

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 921**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2005 E 05795016 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1802340**

54 Título: **Combinación de un Mycobacterium recombinante y un agente biológicamente activo como vacuna**

30 Prioridad:

21.10.2004 EP 04025096

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

15.12.2014

73 Titular/es:

**VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH
(100.0%)**

**MELLENDORFER STR. 9
30625 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:

**LÄUFER, ALBRECHT;
EISELE, BERND y
GRODE, LEANDER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 921 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

Combinación de un Mycobacterium recombinante y un agente biológicamente activo como vacuna

5 La presente invención se refiere a una combinación adecuada para uso en un método de provocación de una respuesta inmune TH1, en la que la combinación comprende un primer constituyente y un segundo constituyente separado, una célula bacteriana para uso como adyuvante, una composición farmacéutica que comprende la combinación, el uso de la composición o de la composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento, la composición para uso en un método de tratamiento, y un método para la fabricación de la composición farmacéutica.

10 La medicina molecular moderna está fuertemente centrada en el uso de compuestos inmunógenos o compuestos que modulen el sistema inmunitario de un paciente para el tratamiento de dicho paciente. Enfermedades respectivas son, entre otras, tumores y enfermedades infecciosas.

15 En ambos casos, se administran al cuerpo del paciente compuestos antigénicos, es decir, compuestos que son adecuados para provocar una respuesta inmune o para reforzar una respuesta inmune. Sin embargo, la utilidad de los compuestos respectivos está limitada en muchos casos, lo que requiere un refuerzo de la respuesta inmune a fin de alcanzar un nivel clínicamente relevante de eficiencia y eficacia. Dicho refuerzo puede realizarse por administración repetida del agente respectivo, o por utilización de un adyuvante.

La técnica anterior proporciona varios adyuvantes tales como aceites minerales, micobacterias desactivadas, compuestos de aluminio y análogos.

20 Los adyuvantes conocidos en la técnica, sin embargo, no se comportan siempre de una manera suficiente para conseguir las necesidades médicas, en particular en conexión con nuevos regímenes de tratamiento tales como el uso de células expresantes de citocinas como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US94/01631.

25 La Solicitud de Patente Europea 0902086A1 da a conocer vacunas recombinantes que proporcionan inmunidad protectora contra la tuberculosis. Dicha vacuna comprende una célula Mycobacterium bovis recombinante que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) al menos un dominio capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero y (b) un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico.

El problema subyacente de la presente invención es por tanto proporcionar composiciones, más particularmente composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un adyuvante y el segundo constituyente es un agente biológicamente activo.

30 Este problema se resuelve por la materia que constituye el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Realizaciones preferidas pueden deducirse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

35 Más específicamente, el problema subyacente en la presente invención se resuelve en un primer aspecto por una combinación adecuada para uso en un método de provocar una respuesta inmune TH1, en donde la combinación comprende un primer constituyente y un segundo constituyente separado, en donde el primer constituyente es una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa; y en donde el segundo constituyente es un antígeno.

40 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto por una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa, para uso como adyuvante.

En una realización del primer y el segundo aspecto, la célula es una célula de Mycobacterium bovis.

En una realización del primer y el segundo aspecto, al menos un ácido nucleico que codifica una subunidad celular de ureasa de la célula bacteriana está desactivado.

45 En una realización del primer y el segundo aspecto, al menos la secuencia codificante de la subunidad C de ureasa bacteriana está desactivada.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el dominio de escape fagolisosómico es un dominio de escape fagolisosómico de Listeria.

50 En una realización del primer y el segundo aspecto, el dominio fagolisosómico está codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:

- a) una secuencia nucleotídica que comprende los nucleótidos 211-1722 que se muestran en SEQ. ID. NO. 1;

- b) una secuencia nucleotídica que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de a); y
- c) una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones severas con la secuencia de a) o b).

5 En una realización del primer y el segundo aspecto, la célula bacteriana comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el péptido o polipéptido se selecciona de autoantígenos, antígenos tumorales, antígenos virales, antígenos parasitarios, antígenos bacterianos y fragmentos inmunógenos de los mismos.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el péptido o polipéptido forma parte de un polipéptido de fusión.

10 En una realización del primer y el segundo aspecto, el péptido de fusión comprende

- a) al menos un dominio de un polipéptido, en donde el dominio de polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero, y

- b) un dominio de escape fagolisosómico.

15 En una realización del primer y el segundo aspecto, el polipéptido es el polipéptido que se define en las realizaciones anteriores o parte del mismo.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el dominio de escape fagolisosómico es un dominio del dominio de escape fagolisosómico que se define en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización del primer y el segundo aspecto, la célula bacteriana es rBCGAureC:Hly.

20 En una realización del primer aspecto, en donde el antígeno se selecciona del grupo que comprende una célula tumoral inmunógena, una célula eucariota que expresa un antígeno asociado a un tumor, una célula eucariota que expresa un antígeno específico de tumor y una célula que expresa un antígeno parasitario.

25 En una realización del primer aspecto, la célula tumoral es un tumor inmunógeno y en la que la célula tumoral se selecciona preferiblemente del grupo que comprende células de melanoma, células de carcinoma renal, células de tumor de mama, células de tumor cerebral, células de tumor prostático, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.

En una realización del primer aspecto, la célula es una célula alogénica y es coincidente con el HLA clase I.

En una realización del primer aspecto, el antígeno parasitario es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium, preferiblemente Plasmodium falciparum, o fragmento del mismo, capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.

30 En una realización del primer aspecto, el antígeno es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium, preferiblemente Plasmodium falciparum, o fragmento del mismo capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.

En una realización del primer aspecto, el antígeno es citomegalovirus humano.

35 En una realización del primer aspecto, el antígeno es una partícula viral o una multitud de las mismas, liberada preferiblemente después de infección de células de mamífero por citomegalovirus humano, en donde las partículas (a) están rodeadas por una membrana lipídica en la que están embebidas glicoproteínas virales, y (b) no contiene DNA viral ni cápsidas.

En una realización del primer aspecto, las partículas contienen una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno de las células T pp65 (UL83) y una o más partes de una o más proteínas que no son pp65.

40 En una realización del primer aspecto, el antígeno de las células T pp65 está fusionado a una o más partes de una glicoproteína del citomegalovirus humano, en donde la glicoproteína se selecciona del grupo que comprende la glicoproteína gH de HCMV, la proteína IE₁ de HCMV (ppUL123), y la glicoproteína gB de HCMV.

En una realización del primer aspecto, el antígeno de las células T está fusionado a una o más partes de una proteína que forma parte de un patógeno humano distinto de HCMV.

45 En una realización del primer aspecto, el patógeno se selecciona del grupo que comprende HIV-1, HBV, HCV y gripe.

En una realización del primer aspecto, la o las partículas contiene(n) partes de al menos dos glicoproteínas que son variantes de una glicoproteína particular de diferentes cepas de HCMV.

En una realización del primer aspecto, una de las dos variantes de la glicoproteína HCMV particular es la variante de la cepa Towne de HCMV, y la otra es la variante de la cepa Ad169 de HCMV.

En una realización del primer aspecto, las células de mamífero son fibroblastos, preferiblemente fibroblastos de prepucio.

5 En una realización del primer aspecto, la partícula es un cuerpo denso.

En una realización del primer aspecto, el antígeno es un cuerpo denso, preferiblemente un cuerpo denso de HCMV, o un cuerpo denso como se define arriba.

10 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto por una composición farmacéutica, en donde la composición comprende una combinación conforme al primer aspecto y un portador farmacéuticamente aceptable.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto por el uso de una combinación conforme al primer aspecto o de una composición farmacéutica conforme al tercer aspecto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas.

15 En una realización del cuarto aspecto, el cáncer es un tumor inmunógeno y se selecciona más preferiblemente del grupo que comprende cáncer de próstata, melanoma, carcinoma renal, tumor de mama, tumores cerebrales, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.

En una realización del cuarto aspecto, la enfermedad infecciosa es malaria.

20 En una realización del cuarto aspecto, el antígeno es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium o un fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.

En una realización del cuarto aspecto, la enfermedad infecciosa es infección de HCMV.

En una realización del cuarto aspecto, el antígeno es un cuerpo denso como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores.

25 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un quinto aspecto por el uso de una combinación conforme al primer aspecto para la fabricación de una vacuna terapéutica y/o profiláctica para provocación de una respuesta inmune TH1.

30 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un sexto aspecto por la combinación del primer aspecto o la composición farmacéutica del tercer aspecto, para uso en un método para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad y que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar la combinación del primer aspecto o la composición farmacéutica del tercer aspecto.

En una realización del sexto aspecto, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas.

35 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto por un método para la fabricación de una composición farmacéutica conforme al tercer aspecto, que comprende los pasos de

- proporcionar como primer constituyente una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa;

- proporcionar como segundo constituyente un agente biológicamente activo; y

40 - formular el primer constituyente y el segundo constituyente en una composición farmacéutica.

En una realización, el antígeno es una célula eucariota manipulada genéticamente que expresa una citocina.

En una realización preferida, la citocina se selecciona del grupo que comprende interleucina-2, interleucina-4, interleucina-12 e interferón-gamma.

En una realización más preferida, la célula co-expresa dos o más citocinas.

45 En una realización todavía más preferida la célula co-expresa IL-2 e interferón-gamma.

En una realización preferida, la célula es autóloga con relación a un individuo al que se administra o va a administrarse la célula y/o la composición.

En una realización alternativa preferida, la célula es alogénica con relación a un individuo al que se administra o va a administrarse la célula y/o la composición.

Se da a conocer que la célula se selecciona del grupo que comprende células presentadoras de antígeno no profesionales, células presentadoras de antígeno profesionales, y células dendríticas.

- 5 En otra realización preferida, la célula expresa otra inmunomolécula seleccionada del grupo que comprende una citocina, una molécula de adhesión, un factor co-estimulador, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno específico de tumor y un antígeno parasitario.

En una realización preferida, el antígeno es un cuerpo denso como se define en esta memoria.

En una realización, el antígeno es un antígeno de *Mycobacterium*, preferiblemente *Mycobacterium ssp.*

- 10 En una realización preferida, el *Mycobacterium* se selecciona del grupo que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. paratuberculosis*.

En una realización, el antígeno es un antígeno 85.

- 15 Se reconocerá por los expertos en la técnica, que la composición de la presente invención puede utilizarse también preferiblemente para la prevención de una enfermedad. Esto está basado, en realizaciones preferidas, en el hecho de que el primer constituyente de la combinación conforme a la presente invención es adecuado para provocar una respuesta inmune y más particularmente una respuesta inmune específica que permite proporcionar medios para ayudar a un cuerpo humano o animal a combatir la enfermedad antes de la manifestación de la enfermedad y más específicamente antes de una manifestación clínica o médicamente relevante de las enfermedades.

- 20 En una realización preferida, el cáncer es un tumor inmunógeno en el cual el tumor se selecciona preferiblemente del grupo que comprende cáncer de próstata, melanoma, carcinoma renal, tumor de mama, tumores cerebrales, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.

En una realización alternativa, la enfermedad infecciosa es malaria.

En una realización preferida, el agente biológicamente activo es la proteína gp190/MSP1 de *Plasmodium* o un fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.

- 25 En una realización alternativa, la enfermedad infecciosa es infección de HCMV, preferiblemente infección de HCMV humano. En una realización preferida, el agente biológicamente activo es un cuerpo denso como se describe en esta memoria.

- 30 En una realización alternativa, la enfermedad infecciosa es tuberculosis. En una realización preferida, el agente biológicamente activo es un antígeno de *Mycobacterium*, preferiblemente *Mycobacterium ssp.* Más preferiblemente, el *Mycobacterium* se selecciona del grupo que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. paratuberculosis*. Aún más preferiblemente, el antígeno es el antígeno 85.

Se da a conocer también un método para la fabricación de una combinación farmacéutica, preferiblemente una composición farmacéutica conforme al segundo aspecto de la presente invención, que comprende los pasos de:

- 35 - proporcionar como primer constituyente una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico;
- proporcionar como un segundo constituyente un agente biológicamente activo; y
- formular el primer y el segundo constituyente por separado.

Se da a conocer que el primer constituyente formulado y el segundo constituyente formulado están empaquetados en un solo paquete.

- 40 Se da a conocer que el primer constituyente formulado y el segundo constituyente formulado están empaquetados en paquetes separados.

Se da a conocer que los paquetes son unidades monodosis o comprenden múltiples unidades de dosificación simple.

- 45 Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que una célula bacteriana que puede ser una célula bacteriana Gram-positiva o Gram-negativa que expresa un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico es un adyuvante particularmente útil que puede utilizarse en combinación con un agente biológicamente activo. Más particularmente, los autores de la presente invención han reconocido que *Mycobacterium bovis*, preferiblemente el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* y más preferiblemente *Mycobacterium* tal como BCG que codifica o expresa un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico es un

medio adecuado para provocar una respuesta inmune o para reforzar la respuesta inmune mediada particularmente cuando se utilizan agentes biológicamente activos y más particularmente otros agentes biológicamente activos provocadores de inmunidad. Un tipo particularmente preferido de agentes biológicamente activos provocadores de respuesta inmune es una célula que expresa al menos una citocina o un antígeno parasitario, o un antígeno tumoral o parasitario o un antígeno viral.

Sin desear quedar ligados por teoría alguna, los autores de la presente invención son de la opinión de que un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico de este tipo permite que cualesquiera antígenos derivados de la célula bacteriana o del agente biológicamente activo y adecuados para provocar una respuesta inmune, son más eficientes para hacerlo así una vez que dicho péptido de escape fagolisosómico está disponible. En otras palabras, por permitir que los antígenos creados después del atrapamiento de la célula bacteriana en los fagolisosómicas escapen de la misma y sean presentados así al sistema inmunitario, aumenta la accesibilidad de los antígenos específicos de BCG y se crea así el efecto adyuvante superior utilizado en conexión con la presente invención.

Esta clase de suministro de péptidos al camino de presentación del MHC clase I puede potenciar la respuesta inmune específica de BCG ya existente y su actividad adyuvante.

El efecto adyuvante de BCG y más particularmente de BCG o cualquier microorganismo, preferiblemente cualquier organismo *Mycobacterium*, que codifica o expresa un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico es un descubrimiento adicional sorprendente de los autores de la presente invención que puede utilizarse preferiblemente cuando dicho microorganismo causante del efecto adyuvante se combina o se co-administra con un adicional o segundo agente biológicamente activo. Al contrario que otros adyuvantes que estimulan una respuesta inmune TH2, el adyuvante arriba descrito, es decir el microorganismo, puede utilizarse para provocar una respuesta inmune TH1. Dicha respuesta inmune TH1 es útil en la medida en que induce una respuesta inmune celular. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un microorganismo que codifica y/o expresa un péptido de escape fagolisosómico, en donde el microorganismo es preferiblemente BCG y más preferiblemente BCG como se describe en esta memoria y muy preferiblemente una BCG deficiente en ureC, como adyuvante.

Aun más sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que un microorganismo, preferiblemente BCG o sus derivados, que codifica y/o expresa un péptido de escape fagolisosómico y más preferiblemente BCG como se describe en esta memoria en sus diversas realizaciones, que incluye, pero sin carácter limitante, rBCG:Hly y muy preferiblemente una BCG deficiente en ureC tal como BCG: rBCG Δ ureC:Hly y derivados del mismo son superiores a BCG sin un péptido de escape fagolisosómico en la medida en que aquéllos son capaces de introducir una respuesta CD8 pronunciada que es específica para el microorganismo respectivo tal como *Mycobacterium*, y, adicionalmente, asimismo una respuesta CD8 pronunciada que es específica para el antígeno representado por o dado como el agente biológicamente activo como se da a conocer y/o se define en esta memoria. Dicho de otro modo, el microorganismo utilizado como o al que se hace referencia como el primer constituyente en esta memoria, en esta realización, es decir que comprende un péptido de escape fagolisosómico y de modo más preferible que es adicionalmente ureC negativo, no está limitado a provocar la respuesta inmune CD8 específica del microorganismo, en contraste con lo que podría haber esperado un experto en la técnica.

En una realización preferida, dicho péptido o polipéptido de escape fagolisosómico es el polipéptido de escape fagolisosómico de *L-monoctogenes*, listeriolisina (Hly). La listeriolisina es una citolisina formadora de poros activada por sulfhidrilo y es responsable de la liberación de microorganismos *L.monoctogenes* a partir de vacuolas fagolisosómicas en el citosol de las células hospedadoras. Esta función de escape puede transferirse a diversas células bacterianas tales como *Bacillus subtilis*, cepas atenuadas de *Salmonella ssp.* y asimismo de *Mycobacterium*, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/EP2004/004345. Asimismo, la Solicitud de Patente Internacional WO 99/101496 da a conocer cepas recombinantes de *Mycobacterium bovis* que secretan proteínas de fusión de listeriolisina biológicamente activas. La célula bacteriana que forma el primer constituyente de la composición conforme a la presente invención exhibe por tanto un mecanismo de formación de poros para perforación de las membranas endosómicas que conduce a una inmunoprotectividad superior.

