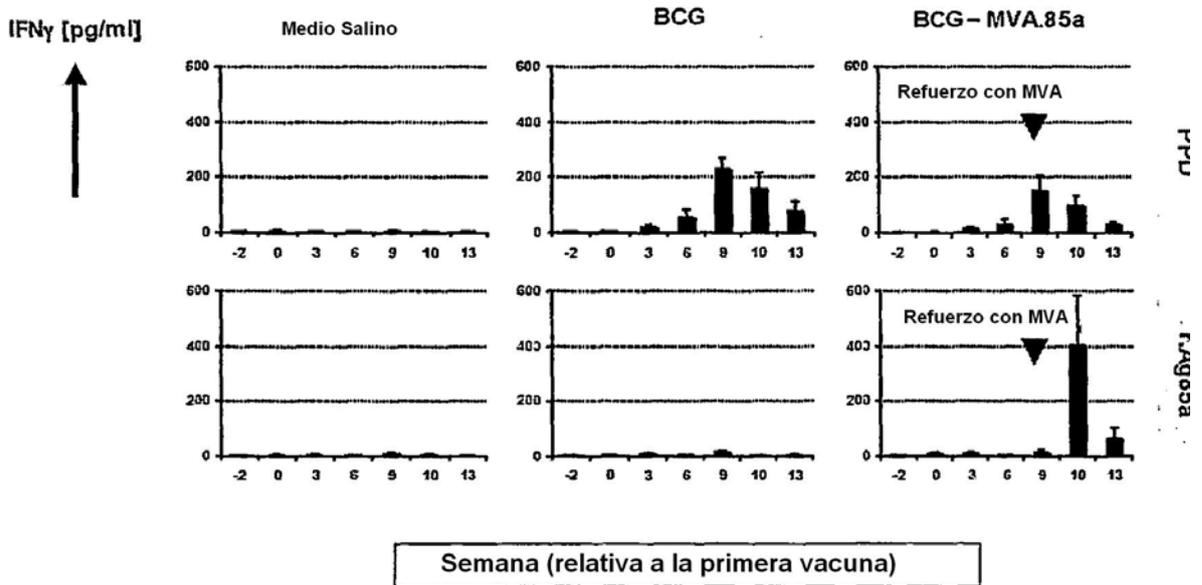


Figura 8b

Respuesta de IFN γ después de la infección

Niveles medios de secreción de IFN γ en una prueba de estimulación de linfocitos de 3 días (+ error estándar de medida). Semana -5 = semana 13 tras inmunización primaria; semana -12: semana 6 tras inmunización primaria; AUT = autopsia

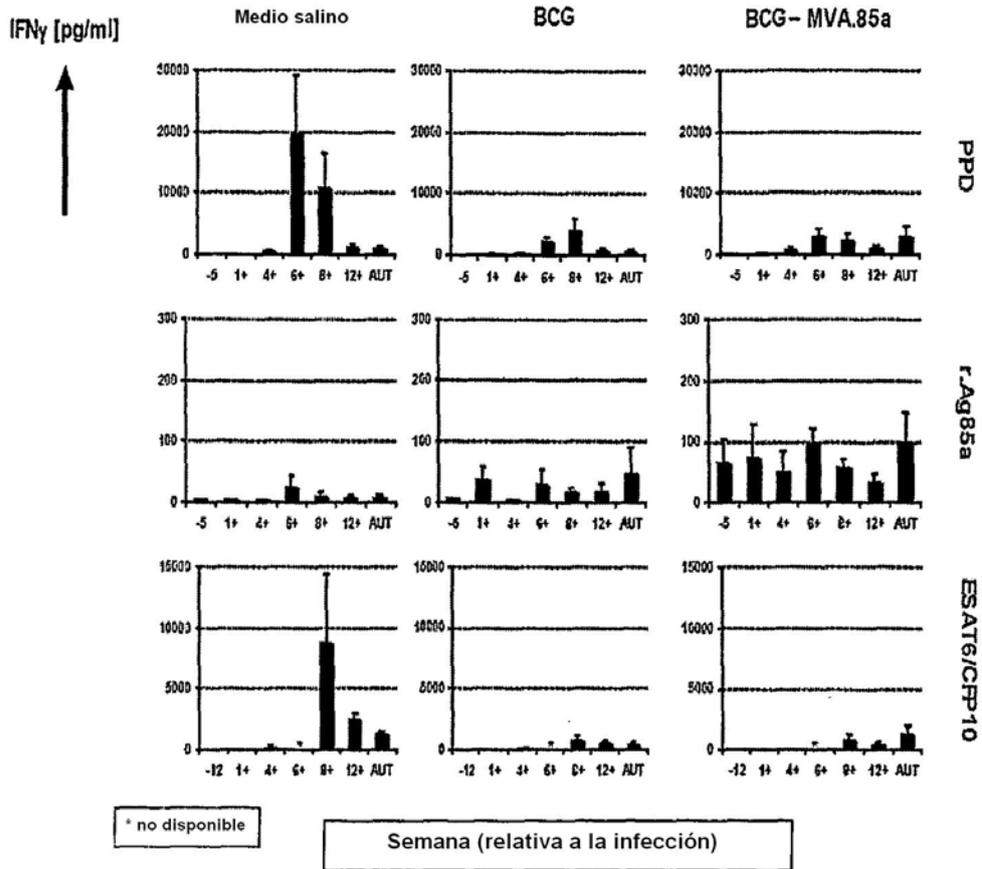


Figura 9a:

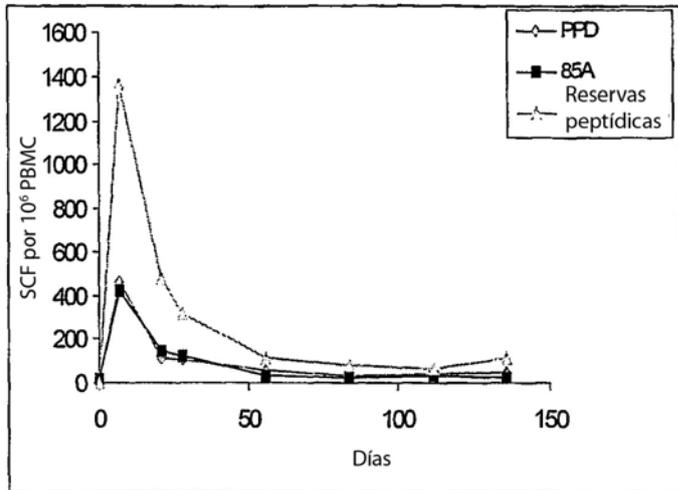


Figura 9b:

