

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 531**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007** **E 07764444 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2040745**

54 Título: **Expansión del repertorio de los linfocitos T para incluir epítomos subdominantes mediante vacunación con antígenos administrados en forma de fragmentos proteicos o cócteles peptídicos**

30 Prioridad:

28.06.2006 DK 200600861

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

10.04.2013

73 Titular/es:

**STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)
ARTILLERIVEJ 5
DK-2300 COPENHAGEN S, DK**

72 Inventor/es:

**AAGAARD, CLAUS;
DIETRICH, JES y
ANDERSEN, PETER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 400 531 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

Expansión del repertorio de los linfocitos T para incluir epítomos subdominantes mediante vacunación con antígenos administrados en forma de fragmentos proteicos o cócteles peptídicos

Campo de la invención

5 La presente invención describe una vacuna contra enfermedades crónicas, tales como una infección bacteriana, vírica o parasitaria, o cáncer, que comprende una mezcla peptídica de péptidos solapantes que abarcan toda la secuencia de aminoácidos de una proteína que se expresa durante la fase crónica de la enfermedad, tal como una infección crónica causada por una bacteria, un virus o un parásito persistente, o de proteínas expresadas en tumores malignos, un método para preparar tales vacunas, y prevenir y tratar una enfermedad crónica.

10 Antecedentes generales

En comparación con el número limitado de enfermedades contra las que están disponibles en la actualidad vacunas, por ahora no se han logrado desarrollar vacunas eficaces contra una gran cantidad, pese a los intentos de desarrollo. Una característica común de muchas de estas enfermedades infecciosas y del cáncer es que se desarrollan lentamente y se manifiestan como enfermedades crónicas, en donde la enfermedad se mantiene durante años a pesar de haber una respuesta inmune del hospedador. Esto produce frecuentemente como resultado una inmunopatología que, en algunos casos tales como con *Chlamydia thracomatis*, es la causa real de la enfermedad humana, tal como una cicatrización inflamatoria del oviducto que produce infertilidad. Para algunas enfermedades, tales como la infección por *M. tuberculosis* (TB), existe una vacuna (BCG), pero a pesar de que la vacuna puede evitar las manifestaciones agudas de la enfermedad, las bacterias no se eliminan y, por lo tanto, se establece una enfermedad crónica o latente. La TB transcurre fundamentalmente en tres fases. Durante la fase aguda, las bacterias proliferan en los órganos, hasta que la respuesta inmune se incrementa hasta el punto en que puede controlar la infección, después de lo cual la carga bacteriana alcanza un máximo y comienza a disminuir. Después de esto, se establece una fase crónica o latente, cuando la carga bacteriana se mantiene estable a un nivel bajo. En esta fase, *M. tuberculosis* pasa de una multiplicación activa a un estado de persistencia lenta o no replicativa, que puede durar muchos años. Sin embargo, en algunos casos de TB, la infección se puede reactivar de repente y el resultado será una enfermedad activa. Los factores que conducen a esta reactivación son en gran parte desconocidos. En otros casos, tales como *Chlamydia*, la infección puede permanecer asintomática, pero el proceso inflamatorio en curso puede causar más tarde manifestaciones clínicas, como la infertilidad.

La respuesta inmune a muchas de estas enfermedades complejas incluye un componente de respuesta inmune humoral y también de respuesta inmune mediada por células (IMC). La respuesta IMC se dirige a una jerarquía de antígenos de linfocitos T y epítomos del agente patógeno. Los epítomos son tramos de aminoácidos (aa) de 7-9 aa (MHC I) y 12-15 aa (MHC II) (1). En una enfermedad crónica vírica y bacteriana, tal como VIH, TB, así como cáncer, la jerarquía de las respuestas a epítomos cambia en el tiempo hasta unos pocos epítomos inmunodominantes que constituyen gradualmente una gran parte de la respuesta total de los linfocitos T, mientras que un gran número de otros epítomos, que tienen todos ellos el potencial para unirse a moléculas presentadoras de antígeno del MHC de clase I o II, son subdominantes o incluso crípticos, lo que da como resultado respuestas de linfocitos T con niveles cercanos o inferiores al nivel de detección (2-6). Si se inducen por vacunación (sin la competencia de los epítomos dominantes), se ha descrito que las respuestas a tales epítomos subdominantes son protectoras, por ejemplo, en la TB (7), lo que indica que los epítomos se expresan de hecho durante la infección natural y pueden ser reconocidos por células efectoras sobre el agente patógeno invasor. Una preocupación importante para el desarrollo actual de vacunas (8), se debe a que se ha sugerido que estas respuestas pueden tener ventajas comparadas con las respuestas a epítomos inmunodominantes, mediante estudios en VIH en donde los mutantes que carecen de epítomos inmunodominantes se fugan y, por lo tanto, el sistema inmune no los detecta.

La utilización de epítomos de linfocitos T subdominantes en el diseño de vacunas ha estado impedida hasta ahora por dos obstáculos principales: i) la necesidad de un gran panel de epítomos diferentes para cubrir una población humana diversa, debido a la variación de los epítomos individuales reconocidos por individuos con diferente composición de HLA; ii) la necesidad de identificar epítomos subdominantes para los que se encuentren solo respuestas de linfocitos T de bajo nivel, próximas o por debajo del nivel de detección de los ensayos inmunológicos (por ejemplo, ELISPOT).

50 Olsen *et al.* (7) han descrito que una vacuna basada en un epítomo subdominante de ESAT6 puede proteger contra la TB. Sin embargo, en este estudio no se utilizó una mezcla de péptidos solapantes que abarca toda la región de ESAT6.

En el documento WO01016163 se describe una vacuna contra un virus que comprende una mezcla de péptidos que consiste en péptidos que activan los linfocitos T, independientemente de su genotipo HLA. Esta solicitud ilustra el uso de mezclas de péptidos procedentes del virus de la hepatitis B, para permitir una amplia cobertura cuando se aplican para la vacunación de una población humana genéticamente diversa, eludiendo de este modo los no respondedores encontrados cuando se inmunizaba con péptidos aislados. Esta invención no ilustra el aumento dirigido con péptidos de linfocitos T dirigidos contra epítomos subdominantes de linfocitos T, pertinentes para la vacunación

profiláctica y terapéutica contra enfermedades crónicas, tal y como se ilustra en la presente invención.

En el documento WO03011331 se describe una vacuna de sensibilización y refuerzo. Para evitar un aumento de la respuesta frente a epítomos dominantes y una disminución de la respuesta frente a epítomos subdominantes, la sensibilización se logra con un vector de ADN o vírico que codifica una cadena de epítomos. Después de la fase de sensibilización, los epítomos se emplean individualmente, en estructuras artificiales separadas o transportados en vehículos separados, para reforzar la respuesta, en lugar de ser administrados en forma de una estructura artificial única de ADN o vírica con poliepítomos. En cambio, la presente invención emplea tramos de secuencias de aminoácidos, que abarcan una proteína completa, en una mezcla de péptidos con un solapamiento de 6-20 aminoácidos, para la sensibilización y, opcionalmente, el refuerzo con la proteína completa, en forma de una vacuna con subunidad auxiliar o expresada en sistemas de administración víricos para, a su vez, obtener una inducción máxima de las respuestas humorales.

Los documentos WO2004/002415 y WO01/16163 describen vacunas contra infecciones crónicas causadas por una infección bacteriana, vírica o parasitaria, o cáncer, que comprenden una mezcla peptídica de péptidos sintéticos solapantes que abarcan la secuencia de un antígeno.

En el documento WO2004/002415, la vacuna se puede administrar junto con un adyuvante y en un preparado liposómico.

En el documento WO01/16163, la vacuna se muestra, por ejemplo, como una mezcla de 18 péptidos de HbcAg emulsionada en adyuvante completo de Freund.

Los documentos WO2004/002415 y WO01/16163 no describen el uso de liposomas catiónicos como un adyuvante alternativo.

En general se observa que en las enfermedades crónicas, la jerarquía de las respuestas a epítomos cambia con el tiempo hasta constituir respuestas a solo unos pocos epítomos dominantes. Sin embargo, como las respuestas contra epítomos subdominantes han resultado ser protectoras (7) y puesto que una respuesta contra estos epítomos no está causada por la enfermedad crónica en sí, una enfermedad crónica representa un objetivo obvio para una invención en donde se induce una respuesta inmune frente a una amplia gama de epítomos, incluidos los epítomos dominantes y, con mayor importancia, los subdominantes.

Compendio de la invención

La presente invención describe vacunas que inducen un amplio reconocimiento de respuestas dominantes y subdominantes frente a cualquier antígeno dado. La vacuna comprende fragmentos solapantes del antígeno deseado en adyuvantes apropiados. El repertorio de linfocitos T aumenta de este modo para incluir no solo el epítopo inmunodominante reconocido cuando se emplea la molécula intacta para la inmunización o inducido por la infección crónica en sí, sino también para inducir a su vez una respuesta mucho más amplia y equilibrada frente a un número de epítomos subdominantes. La principal ventaja de la presente invención es que no requiere ningún conocimiento previo de la localización precisa o de la identidad de los epítomos subdominantes ni su reconocimiento en una población humana, sino que aumenta el repertorio de linfocitos T y, por lo tanto, el número total de linfocitos T específicos para la diana, sensibilizados por la vacunación, desde unos pocos epítomos inmunodominantes hasta múltiples epítomos. Tal y como se describe en la presente invención, teniendo como objetivo enfermedades crónicas con una amplia gama de respuestas frente a epítomos subdominantes, se aprovecha muy eficazmente la inmunidad frente a estas enfermedades.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe una vacuna contra una enfermedad crónica que comprende una mezcla de péptidos que consiste en péptidos adyacentes solapantes que abarcan la secuencia completa de aminoácidos de una proteína que se expresa durante la fase crónica de la enfermedad, que comprende también un adyuvante, en donde el adyuvante es un liposoma catiónico.