Será reconocido por los expertos en la técnica que existen varios dominios de escape fagolisosómicos, de los cuales se prefiere el dominio de escape fagolisosómico de listeria que se describe, por ejemplo, en US 5.733.151. Más preferiblemente, el dominio de escape fagolisosómico se deriva del organismo *L. monoctogenes*, y muy preferiblemente, el dominio de escape fagolisosómico está codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de a) una secuencia nucleotídica que comprende los nucleótidos 211-1722 que se muestran en SEQ. ID. NO. 1, b) una secuencia nucleotídica que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de a), y c) una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones severas con la secuencia de a) o b). Otros polipéptidos de escape fagolisosómicos que pueden utilizarse para dicho propósito son, entre otros, hemolisina (Perfringolisina) de *Clostridium perfringens* (O'Brien DK, et al. *Infect Immun.* 2004 Sep; 72(9):5204-15); hemolisina de *Vibrio*, más particularmente *Vibrio vulnificus* (Lee SE et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 5; 324(1): 86-91); hemolisina-citolisina de estreptococos grupo B (Liu GY et al., *Proc Natl Acad U S A.* 2004 Oct 5; 101(40):14491-14496. Epub 2004 Sep 20); hemolisina BL de *Bacillus*, más particularmente *Bacillus cereus* (Moravek M et al., *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Sep 1;238(1):107-13); hemolisina de *Bordetella*, más particularmente *Bordetella pertussis* (Bassinat L et al., *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5530-3); hemolisina de *Escherichia coli* (Wyborn NR et al.,

Microbiology. 2004 May;150(Pt 5):1495-505) and hemolisina de Shigella (Sharma K et al., Microbios. 2001;106(413):31-8).

5 Aparte de la secuencia nucleotídica representada en SEQ. ID. NO. 1, la presente invención comprende también secuencias de ácido nucleico que se hibridan con ella. En la presente invención, el término "hibridación" se utiliza como se define en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1111-1104). Conforme a la presente invención, se utiliza el término "hibridación" si puede observarse todavía una señal de hibridación positiva después de lavado durante una hora con 1X SSC y 0,1% SDS a 55°C, preferiblemente a 62°C y más preferiblemente a 68°C. Una secuencia que se hibrida con una secuencia nucleotídica según SEQ ID NO. 1 en dichas condiciones de lavado es una secuencia nucleotídica que codifica un dominio de escape fagolisosómico preferida por la presente invención.

10 Una secuencia nucleotídica que codifica un dominio de escape fagolisosómico como se describe arriba puede obtenerse directamente a partir de un organismo Listeria o de cualquier fuente recombinante, v.g. una célula recombinante de E. coli que contiene la molécula de ácido nucleico de Listeria correspondiente o una variante de la misma como se ha descrito arriba.

15 Debe reconocerse que dicha célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido de escape fagolisosómico y más particularmente dicha célula bacteriana que es una célula de Mycobacterium que comprende Hly está contenida en la composición conforme a la presente invención. Dicha célula bacteriana es adicionalmente deficiente en ureasa, más particularmente deficiente en ureC. A dicho organismo se hace referencia también como BCG: rBCGΔureC:Hly o como BKG.

20 Mycobacterium, y más particularmente Bacilo Calmette-Guerin (BCG) de Mycobacterium bovis ha sido utilizado ampliamente como vacuna viable para la prevención de la tuberculosis, aunque su eficacia es todavía cuestionable. Sin embargo, existe acuerdo en que BCG puede proteger contra, o al menos mejorar, formas severas de tuberculosis sistémica en los niños.

25 No obstante, se han desarrollado ahora nuevas formas de BCG. Los presentes inventores han encontrado que estas nuevas formas de BCG son particularmente útiles como adyuvantes cuando se administran junto con un agente biológicamente activo y pueden utilizarse por tanto como el primer constituyente de la combinación conforme a la presente invención como se define en las reivindicaciones.

30 La célula bacteriana que se utiliza como el primer constituyente de la combinación conforme a la presente invención es deficiente en ureasa. Este rasgo da como resultado un perfil de seguridad incrementado dado que, debido a la deficiencia en urea, la célula micobacteriana no podría sobrevivir en un ambiente en el que se requiera dicha actividad enzimática, tal como en el fagolisosoma.

35 La deficiencia en ureasa puede conseguirse desactivando parcial o completamente una o varias moléculas celulares de ácido nucleico que codifican una subunidad ureasa, particularmente ureA que codifica la subunidad A de ureasa, ureB que codifica la subunidad B de ureasa y/o ureC que codifica la subunidad C de ureasa. Las secuencias de ureA, ureB y ureC en Micobacterias, particularmente M. bovis y M. tuberculosis y las proteínas codificadas por ellas, han sido descritas por Reytrat et al. (1995) y Clemens et al (1995).