Los péptidos tienen una longitud de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 12-20 aminoácidos, en donde el solapamiento con el péptido adyacente es de 6-20 aminoácidos, preferiblemente 10-12 aminoácidos.

La proteína antigénica que abarca la mezcla de péptidos se escoge entre proteínas que se expresan durante la fase crónica de una enfermedad, e induce una respuesta inmune mediada por células, en el caso de que la enfermedad sea crónica.

Preferiblemente, la proteína se selecciona a partir de una bacteria tal como una micobacteria virulenta, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* o *Chlamydia trachomatis* o un virus, tal como el de la hepatitis B o C, o un parásito tal como *Leishmania* o el parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum*, o a partir de moléculas expresadas en tumores malignos.

Los péptidos se obtienen preferiblemente a partir de una proteína seleccionada a partir de *M. tuberculosis*, tal como

ESAT6, Ag85A, Ag85B o TB10.4, o a partir de *Chlamydia trachomatis*, tal como CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 o CT681, o a partir del virus de la hepatitis B o C, o a partir de *Plasmodium falciparum*, tal como Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 o CSP, pero no se limitan a estos.

5 La invención también describe un método para preparar una mezcla de péptidos de acuerdo con la invención mediante la escisión proteolítica de la proteína con dos o más agentes de escisión proteolíticos, tales como enzimas proteolíticas, como una tripsina, proteasa V-8, AspN o quimotripsina, o agentes químicos como CNBr o BNPS-escatol.

10 La mezcla de péptidos de acuerdo con la invención se puede utilizar para preparar una vacuna contra una enfermedad crónica tal como una infección bacteriana, vírica o parasitaria, o cáncer. La vacuna comprende un sistema de administración tal como un adyuvante. El adyuvante se basa en liposomas catiónicos tales como bromuro de dime-tildioctadecilamonio/dibehenato de trehalosa (DDA/TDB). La mezcla de péptidos empleada para la vacunación se puede mezclar con liposomas formados previamente o cada péptido se puede mezclar con los liposomas formados previamente y los péptidos individuales formulados en los liposomas se mezclan a continuación, antes de la inmunización.

15 Cada péptido en la mezcla de péptidos se puede mezclar preferiblemente de forma individual con el liposoma, antes de preparar la mezcla de péptidos, para obtener una interacción óptima con las células presentadoras de antígenos individuales del sistema inmune, lo que garantiza unas respuestas máximas frente a todos los posibles epítomos en la molécula.

20 La invención también describe el uso de la vacuna en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento terapéutico de una enfermedad crónica en un animal, incluido un ser humano, que comprende administrar al animal la vacuna de la invención. Opcionalmente, la prevención o el tratamiento se refuerza mediante la administración de una segunda vacuna que comprende la proteína de tamaño completo abarcada por la mezcla peptídica en un adyuvante, o expresada en un sistema de administración vírico o como una vacuna de ADN puro, para reforzar de forma óptima una IMC, así como una respuesta humoral.

25 La invención también describe una vacuna en la que la secuencia de aminoácidos está sometida a lipidación o conjugada directamente con un agonista de TLR, tal como CPG, a fin de permitir un efecto autoadyuvante del polipéptido.

La realización preferida de la invención es una vacuna que comprende una mezcla de péptidos de la invención, preferiblemente con un adyuvante tal y como se ha descrito anteriormente.

30 **Definiciones**

Enfermedad crónica

35 Una enfermedad crónica es una enfermedad de larga duración o recurrente. El término *crónica* describe el curso de la enfermedad, o su tasa de aparición y desarrollo. Un curso crónico se distingue de un curso recurrente; las enfermedades recurrentes vuelven a aparecer repetidamente, con períodos de remisión intermedios. Las infecciones crónicas pueden estar causadas por bacterias, p. ej., *Mycobacteria sp.* o *Chlamydia sp.*, entre otras, por virus, p. ej., de la hepatitis o VIH, por un parásito, p. ej., un parásito causante de la malaria o *Leishmania*, o por enfermedades tales como cáncer, diabetes, etc.

Péptidos

40 La palabra "péptido" en la presente invención debe tener su significado habitual. Es una cadena de aminoácidos de cualquier longitud que es una parte o fragmento de una proteína, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces covalentes peptídicos.

45 El péptido puede estar modificado químicamente por glicosilación, por lipidación (por ejemplo, lipidación química con palmitoiloxi succinimida, tal y como se describe en (9), marcado con PAM3Cys (18) o con cloruro de dodecanoilo, tal y como se describe en (10)), por inclusión de grupos prostéticos o por contener aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un marcador his o un péptido señal, o por conjugación directa con un agonista de TLR (por ejemplo, tal y como se describe en (11)).

50 Cada péptido puede estar caracterizado de este modo por aminoácidos específicos y puede ser codificado por secuencias específicas de ácidos nucleicos. Se entenderá que tales secuencias incluyen análogos y variantes producidos por métodos recombinantes o sintéticos, en los que tales secuencias de polipéptidos se han modificado por sustitución, inserción, adición o delección de uno o varios residuos de aminoácidos en el polipéptido recombinante y todavía siguen siendo inmunógenas en cualquiera de los ensayos biológicos descritos en este documento. Las sustituciones son preferiblemente "conservadoras". Estas se definen de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna, se pueden sustituir entre sí. Los aminoácidos en la tercera columna se indican con el código de una letra.

ALIFÁTICO	Apolar	GAP
		ILV
	Polar sin carga	CSTM
		NQ
	Polar con carga	DE
KR		
AROMÁTICO		HFVY

Una mezcla de péptidos es una mezcla líquida de fragmentos de una proteína.

5 Una mezcla de péptidos preferida en la presente invención se basa en una proteína procedente de *M. tuberculosis*, tal como ESAT6, Ag85A, Ag85B o TB10.4, o procedente de *Chlamydia trachomatis*, tal como CT184, CT521, CT443, CT520, CT521 o CT375, o procedente de un virus de la hepatitis o de *Plasmodium falciparum*, tal como momp, omp, msp1, msp3, ama1 o glurp. También puede ser una mezcla de péptidos o un digerido proteolítico que se basa en una molécula de fusión, p. ej., tal como se ha descrito previamente como estructuras artificiales de vacunas pertinentes contra la TB en el documento PCT/DK2006/000356. En general todas las mezclas de péptidos de proteínas que inducen una respuesta IMC que se pueden utilizar en vacunas contra una enfermedad crónica, se pueden utilizar como vacunas para inducir una mayor respuesta profiláctica o terapéutica.

10 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprende", o variaciones de esta, tales como "comprenden" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o un número entero o un grupo de elementos o números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros.

15 Aunque se ha demostrado que la longitud mínima de un epítipo de linfocito T es de al menos 6 aminoácidos, es normal que dichos epítopos estén constituidos por tramos más largos de aminoácidos. Por lo tanto, se prefiere que el fragmento de polipéptido de la invención tenga una longitud de al menos 7 residuos de aminoácidos, tal como al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 24 y al menos 30 residuos de aminoácidos. Por lo tanto, en realizaciones importantes del método inventivo, se prefiere que el fragmento de polipéptido tenga una longitud como máximo de 50 residuos de aminoácidos, tal como máximo 40, 35, 30, 25 y 20 residuos de aminoácidos. Se espera que los péptidos con una longitud de entre 10 y 20 residuos de aminoácidos resulten ser más eficaces como epítopos de la clase II del MHC y, por lo tanto, las longitudes especialmente preferidas del fragmento de polipéptido utilizado en el método inventivo son 18, tal como 15, 14, 13, 12 e incluso 11 residuos de aminoácidos. Se espera que los péptidos con una longitud de entre 7 y 12 residuos de aminoácidos resulten ser más eficaces como epítopos de la clase I del MHC y, por lo tanto, las longitudes especialmente preferidas del fragmento de polipéptido utilizado en el método inventivo son 11, tal como 10, 9, 8 e incluso 7 residuos de aminoácidos.

Epítopos

30 Por epítopos de linfocitos T se entiende una secuencia de aminoácidos que es reconocida por linfocitos T específicos a través de su receptor de linfocitos T, después de la presentación por parte de una célula presentadora de antígeno, en el contexto de la clase I o II del MHC.

Un epítipo dominante es una secuencia de aminoácidos que, cuando forma parte de una proteína, induce una respuesta fuerte de los linfocitos T y frecuentemente la mayoría de las respuestas frente a un antígeno se dirigen a unos pocos epítopos dominantes de los linfocitos T.

35 Un epítipo subdominante es una secuencia de aminoácidos que, cuando forma parte de una proteína, no induce una respuesta fuerte de los linfocitos T, aunque los epítopos sean inmunógenos y capaces de inducir una respuesta significativa de los linfocitos T cuando se aíslan de la proteína.

Por mezcla de polipéptidos o fragmentos de proteínas solapantes se entiende una mezcla de 10 a 30 meros, con un solapamiento de 6-20 aminoácidos, que abarca una proteína completa.

40 Variantes

Una característica común de los polipéptidos de la invención es su capacidad para inducir una respuesta inmunológica tal como se ilustra en los ejemplos. Se entiende que una variante de un polipéptido de la invención, producida por sustitución, inserción, adición o delección, también puede ser inmunógena, tal y como se determina por cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria.

Individuo inmune

Un individuo inmune se define como una persona o un animal, que ha eliminado o controlado una infección.

Respuesta inmune

La respuesta inmune se puede controlar por uno de los métodos siguientes:

- 5 • Una respuesta celular *in vitro* se determina mediante la inducción de la liberación de una citocina pertinente, tal como IFN- γ , o la inducción de la proliferación en linfocitos extraídos de un animal o de un ser humano, que actual o previamente han sido infectados con micobacterias virulentas o inmunizados con la mezcla de péptidos pertinente. La inducción se realiza mediante la adición de la mezcla de péptidos o la porción inmunógena de la mezcla a una suspensión que comprende desde 2×10^5 células hasta 4×10^5 células por pocillo. Las células se aíslan a partir de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos, el hígado o el pulmón, y la adición del polipéptido o de la porción inmunógena da como resultado una concentración no superior a 20 μg por ml de suspensión y la estimulación se realiza durante de dos a cinco días. Para vigilar la proliferación celular, las células se someten a pulsos de timidina marcada radiactivamente y después de 16-22 horas de incubación, la detección de la proliferación se mide por recuento mediante centelleo líquido. Una respuesta positiva se define como una respuesta mayor que el ruido de fondo más dos desviaciones estándar. La liberación de IFN- γ se puede determinar por el método ELISA, que es bien conocido por una persona experta en la técnica. Una respuesta positiva es una respuesta superior al ruido de fondo más dos desviaciones estándar. Otras citocinas distintas de IFN- γ podrían ser relevantes cuando se controla la respuesta inmunológica frente al polipéptido, tal como IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β . Otro método más sensible para la detección de la respuesta inmune es el método ELISpot, en el que se determina la frecuencia de las células productoras de IFN- γ . En una placa de ELISpot (MAHA, Millipore), recubierta previamente con anticuerpos de IFN- γ anti-múrido (PharMingen), se incuban cantidades progresivas de células aisladas a partir de sangre, bazo o pulmón (típicamente entre 1 y 4×10^5 células/pocillo) durante 24-32 horas en presencia de la mezcla de péptidos o de la porción inmunógena, lo cual da como resultado una concentración no superior a 20 μg por ml. Las placas se incuban posteriormente con anticuerpos anti-IFN- γ biotinilados y a continuación se someten a una incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina. Las células productoras de IFN- γ se identifican mediante la adición de BCIP/NBT (Sigma), en donde el sustrato correspondiente da lugar a manchas. Estas manchas se pueden contar utilizando un microscopio de disección. También es posible determinar la presencia de ARNm que codifica la citocina pertinente, mediante el uso de la técnica PCR. Por lo general, se miden una o varias citocinas utilizando, por ejemplo, PCR, ELISPOT o ELISA. Una persona experta en la técnica apreciará que un aumento o una disminución significativa en la cantidad de cualquiera de estas citocinas inducidas por una mezcla de péptidos específica, se puede utilizar en la evaluación de la actividad inmunológica del polipéptido.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35 • Una respuesta celular *in vitro* también se puede determinar mediante el uso de líneas de linfocitos T obtenidas a partir de un individuo inmune o de una persona infectada, en donde las líneas de linfocitos T se han estimulado ya sea con bacterias vivas, extractos de la célula bacteriana o material filtrado de un cultivo de 10 a 20 días con la adición de IL-2. La inducción se realiza mediante la adición de como máximo 20 μg de mezcla de péptidos por ml de suspensión a las líneas de linfocitos T que contienen de 1×10^5 células a 3×10^5 células por pocillo y la incubación se realiza durante de dos a seis días. La inducción del IFN- γ o la liberación de otra citocina pertinente se detecta por ELISA. La estimulación de los linfocitos T también se puede controlar mediante la detección de la proliferación celular, usando timidina marcada radiactivamente, tal y como se ha descrito anteriormente. Para ambos ensayos una respuesta positiva es una respuesta superior al ruido de fondo más dos desviaciones estándar.
- 40
- 45 • Una respuesta celular *in vivo* se puede determinar como una respuesta DTH positiva después de una inyección intradérmica o de la aplicación local de un parche con, como máximo, 100 μg del polipéptido o la porción inmunógena, a un individuo que está clínica o subclínicamente infectado con una bacteria virulenta, en donde una respuesta positiva tiene un diámetro de al menos 5 mm, 72-96 horas después de la inyección o aplicación.
- 50 • Una respuesta humoral *in vitro* se determina por una respuesta específica con anticuerpos en un individuo inmune o infectado. La presencia de anticuerpos se puede determinar por una técnica de ELISA o una transferencia Western, en donde la mezcla de péptidos o la porción inmunógena es absorbida ya sea por una membrana de nitrocelulosa o por una superficie de poliestireno. El suero se diluye preferiblemente en PBS desde 1:10 hasta 1:100 y se añade a la mezcla de péptidos absorbida y la incubación se realiza durante de 1 a 12 horas. Empleando anticuerpos secundarios marcados, se puede determinar la presencia de anticuerpos específicos midiendo la DO, por ejemplo, con ELISA, en donde una respuesta positiva es una respuesta superior al ruido de fondo más dos desviaciones estándar o, como alternativa, una respuesta visual en una transferencia Western.
- 55 • Otro parámetro relevante es la medición de la protección en modelos animales inducida después de la vacunación con la mezcla de péptidos en un adyuvante, o después de la vacunación con ADN. Los modelos animales adecuados incluyen primates, cobayas o ratones, que se exponen a una infección. El parámetro indicador de una protección inducida podría ser la disminución de la carga bacteriana en los órganos diana en comparación con animales no vacunados, tiempos de supervivencia prolongados en comparación con animales no vacunados y menor pérdida de peso en comparación con animales no vacunados.

Métodos de preparación

En general, los antígenos y las secuencias de ADN que codifican dichos antígenos, se pueden preparar usando cualquiera de diversos procedimientos.

5 La mezcla de péptidos se puede producir sintéticamente cuando el fragmento peptídico tiene menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de 50 aminoácidos y se puede generar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como las técnicas en fase sólida disponibles comercialmente, en donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento.

10 En la construcción y la preparación de ADN plasmídico que codifica la mezcla de péptidos, tal y como se define en la invención, para la vacunación con ADN, se puede utilizar una cepa hospedadora tal como *E. coli*. El ADN plasmídico se puede preparar a continuación a partir de cultivos de la cepa hospedadora que es portadora del plásmido de interés, y purificar utilizando, por ejemplo, el kit de columna Giga-Plasmid de Qiagen (Qiagen, Santa Clarita, CA, EE. UU.) que incluye una etapa de eliminación de endotoxinas. Se prefiere que el ADN plasmídico utilizado para la vacunación con ADN, esté exento de endotoxinas.

15 Digestión con proteasas de los antígenos

Un conjunto de péptidos solapantes se puede preparar por escisión proteolítica de la proteína intacta que se puede expresar como una proteína recombinante marcada, por ejemplo, en *E. coli*, seguida de una purificación por cromatografía en columna, tal como cromatografía con quelatos metálicos. Se pueden seleccionar dos o varios agentes de escisión proteolítica de modo que se generen diferentes fragmentos y, de este modo, un cóctel de péptidos solapantes. Se pueden utilizar enzimas proteolíticas, tales como tripsina, proteasa V-8, AspN o quimotripsina, o agentes químicos como CNBr o BNPS-escatol. El número de sitios de corte y la longitud de los fragmentos generados son determinados por la secuencia de aminoácidos de la proteína y el agente de escisión específico, por ejemplo, Asp-N hidroliza las proteínas en el lado N-terminal de residuos de ácido aspártico y ácido cisteico. La proteasa V-8 escinde en el lado carboxilo del ácido glutámico en tampón de bicarbonato de amonio a pH 7,8. Para las enzimas proteolíticas es posible el acoplamiento de la enzima a perlas antes de la escisión (16), y este acoplamiento permitirá la eliminación de la enzima después de finalizar la escisión mediante centrifugación de las perlas. Como alternativa, la proteasa se puede eliminar de la mezcla de digestión por métodos cromatográficos, tales como filtración en gel o HPLC de fase inversa. Después de la digestión de la proteína, se realiza un análisis por espectrometría de masas del producto de la digestión, para confirmar que la escisión de la proteína ha tenido lugar tal y como se había previsto. Finalmente, las dos mezclas de la digestión se pueden combinar para formar una mezcla de péptidos solapantes.

Vacuna proteica

Una vacunación con una proteína recombinante inducirá una respuesta de los linfocitos T hacia un número limitado de epítopos peptídicos dominantes dentro de esta proteína. Por el contrario, la vacunación con una mezcla de péptidos solapantes, que abarca la secuencia de aminoácidos completa de la proteína, generará una respuesta de los linfocitos T contra un mayor número de epítopos, siendo los epítopos peptídicos tanto dominantes como subdominantes.

La invención se refiere a una composición de vacuna que comprende una mezcla de péptidos de acuerdo con la invención. Con el fin de garantizar un rendimiento óptimo de tal composición de vacuna, se prefiere que comprenda un portador, vehículo o adyuvante inmunológica y farmacéuticamente aceptable.

40 Una vacuna eficaz, en la que una mezcla de péptidos de la invención es reconocida por el animal, será capaz en un modelo animal de disminuir la carga bacteriana en los órganos diana, prolongar el tiempo de supervivencia y/o disminuir la pérdida de peso después de la exposición a un organismo infeccioso, en comparación con animales no vacunados, cuando se administra como una vacuna preventiva o terapéutica.

45 Los vehículos adecuados se seleccionan entre el grupo que consiste en un diluyente y un agente de suspensión. El adyuvante se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en DDA, Quil A, poli I:C, hidróxido de aluminio, adyuvante incompleto de Freund, IFN- γ , IL-2, IL-12, lípido A monofosforilo (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), TDB y muramil-dipéptido (MDP).