40 Preferiblemente, la cepa bacteriana deficiente en ureasa se obtiene por deleciones y/o inserciones de uno o varios nucleótidos en las secuencias de ácido nucleico codificantes de subunidades de ureasa y/o las secuencias de control de la expresión. Las deleciones y/o inserciones pueden generarse por recombinación homóloga, inserción de transposones u otros métodos adecuados.

En una realización especialmente preferida, la secuencia ureC está desactivada, v.g. por construcción de un vector suicida que contiene un gen ureC interrumpido por un gen marcador de selección, transformación de la célula diana con el vector y escrutinio de células positivas marcadoras de selección que tienen un fenotipo de ureasa negativo como ha sido descrito por Reytrat et al (supra).

45 Conforme a la presente invención, pueden utilizarse diversas especies de Mycobacterium como la célula bacteriana que forma el primer constituyente de la composición con arreglo a la presente invención, a saber M. bovis, M. tuberculosis, M. microti, M. smegmatis, M. canetti, M. marinum o M. fortuitum. Se da a conocer que pueden utilizarse otros microorganismos, preferiblemente microorganismos intracelulares, que exhiben una o ambas de las características mencionadas anteriormente, a saber que codifican o expresan un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, y que son negativos a la ureasa, más particularmente negativos a ureC.

50 En una realización adicional, la célula bacteriana respectiva está atenuada. En una realización más preferida, la célula bacteriana está atenuada pero está todavía viva y es más particularmente adecuada para provocar una respuesta TH1.

En una realización más preferida, la célula bacteriana respectiva es una célula bacteriana viva.

En una realización adicional, la célula bacteriana comprende además al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero. Como se utiliza en esta memoria, el término provocación de una respuesta inmune en un mamífero significa que después de exposición de dicho péptido o polipéptido al sistema inmune de un mamífero o parte del mismo, puede crearse una respuesta inmune que es una respuesta inmune mediada por las células B. Alternativamente, sin embargo, la respuesta inmune es una respuesta inmune mediada por células T, más preferiblemente una respuesta de células T CD8 restringidas por el MHC clase I.

Más preferiblemente, dicho péptido o polipéptido se selecciona del grupo que comprende auto-antígenos, antígenos tumorales, antígenos virales, antígenos parasitarios, antígenos bacterianos y fragmentos inmunógenos de los mismos. Preferiblemente, un fragmento inmunógeno es parte de un antígeno de este tipo que es capaz todavía de provocar una respuesta inmune. Un antígeno particular preferido es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium, como se describe con mayor detalle en esta memoria. Un antígeno viral preferido más particularmente son cuerpos densos de HCMV como se describe con mayor detalle en esta memoria. Otro antígeno adicional es un antígeno adecuado para provocar una respuesta inmune contra la tuberculosis y más específicamente contra Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. canetti, M. africanum y M. paratuberculosis. Un antígeno particularmente preferido es el antígeno 85. Dicho antígeno es, en una realización preferida, el segundo constituyente.

Se reconocerá adicionalmente por los expertos en la técnica que siempre que se hace referencia a un ácido nucleico y un ácido nucleico codificante de un polipéptido o proteína, respectivamente, el término comprende también aquellos ácidos nucleicos que codifican el polipéptido o proteína, que son opcionalmente un fragmento o una forma mutada de los mismos como se define preferiblemente en esta memoria, teniendo en cuenta la degeneración del código genético o teniendo en cuenta la necesidad de adaptar la secuencia al uso de codones del hospedador respectivo u organismo de producción.

La expresión que un polipéptido, proteína o antígeno se deriva de un organismo significa preferiblemente que la secuencia de aminoácidos del polipéptido proteína o antígeno respectivo es el único de los organismos respectivos, por el cual la secuencia y por tanto también el ácido nucleico correspondiente que codifica la misma pueden ser fragmentos y formas mutadas de los mismos.