Un adyuvante se define como una sustancia que mejora de forma no específica la respuesta inmune frente a un antígeno. Dependiendo de la naturaleza del adyuvante, puede favorecer una respuesta inmune mediada por células, una respuesta inmune humoral o una mezcla de las dos. Dado que la mejora de la respuesta inmune no es específica, se entiende en la materia que el mismo adyuvante puede usarse con diferentes antígenos para potenciar respuestas contra diferentes dianas, por ejemplo, con un antígeno procedente de *M. tuberculosis* para potenciar la inmunidad contra *M. tuberculosis* o con un antígeno obtenido a partir de un tumor, para potenciar la inmunidad contra tumores de ese tipo específico.

55 "Liposomas" se definen como estructuras vesiculares cerradas, formadas por una o varias bicapas lipídicas que

rodean un núcleo acuoso. Cada bicapa lipídica está compuesta por dos monocapas lipídicas, cada una de las cuales tiene una región de "cola" hidrófoba y una región de "cabeza" hidrófila. En la bicapa, las "colas" hidrófobas de las monocapas lipídicas se orientan hacia el interior de la bicapa, mientras que las "cabezas" hidrófilas se orientan hacia el exterior de la bicapa. Los liposomas pueden tener diversas propiedades fisicoquímicas, tales como el tamaño, la composición lipídica, la carga superficial, la fluidez y el número de membranas bicapa. De acuerdo con el número de bicapas lipídicas, los liposomas pueden clasificarse como vesículas unilamelares (VU) que comprenden una única bicapa lipídica o vesículas multilamelares (VML) que comprenden dos o más bicapas concéntricas cada una separada de la siguiente por una capa de agua. Los compuestos solubles en agua quedan atrapados en las fases acuosas/núcleo de los liposomas, al contrario que los compuestos lipófilos que quedan atrapados en el núcleo de las membranas de la bicapa lipídica.

La mezcla de péptidos usada para la vacunación se puede mezclar con liposomas formados previamente, tal y como se ha descrito anteriormente (documento WO2006002642) o cada péptido se puede mezclar con los liposomas formados previamente de la misma manera, los péptidos individuales formulados en los liposomas se mezclan después, antes de la inmunización.

La preparación convencional de liposomas es disolviendo los lípidos en un disolvente orgánico que luego se evapora hasta sequedad para obtener una película lipídica fina en el interior del tubo de ensayo. La película lipídica seca se hidrata a continuación en una cantidad apropiada de fase acuosa y la mezcla se calienta por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos y se permite que se "hinche". Los liposomas resultantes que consisten en vesículas multilaminares (VML) se dispersan agitando el tubo de ensayo.

Existen diferentes principios para que se produzca la interacción de un péptido o mezclas de péptidos con liposomas. Un método es la asociación superficial (mediante interacciones electrostáticas o hidrófobas) de los péptidos con los liposomas, incubando los péptidos con liposomas reformados (19). También es posible realizar un acoplamiento covalente de los péptidos con la superficie de los liposomas mediante reticulación química (por ejemplo, tal y como se describe en la referencia 20). Además, los péptidos se pueden encapsular en los liposomas a través de diferentes métodos. Un método es añadir los péptidos directamente en la película lipídica y a continuación rehidratar. Otro método describe la adición de los péptidos al tampón utilizado para la rehidratación de los liposomas desde la película lipídica. Además, los péptidos pueden estar encapsulados por el método de deshidratación-rehidratación (21) en el que un péptido se encapsula mediante secado por congelación, seguido de rehidratación de los liposomas liofilizados. Como alternativa, el antígeno se encapsula usando la técnica de congelación y descongelación, descrita por Pick (22) y Bally *et al.*, en el documento de patente de EE. UU. n.º 4.975.282. En esta técnica, las vesículas se mezclan con el antígeno proteico y se congelan rápida y repetidamente en nitrógeno líquido y se calientan a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase principal de los lípidos pertinentes. Las vesículas pueden procesarse adicionalmente para eliminar cualquier antígeno no atrapado, p. ej., mediante lavado y centrifugación.

Finalmente, la mezcla de péptidos puede ser entregada por los liposomas de dos maneras. Los péptidos pueden estar mezclados antes de la interacción con los liposomas o los péptidos pueden mezclarse después de la interacción de los péptidos individuales con los liposomas, tal y como se ha descrito anteriormente.

Los péptidos también se pueden encapsular en los liposomas añadiendo los péptidos al tampón utilizado para la rehidratación de los liposomas, desde una película lipídica o en forma liofilizada.

El polipéptido también se puede modificar químicamente por medio de glicosilación, lipidación (por ejemplo, mediante lipidación química con palmitoiloxisuccinimida, tal y como describen Mowat *et al.* 1991, marcando con PAM3Cys (18) o con cloruro de dodecanoilo como describen Lustig *et al.* 1976), por inclusión de grupos prostéticos o por conjugación directa con un agonista de TLR (por ejemplo, tal y como se describe en Seder 2006).

La preparación de vacunas que contienen secuencias peptídicas como ingredientes activos es generalmente bien conocida en la técnica, como se ejemplifica en los documentos de patentes de EE. UU. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231 y 4.599.230.

Otros métodos para lograr un efecto adyuvante para la vacuna, incluyen el uso de agentes tales como hidróxido o fosfato de aluminio (alúmina), polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol), agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento térmico, agregación por reactivación con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina para albúmina, mezcla con células bacterianas tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas, emulsión en vehículos aceitosos fisiológicamente aceptables, tales como monooleato de manida (Aracel A) o también se puede emplear una emulsión con solución al 20 por ciento de un perfluorocarbono (Fluosol-DA) usado como sustituto de bloqueo. Otras posibilidades implican el uso de sustancias inmunomoduladoras, tales como citocinas o inductores sintéticos de IFN- γ , tales como poli I:C, en combinación con los adyuvantes mencionados anteriormente.

Otra posibilidad interesante para lograr un efecto adyuvante es emplear la técnica descrita en (17). Resumiendo, un antígeno relevante, tal como un antígeno de la presente invención, se puede conjugar con un anticuerpo (o un fragmento de anticuerpo que se une al antígeno) contra los receptores de Fc γ sobre monocitos/macrófagos.

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad tal que sea

terapéuticamente eficaz e inmunógena. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, incluidos, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo para organizar una respuesta inmune y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de ingrediente activo por vacunación, con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 µg a 1000 µg, tal como en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 300 µg, y especialmente en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 50 µg. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de inoculaciones subsiguientes u otras administraciones.

La forma de aplicación puede variar ampliamente. Se puede aplicar cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna. Estos se cree que incluyen una aplicación oral sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, mediante inyección o similar. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona que se va a vacunar y, en menor grado, del tamaño de la persona que se va a vacunar.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. En los supositorios, los aglutinantes y los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden estar constituidos por mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones están en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contienen ventajosamente 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

En muchos casos, será necesario realizar administraciones múltiples de la vacuna. Especialmente, las vacunas se pueden administrar para evitar una infección. Cuando se administra para evitar una infección, la vacuna se administra profilácticamente, antes de que se presenten signos o síntomas clínicos definitivos de una infección. Dado que las vacunas actuales, por ejemplo, BCG parece que inducen una respuesta inmune eficaz, pero de breve duración, también se pueden diseñar vacunas profilácticas para ser utilizadas como vacunas de refuerzo. Tales vacunas se administran a individuos que han recibido previamente una vacunación, con la intención de prolongar el período de protección.

En los casos en los que el individuo ya se ha infectado o se sospecha que se ha infectado, la vacunación previa puede haber proporcionado una inmunidad suficiente para prevenir la enfermedad primaria, pero, tal y como se ha indicado anteriormente, reforzar esta respuesta inmune no ayudará contra la infección latente. En dicha situación, la vacuna tiene una ventaja particular como vacuna terapéutica diseñada para tener eficacia frente a la fase latente de la infección.

Es importante destacar que en enfermedades crónicas, tales como la TB, el cáncer, la hepatitis y el VIH, el equilibrio a largo plazo entre el hospedador y el agente patógeno da como resultado con frecuencia respuestas inmunes dirigidas hacia unos pocos epítomos inmunodominantes. La inducción de una amplia respuesta equilibrada contra una gama de epítomos dentro de una proteína dada no se puede lograr mediante la inmunización con la proteína recombinante, que solo conduciría a una respuesta contra un número limitado de epítomos dominantes. Sin embargo, por el contrario, la presente invención ilustra que la vacunación con una mezcla de péptidos solapantes induce una respuesta inmune de linfocitos T contra una gama de epítomos, incluidos epítomos subdominantes, dentro de una proteína dada. La presente invención y la inducción de respuestas frente a epítomos subdominantes tienen, por lo tanto, una ventaja particular en estas enfermedades, ya que pueden inducir una respuesta inmune contra epítomos protectores que no están inducidos por la enfermedad crónica en sí, o mediante una vacunación con la proteína dada en una forma recombinante de longitud completa. Mediante la vacunación preventiva convencional o la exposición posterior de una manera terapéutica, la aplicación de la tecnología de una vacuna a base de una mezcla de péptidos es superior y tiene una actividad mucho mayor que las vacunas convencionales basadas en moléculas de tamaño completo contra estas enfermedades crónicas.

Además, en las enfermedades crónicas en las que la inmunidad humoral es importante, es posible inducir una amplia respuesta óptima de los linfocitos T y una respuesta máxima de los linfocitos B contra la misma proteína. En esta situación, la inmunización primaria se realiza con una mezcla de péptidos solapantes (en un adyuvante) que abarca la secuencia completa de una proteína dada y el refuerzo se logra con una segunda vacuna que comprende la misma proteína en forma recombinante en un adyuvante. De esta manera, la amplia respuesta de los linfocitos T contra epítomos dominantes y subdominantes, permitirá una actividad máxima de los linfocitos T auxiliares y, por lo tanto, una respuesta muy fuerte de los anticuerpos. La respuesta resultante es una respuesta amplia de los linfocitos T y máxima de los anticuerpos contra el mismo antígeno, con un uso particular contra las enfermedades crónicas.