Debe reconocerse que el péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero que es un antígeno puede ser el segundo constituyente de la composición. Está dentro de la presente invención que el péptido o polipéptido forma parte de un polipéptido de fusión. Preferiblemente, dicho polipéptido de fusión comprende el péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero o un dominio del mismo que tiene todavía este rasgo, y el polipéptido de fusión comprende adicionalmente un dominio de escape fagolisosómico, preferiblemente un dominio de escape fagolisosómico como se ha descrito arriba en conexión con las realizaciones del primer constituyente de la presente invención. El dominio de un polipéptido que es capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero puede ser, en el caso de que dicho péptido sea un antígeno bacteriano, derivado de un microorganismo, preferiblemente del género Mycobacterium y más preferiblemente de Mycobacterium tuberculosis o de Mycobacterium bovis. Este dominio tiene una longitud de al menos 6, preferiblemente de al menos 8 aminoácidos. El dominio inmunógeno es preferiblemente una población de un polipéptido Mycobacterium nativo. Sin embargo, están también dentro del alcance de la presente invención dominios inmunógenos modificados que pueden derivarse de un dominio inmunógeno nativo por sustitución, delección y/o adición de uno o varios aminoácidos. En una realización preferida, el dominio es un dominio de la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium.

En una realización, una proteína de fusión es codificada por una molécula de ácido nucleico recombinante, a saber la molécula de ácido nucleico conforme a SEQ ID NO. 1. Esta molécula de ácido nucleico comprende una secuencia codificante del péptido señal (nucleótidos 1 a 120), una secuencia que codifica un dominio inmunógeno (nucleótidos 112 a 153), una secuencia codificante del enlazador peptídico (nucleótidos 154 a 210), una secuencia codificante de un dominio fagolisosómico (nucleótidos 211 a 1722), una secuencia codificante de enlazador peptídico adicional (nucleótidos 1723 a 1800) y una secuencia codificante de un péptido aleatorio (nucleótidos 1801 a 1870). La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO. 2.

En una realización particularmente preferida, más particularmente cuando el primer constituyente es rBCGΔureC:Hly, el segundo constituyente es un agente biológicamente activo y más particularmente, una célula eucariota manipulada genéticamente como se define en las reivindicaciones. Más preferiblemente, dicha célula genéticamente manipulada expresa al menos una citocina. Una citocina como se utiliza en esta memoria es /una proteína secretada que influye en el comportamiento y las características de otras células. Citocinas preferidas son interleucinas, quimiocinas, linfocinas, monocinas y factores de crecimiento. Citocinas particularmente preferidas son interleucinas e interferones, donde las interleucinas preferidas son interleucina-1, interleucina-4, interleucina-12, preferiblemente interleucina-2, y el interferón es preferiblemente interferón-alfa, interferón-beta o interferón-gamma, más preferiblemente interferón-gamma.

Como se utiliza preferiblemente en esta memoria, una célula manipulada genéticamente es una célula modificada con relación a la constitución genética que está presente en la célula por inserción de material genético exógeno. Dicha modificación de la constitución genética comprende la introducción de material genético no presente todavía

en la célula, tal como para ser un ácido nucleico verdaderamente extraño, o para activar una parte del material genético endógeno, con lo cual dicho material genético endógeno no está presente o activo sin dicho material genético exógeno presente, por lo cual el material genético exógeno no es necesariamente un material genético, sino que puede ser a este respecto cualquier material activo. Los métodos para conseguir dicha modificación son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse material de DNA exógeno en la célula por tecnología de precipitación por fosfato de calcio, tecnología de vectores virales, electroporación, lipofección, sistemas de vectores virales tales como sistemas de virus adeno-asociados, microinyección o métodos biolísticos. El resultado de dicha manipulación genética es que la célula manipulada genéticamente podría ser capaz de expresar cierto producto génico que no se expresaba anteriormente.

Los presentes inventores han encontrado que la co-expresión de las interleucinas, y más particularmente la interleucina-2, e interferón-gamma, en combinación con la célula bacteriana descrita como el primer constituyente de la combinación conforme a la invención, proporciona una vía muy eficaz para aumentar la respuesta inmune de un organismo, más particularmente la respuesta TH1. La célula particular puede seleccionarse de una diversidad de células tales como células presentadoras de antígeno no profesionales, células presentadoras de antígeno profesionales, células tumorales y células dendríticas. Entre estos tipos de células, se prefieren particularmente las células tumorales. Después de la administración de tales células tumorales, los pacientes de cáncer en los cuales se han introducido dichas células tumorales, experimentan un efecto sobre la eficacia de los métodos de vacunación de tumores. Preferiblemente, las células utilizadas para tal proceso de vacunación se toman de la misma o una entidad de tumor similar que el tumor a tratar utilizando la combinación correspondiente a la presente invención. Los efectos beneficiosos de la utilización de células manipuladas genéticamente que se describen, entre otros, en la Solicitud de Patente Internacional WO 94/18995, se incrementan por tanto adicionalmente utilizando la célula bacteriana como formadora del primer constituyente de la combinación conforme a la presente invención.