Leyendas de las figuras

Figura 1.

A. Descripción general de los péptidos solapantes ESAT-6. B. Secuencia de aminoácidos de $\Delta 15$ -ESAT-6.

Figura 2. Inmunogenicidad de ESAT6 y Δ15ESAT6 en esplenocitos.

Se vacunaron grupos de ratones F1 (Balb/cxC57BL/6) por vía subcutánea tres veces a intervalos de dos semanas, ya sea con solución salina, ESAT6 o Δ15ESAT6 en DDA/TDB. Tres semanas después de la vacunación final, se analizaron las células del bazo mediante ELISA para estudiar la secreción de IFN-gamma después de la estimulación con 1 microgramo/ml de ESAT6, Δ15ESAT6 o uno de los 13 péptidos solapantes que cubren la secuencia de ESAT6 (P1-P13, tal y como se indica en la figura, también se muestra en la figura 1).

Figura 3. Eficacia protectora de ESAT6 y Δ15ESAT6.

Se vacunaron grupos de ratones F1 (Balb/cxC57BL/6) por vía subcutánea tres veces a intervalos de dos semanas con solución salina, BCG o DDA/TDB con ESAT6 o Δ15ESAT6. Seis semanas después de la última vacunación, los ratones fueron expuestos a *M.tb* virulento. Seis semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y la carga bacteriana (UFC) se midió en el pulmón.

Figura 4. Péptidos solapantes de TB10.4, P1-P9.

Figura 5. Vacunación con TB10 recombinante seguida de estimulación *in vitro* con péptidos individuales P1-P9.

Respuestas *in vitro* con IFN-γ de células procedentes de ratones vacunados tres veces con DDA/TDB-TB10.4 en DDA/TDB. Células extraídas de la sangre dos semanas después de la vacunación final y estimuladas con 0,5 μg/ml del péptido indicado.

Figura 6. Reconocimiento de los péptidos de TB10-4, P1-P9, después de la vacunación con péptidos individuales.

Respuestas *in vitro* con IFN-γ de células procedentes de ratones vacunados tres veces con péptidos individuales de TB10.4 en DDA/TDB. Células extraídas de la sangre dos semanas después de la vacunación final y estimuladas con 0,5 μg/ml del mismo péptido usado para la vacunación, y la secreción de IFN-γ se determinó por ELISA.

Figura 7. Capacidad protectora de los péptidos de TB10-4, P1-P9.

Carga bacteriana en ratones vacunados (expresada como log₁₀ de la protección en UFC) expuestos por la vía del aerosol a *M.tb* virulento, seis semanas después de la última vacunación. Seis semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y la carga bacteriana (UFC) se midió en el pulmón. (*P <0,05 en comparación con ratones no vacunados, ANOVA y prueba de Tukey).

Figura 8. Reconocimiento de los péptidos de TB10-4, P1-P9, después de la vacunación con una mezcla de péptidos de TB10-4.

Respuestas *in vitro* con IFN-γ de células procedentes de ratones vacunados tres veces con DDA/TDB-mezcla de péptidos de TB10.4. Células extraídas de la sangre dos semanas después de la vacunación final y estimuladas con 0,5 μg/ml de péptido o proteína TB10.4, tal y como se indica.

Figura 9. Carga bacteriana en ratones vacunados con TB10.4 o péptidos de TB10.4, infectados con *M.tb*.

Carga bacteriana en ratones vacunados (expresada como log₁₀ de UFC) comparada con testigos no vacunados expuestos por la vía del aerosol a *M.tb* virulento, diez semanas después de la primera vacunación. Seis semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y la carga bacteriana (UFC) se midió en el pulmón. (* P<0,05, ANOVA y test de Tukey).

Figura 10.

Visión general de los péptidos solapantes de CT521.

Figura 11.

Los ratones se vacunaron tres veces a intervalos de 2 semanas con una mezcla de todos los péptidos de ESAT-6 (P1-P13), y la respuesta inmune, medida por la secreción de IFN-gamma, fue investigada cultivando células sanguíneas con cada uno de los péptidos individuales de ESAT-6, P1-P13.

Figura 12.

Los ratones se vacunaron tres veces, a intervalos de 2 semanas con ESAT-6 o mezcla de péptidos de ESAT-6 (P1-P13). Seis semanas después de la última vacunación, los ratones fueron sometidos a una exposición mediante aerosol a *M.tb* virulento. Diez semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y se determinó el número de bacterias en los pulmones.

Ejemplos

Ejemplo 1:

ESAT-6.

Para examinar en qué grado el antígeno ESAT-6 expresado en *Mycobacterium tuberculosis* contiene epítomos dominantes y subdominantes, se vacunaron ratones con la proteína recombinante ESAT-6, 3 veces a intervalos de 2 semanas y en células extraídas de la sangre, dos semanas después de la vacunación final y estimuladas con los péptidos ESAT-6 indicados (Fig. 1A), se determinó después la secreción de IFN-gamma, tal y como se evaluó con ELISA. Los resultados mostraron una inducción de los linfocitos T productores de IFN-gamma, específicos de P1 y en menor grado de P2. La eliminación del epítomo inmunodominante P1 de ESAT6 (que proporciona la estructura artificial denominada "Δ15-ESAT-6" en la que se han delecionado los aminoácidos 1-15 (Fig. 1B)) conduce al reconocimiento inmune de nuevos epítomos, P2 y, en particular, P3 (Fig. 2). Esto demostró que P1 es un epítomo dominante, y que P2 y P3 constituyen epítomos subdominantes (pero inmunógenos).

A continuación examinamos si los epítomos subdominantes eran capaces de conferir protección contra la infección por *M.tb*. Los ratones fueron vacunados por vía subcutánea tres veces a intervalos de dos semanas con solución salina, BCG o DDA/TDB con ESAT6 o Δ15ESAT6. Seis semanas después de la última vacunación, los ratones fueron expuestos a *M.tb* virulento. Seis semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y la carga bacteriana (UFC) se midió en el pulmón.

Los experimentos de protección mostraban que Δ15-ESAT-6 era más protectora que ESAT-6 (Fig. 3), lo cual indicaba que los péptidos subdominantes (epítomos) P2 y P3 eran de hecho capaces de inducir una respuesta inmune que mediaba en la protección contra una infección por *M.tb*.

A continuación examinamos si la vacunación con una mezcla de todos los péptidos solapantes de ESAT-6 daría lugar a un reconocimiento más amplio de P1-P13, en comparación con ratones vacunados con la proteína recombinante ESAT-6. Los ratones fueron vacunados tres veces a intervalos de 2 semanas con una mezcla de todos los péptidos, y la respuesta inmune se estudió cultivando células sanguíneas con cada uno de los péptidos individuales de ESAT-6, P1-P13 (Fig. 11).

Los resultados mostraban que, en contraste con la vacunación con la proteína recombinante ESAT-6, la vacunación con una mezcla de péptidos de ESAT-6 (P1-P13) conducía a un reconocimiento más amplio de los péptidos (Fig. 11).

Para examinar si la respuesta más amplia frente a ESAT-6 se reflejaba en la protección contra la infección por *M. tuberculosis*, en comparación con la proteína inducida por vacunación con la proteína recombinante ESAT-6, los ratones se vacunaron tres veces a intervalos de 2 semanas, ya sea con ESAT-6 o con una mezcla de péptidos de ESAT-6. Seis semanas después de la última vacunación, los ratones fueron sometidos a una exposición a base de aerosol con *M.tb* virulento. Diez semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y se determinó el número de bacterias en los pulmones.

Los resultados mostraban que los ratones vacunados con la mezcla de péptidos de ESAT-6 no solo mostraban un reconocimiento más amplio de ESAT-6, sino que también estaban significativamente más protegidos contra la infección por *M.tb* que en comparación con los ratones vacunados con la proteína recombinante ESAT-6 (Fig. 12). Por lo tanto, la vacunación con una mezcla de péptidos de ESAT-6 conduce a un reconocimiento más amplio de los epítomos de ESAT-6 que a su vez inducen una protección significativamente mayor contra la infección por *M.tb*, que cuando se compara con la vacunación con la proteína recombinante ESAT-6.

Ejemplo 2:

TB10.4.

A continuación analizamos otra proteína, expresada por *M.tb.*, TB10.4. Los ratones fueron vacunados 3 veces a intervalos de 2 semanas con TB10.4 recombinante, y se extrajeron células de la sangre dos semanas después de la vacunación final y se estimularon con 0,5 µg/ml de los péptidos de TB10.4 indicados (Fig. 4) y se determinó la secreción de IFN-gamma, tal y como se evaluó con ELISA. Los resultados mostraban que la vacunación con TB10.4 inducía principalmente linfocitos T específicos de P3 (Fig. 5). P3 constituía, por lo tanto, un epítomo dominante.

Ejemplo 3:

Para analizar si la falta de linfocitos T que respondían a los péptidos P1, P2, P4, P5, P6 y P9 (y hasta cierto grado, P7 y P8) se debía a que estos epítomos peptídicos eran subdominantes o no inmunógenos, a continuación vacunamos con los péptidos individuales de TB10.4 (P1-P9). Después de la vacunación, los linfocitos purificados se estimularon *in vitro* con los mismos péptidos utilizados para la vacunación y se determinó la secreción de IFN-γ con ELISA. Los resultados mostraban que otros péptidos subdominantes (cuando se vacunaba con la proteína recombinante TB10.4) también eran fuertemente inmunógenos. En particular, la vacunación con el péptido 1 o 3, o en menor grado, P7, P8 o P9, inducía una respuesta específica de los linfocitos T (Fig. 6).

Además, los péptidos subdominantes, en particular, P1, P7, P8, P9, protegían todos ellos contra la infección por *M.tb* (Fig. 7). La vacunación con el epítomo peptídico dominante P3, también inducía una protección significativa.

Ejemplo 4:

Una vez determinada la existencia de epítomos subdominantes cuando se vacunaba con la proteína recombinante TB10.4, a continuación examinamos si la vacunación con una mezcla de todos los péptidos solapantes de TB10.4 produciría un reconocimiento más amplio de P1-P9, en comparación con ratones vacunados con la proteína recombinante TB10.4. Los ratones se vacunaron tres veces a intervalos de 2 semanas con una mezcla de todos los péptidos, y la respuesta inmune se analizó cultivando células sanguíneas con cada uno de los péptidos individuales de TB10.4, P1-P9 (Fig. 8).

Los resultados mostraron que, en contraste con la vacunación con la proteína recombinante TB10.4, la vacunación con una mezcla de péptidos de TB10.4 (P1-P9) inducía un reconocimiento mucho más amplio de los péptidos. En particular, se reconoció fuertemente P1, P3 y P8 (Fig. 8).

Ejemplo 5:

Para examinar si la respuesta más amplia hacia TB10.4 se reflejaba en la protección contra la infección por *M. tuberculosis*, en comparación con la proteína inducida por la vacunación con la proteína recombinante TB10.4, los ratones se vacunaron tres veces a intervalos de 2 semanas, ya sea con TB10.4 o con una mezcla de péptidos de TB10.4. Seis semanas después de la última vacunación, los ratones fueron sometidos a una exposición mediante aerosol a *M.tb* virulento. Seis semanas después de la exposición, los ratones fueron sacrificados y se determinó el número de bacterias en los pulmones.

Los resultados mostraban que los ratones vacunados con una mezcla de péptidos de TB10.4 no solo mostraban un reconocimiento más amplio de TB10.4, sino que también estaban significativamente más protegidos contra la infección por *M.tb* que cuando se comparaba con ratones vacunados con la proteína recombinante TB10.4 (Fig. 9). Por lo tanto, la vacunación con una mezcla de péptidos de TB10.4 conduce a un reconocimiento más amplio de los epítomos de TB10.4, los cuales a su vez inducen una protección significativamente más elevada contra la infección por *M.tb*, que cuando se comparaba con una vacunación con la proteína recombinante TB10.4.

Ejemplo 5:

ct521

Los ratones se vacunaron 3 veces a intervalos de 2 semanas con CT521 recombinante o una mezcla de péptidos solapantes de CT521 (Fig. 10), y se estimularon células extraídas de la sangre dos semanas después de la vacunación final con 0,5 µg/ml de cada uno de los péptidos de CT521. La secreción de IFN-gamma se determinó según se evaluó con ELISA, para examinar si la vacunación con una mezcla de péptidos de CT521 conduce a un reconocimiento más amplio de CT521, en comparación con la vacunación con la proteína CT521 recombinante.

Referencias

1. Paul, W. 1999. Fundamental Immunology, cuarta edición, Lippincott-Raven.
2. Sette, A. y J. Fikes. 2003. *Curr Opin Immunol* 15:469.
3. van der Most, R. G., K. Murali-Krishna, J. G. Lanier, E. J. When, M. T. Puglielli, J. N. Blattman, A. Sette y R. Ahmed. 2003. *Virology* 315:93.
4. Crowe, S. R., S. J. Turner, S. C. Miller, A. D. Roberts, R. A. Rappolo, P. C. Doherty, K. H. Ely y D. L. Woodland. 2003. *J Exp Med* 198:399.
5. Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most y R. Ahmed. 2003. *J Virol* 77:4911.
6. Kamath, A. B., J. Woodworth, X. Xiong, C. Taylor, Y. Weng y S. M. Behar. 2004. *J Exp Med* 200:1479.
7. Olsen, A. W., P. R. Hansen, A. Holm y P. Andersen. 2000. *Eur J Immunol* 30:1724.
8. McMichael, A. J. y R. E. Phillips. 1997. *Annu Rev Immunol* 15:271.
9. Mowat *et al.* 1991, *Immunology* 72(3):317-22.
10. Lustig *et al.* 1976, *Cell Immunol* 24(1):164-7.
11. Wille-Reece, U., C. Y. Wu, B. J. Flynn, R. M. Kedl y R. A. Seder. 2005. *J.Immunol.* 174:7676.6.
12. Thompson J., *et al.* *Nucleic Acids Res* 1994 22:4673-4680.
13. Ravn, P. *et al.* 1999. *J. Infect. Dis.* 179:637-645.
14. Stryhn, A., *et al.* 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1911-1918.

15. Harboe, M., *et al.* 1998 *Infect. Immun.* 66:2; 717-723.
16. Krogh, TN, Berg, T, & Hojrup, P. (1999). *Anal. Biochem.* 274, 153-162.
17. Gosselin *et al.*, 1992. *J. Immunol.* 149: 3477-3481.
18. Babu *et al.* 1995. *Vaccine* 13:1669-76.
- 5 19. Davidsen *et al.* (2005). *Biochim Biophys Acta.* 1718: 22-31.
20. Munoz *et al.* (2004). *Int J Pharm* 269:177-84.
21. Kirby & Gregoriadis. 1984. 2: 979-984.
22. Pick U. 1981. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 186-194.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna contra una enfermedad crónica que comprende una mezcla de péptidos que consiste en péptidos solapantes adyacentes que abarcan la secuencia de aminoácidos completa de una proteína que se expresa durante la fase crónica de la enfermedad, que también comprende un adyuvante en donde el adyuvante es un liposoma catiónico.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el adyuvante es DDA/TDB.
3. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde uno o varios de los péptidos están modificados químicamente por glicosilación, lipidación, marcación con PAM3Cys o cloruro de dodecanoílo, o por inclusión de grupos prostéticos, o por contener aminoácidos adicionales, o por conjugación directa con un agonista de TLR.
- 10 4. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde la mezcla de péptidos se incorpora dentro de liposomas o cada péptido se incorpora individualmente dentro de liposomas antes de preparar la mezcla.
5. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la longitud de los péptidos es de 10 a 30 aminoácidos.
- 15 6. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 -5, en donde el solapamiento con el péptido adyacente es de 6-20 aminoácidos.
7. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína es expresada por bacterias, un virus, un parásito y tumores malignos.
8. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en donde la bacteria se selecciona entre el grupo consistente en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* o *Chlamydia trachomatis*, el virus se selecciona entre el grupo consistente en virus de la hepatitis B o C y el parásito se selecciona entre el grupo consistente en especies de *Leishmania* o el parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum*.
- 20 9. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los péptidos proceden de una proteína de *M. tuberculosis* seleccionada entre el grupo consistente en ESAT6, Ag85A, Ag85B o TB10.4, o de *Chlamydia trachomatis* seleccionada entre el grupo consistente en CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 o CT681, o de un virus de la hepatitis, o de *Plasmodium falciparum* seleccionada entre el grupo consistente en Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 o CSP.
- 25 10. Un método para preparar una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, en donde la mezcla de péptidos se prepara por escisión proteolítica de la proteína con dos o más agentes de escisión proteolítica.
- 30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho agente de escisión proteolítica es una enzima proteolítica seleccionada entre el grupo consistente en tripsina, proteasa V-8, AspN o quimotripsina, o es un agente químico seleccionado entre el grupo consistente en CNBr o BNPS-escatol.
- 35 12. El uso de la vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad crónica en un animal, incluido un ser humano, que comprende la administración al animal.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la prevención o el tratamiento se refuerza administrando una segunda vacuna que comprende la proteína de tamaño completo abarcada por la mezcla de péptidos en un adyuvante o expresada en un sistema de administración vivo.
- 40 14. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 12-13, en donde la enfermedad crónica se selecciona entre el grupo consistente en infección por micobacterias, clamidia, hepatitis, VIH, parásito causante de la malaria y *Leishmania*, cáncer y diabetes.

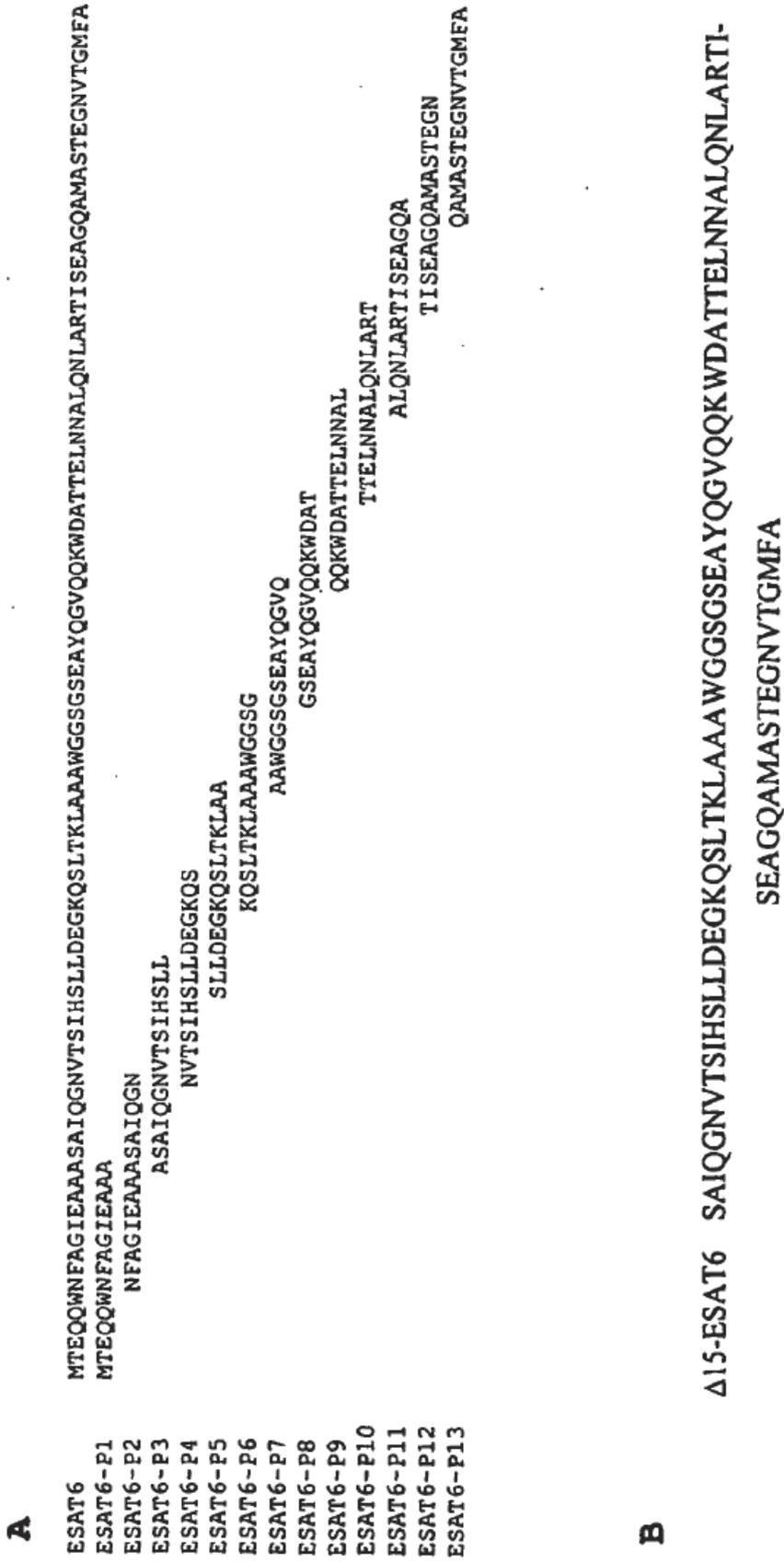


Figura 1.

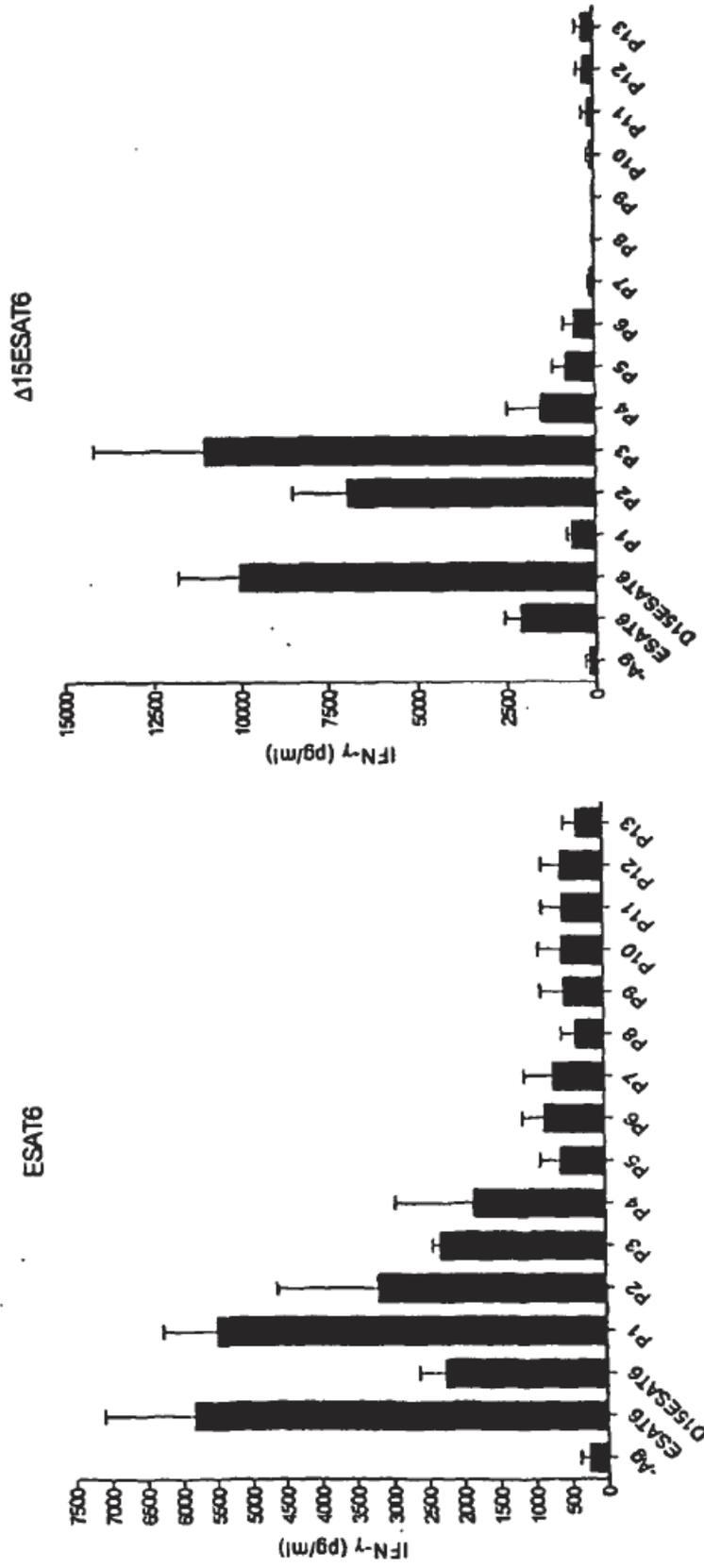


Figura 2

TB10.4	MSQIMYNYPAMLGHAGDMAGYAGTLQSLGAEIAVEQAALQSAWQGDGTGITYQAWQAWNQAMEDLVRA YHAMSSTHEANTMAMMARDTAEAAKWGG
TB10.4-P1	MSQIMYNYPAMLGHAGDM
TB10.4-P2	MLGHAGDMAGYAGTLQSL
TB10.4-P3	YAGTLQSLGAEIAVEQAA
TB10.4-P4	EIAVEQAALQSAWQGDGTG
TB10.4-P5	SAWQGDGTGITYQAWQAW
TB10.4-P6	YQAWQAWNQAMEDLVRA
TB10.4-P7	AMEDLVRA YHAMSSTHEA
TB10.4-P8	AMSSTHEANTMAMMARDT
TB10.4-P9	MAMMARDTAEAAKWGG

Figura 4

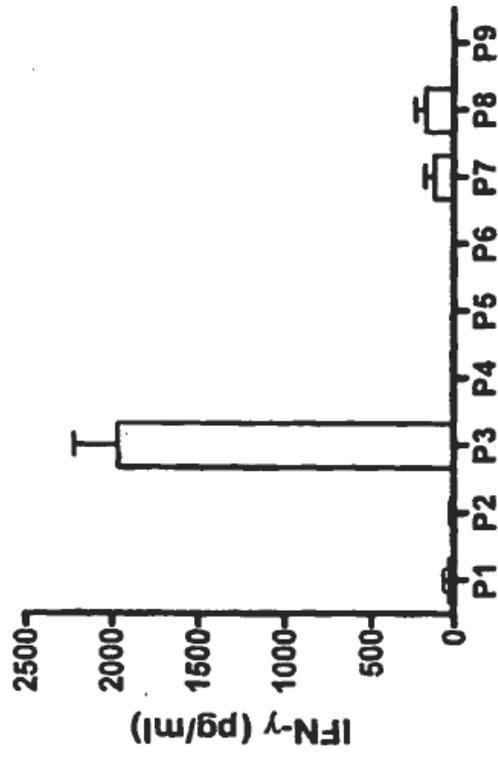


Figura 5

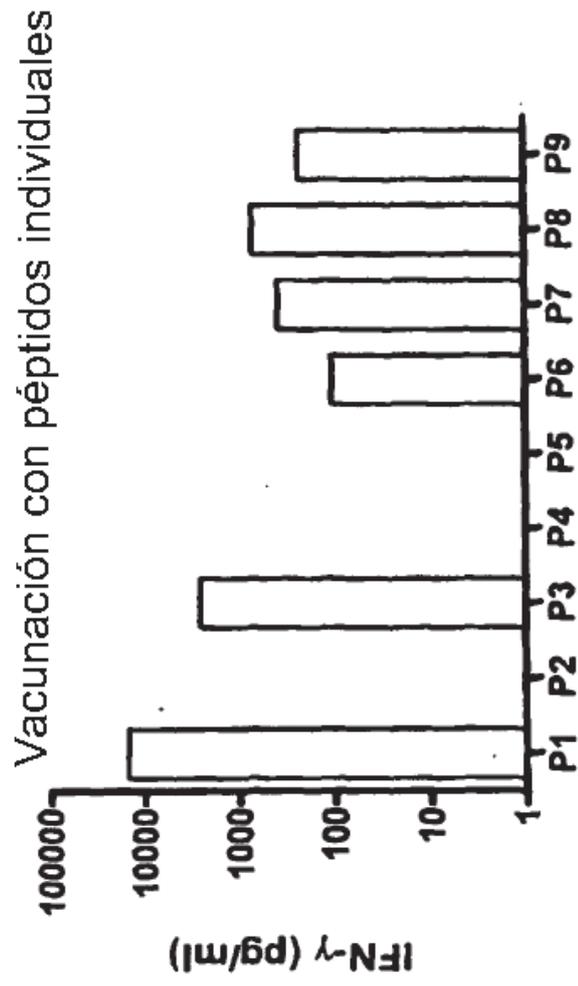


Figura 6

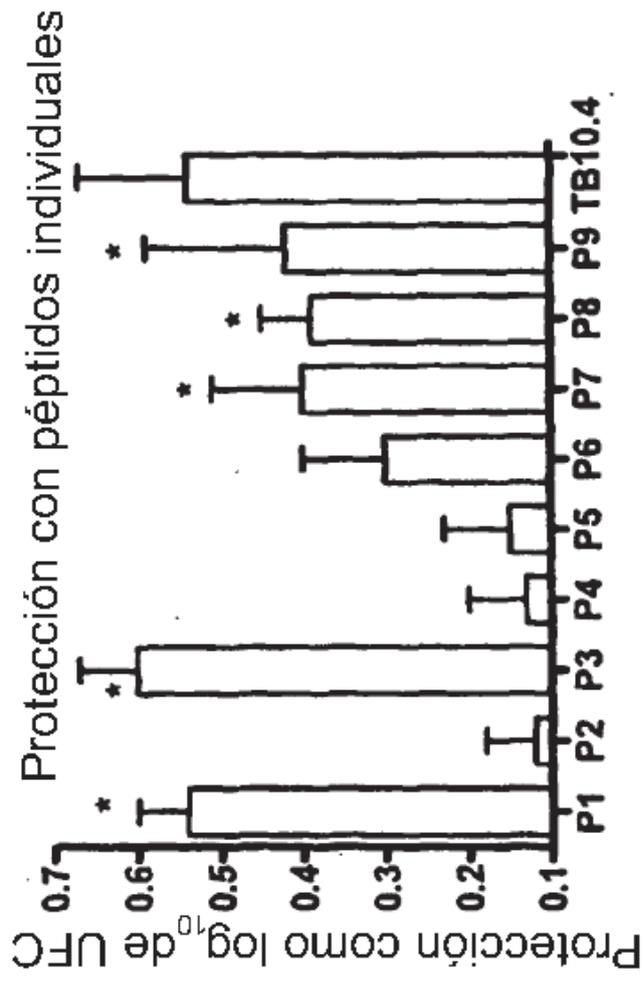


Figura 7

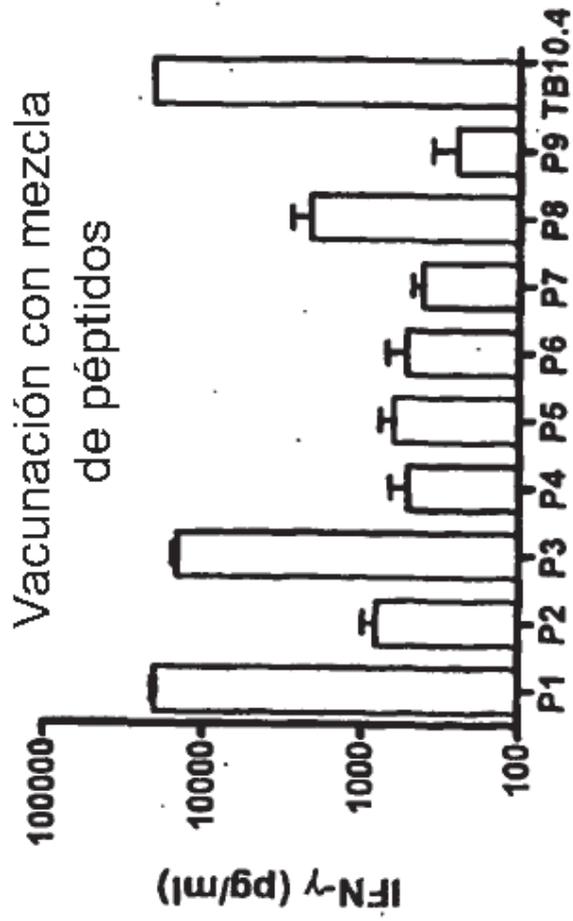


Figura 8

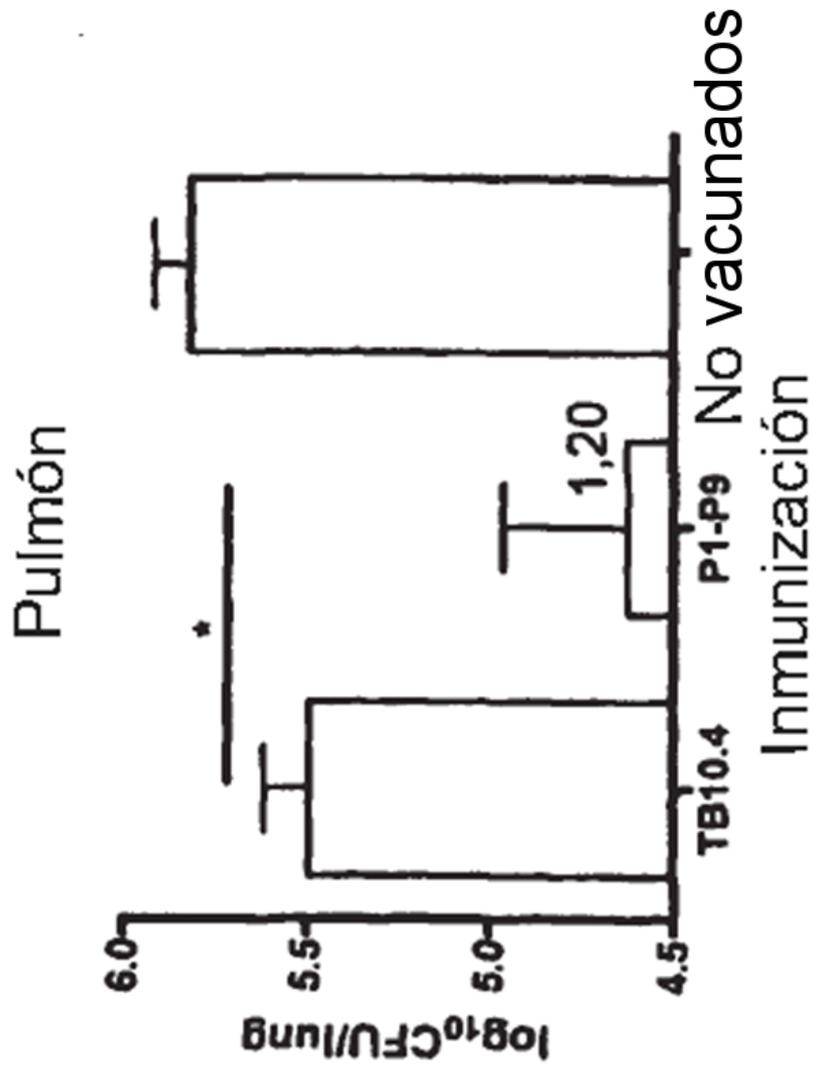


Figura 9

CT521 : MXPRTKTRKQKQFAGLSAGAFVDFGEFQWFLERGHVTSRQIEACRYALNRYLQRKGVNIRVFFDASVYTKKPAETRQKGGKGFDFHFWWWPQGRILLEVANVSKEDAQDALLRRAAKLIGIRTRFVQRVERV

 CT521-P1: MXPRTKTRKQKQFAGLSK
 CT521-P2: RQFAGLSKGFVDFGEFQW
 CT521-P3: VDFGEFQWFLERGHVTSRQIEA
 CT521-P4: GWTSRQIEACRYALNRYLQRK
 CT521-P5: ALNRYLQRKGVNIRVFFDASVY
 CT521-P6: IRVFFDASVYTKKPAETRQKGGK
 CT521-P7: KPAETRQKGGKGFDFHFWWWP
 CT521-P8: PDRWWPQGRILLEVANVSK
 CT521-P9: IILEVANVSKEDAQDALLRRAAK
 CT521-P10: DALRRAAKLIGIRTRFVQRVERV

Figura 10

Figura 11

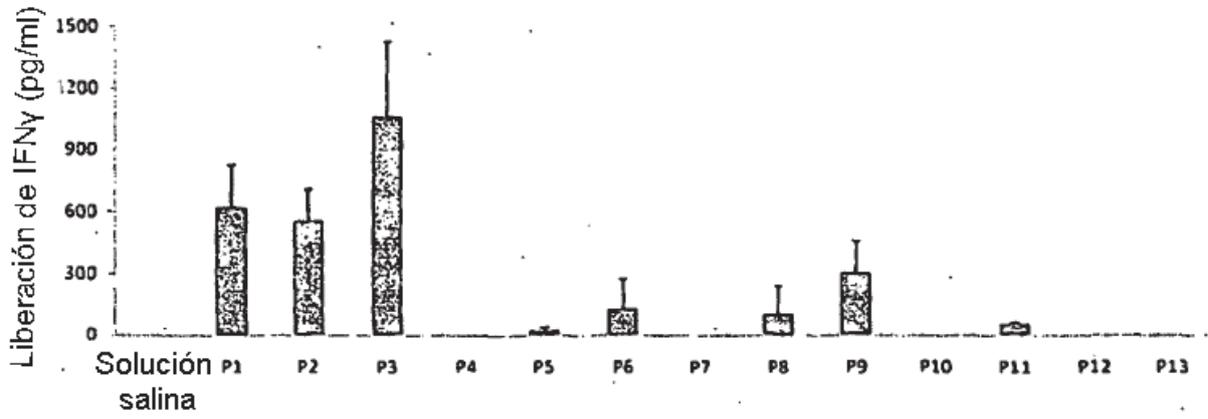


Figura 12