Se da a conocer también que la célula presentadora de antígeno profesional es una célula dendrítica que, o bien se utiliza luego como agente biológicamente activo como se define en esta memoria, o es un componente adicional del agente biológicamente activo, por lo cual preferiblemente en dicha realización el activo biológicamente activo es una célula manipulada genéticamente, más preferiblemente una célula que expresa citocinas como se describe en esta memoria, en la cual la célula todavía más preferiblemente co-expresa dos citocinas y muy preferiblemente interleucina-2 e interferón-gamma. Las células dendríticas están cargadas preferiblemente con antígenos de un tumor, en cuyo caso el tumor es el correspondiente al tratamiento para el que se utiliza la célula dendrítica, preferiblemente en combinación con los adyuvantes que se describen en esta memoria y/o la combinación de un adyuvante y un agente biológicamente activo tal como, por ejemplo, dichas células co-expresantes de citocinas. La carga de las células dendríticas es conocida por los expertos en la técnica y, por ejemplo, se describe en Vari y Hart ((2004), *Cytotherapy*: 6(2): 111-121.). Tales células dendríticas, sea solas o en combinación con cualquiera de los adyuvantes descritos en esta memoria, particularmente BCG y BKG, o cualquier combinación de primer y segundo constituyente descrita en esta memoria, se utilizan preferiblemente para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en esta memoria. Preferiblemente, dicha enfermedad es cualquier enfermedad tumoral descrita en esta memoria.

Tumores y cánceres preferidos, respectivamente, que pueden tratarse utilizando esta clase de enfoque, son particularmente tumores o cánceres inmunógenos tales como, entre otros, melanoma, cáncer renal, tumor de mama, tumor cerebral, tumor prostático, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.

La expresión de una citocina y más particularmente la co-expresión de interleucina-2 e interferón-gamma permite una eficacia incrementada de los antígenos tumorales presentados por la célula manipulada genéticamente. La mejora en la respuesta anti-tumoral es producida por dos mecanismos diferentes que operan en la misma dirección. En el lado aferente, la secreción de IFN γ y aumenta la expresión de MHC y moléculas de adhesión en la superficie de la célula conduciendo a una mejor presentación de los antígenos específicos del tumor a las células T CD8⁺ por las moléculas MHC I y por tanto a un mejor reconocimiento de las células tumorales por las células T. En el lado eferente, la secreción de IL-2 en proximidad estrecha a las células tumorales aumenta la actividad de las células T CD8⁺. A este respecto, preferiblemente, la célula manipulada genéticamente que expresa al menos una citocina está en una realización preferida relacionada al menos en cierto grado con la entidad tumoral para cuyo tratamiento se utiliza. Por supuesto, se comprenderá que pueden utilizarse a este respecto otras líneas de células, en cuyo caso es más preferido que dicha célula además de ser manipulada genéticamente como se describe en esta memoria, exprese también ciertos antígenos característicos de la entidad del tumor a tratar de este modo.

Será reconocido por las personas expertas en la técnica que, en principio, la célula manipulada genéticamente puede ser una célula autóloga. Esto significa que se extrae una célula de un paciente a tratar utilizando la combinación conforme a la presente invención, en cuyo caso las células extraídas se extraen usualmente del tumor a tratar y las células se manipulan para convertirse en células manipuladas genéticamente como se definen en esta memoria. Subsiguientemente, esta clase de células se administra de nuevo al paciente como parte de la combinación conforme a la presente invención.

Con objeto de aumentar la eficacia de las células manipuladas genéticamente, estas células pueden expresar adicionalmente otra inmunomolécula. Como se utiliza en esta memoria, el término inmunomolécula comprende cualquier molécula que es adecuada para afectar al sistema inmunitario. Las inmunomoléculas comprenden, entre otras, citocinas, moléculas de adhesión, factor co-estimulador, antígeno asociado a un tumor, antígeno específico del tumor y antígeno parasitario.

En una realización adicional, la célula manipulada genéticamente es una célula alogénica. Una célula alogénica es, en una realización preferida, una célula que proviene de la misma especie, pero sin embargo no procede exactamente del mismo individuo. Las células alogénicas son células derivadas de la misma especie, pero antigénicamente distintas. En una realización particularmente preferida, la célula alogénica se hace coincidir con la población de células respectiva del tumor a tratar. Más preferiblemente, la coincidencia se referirá a algunas o la totalidad de las clases de antígenos linfocíticos humanos (HLA), tratándose los pacientes con utilización de la combinación conforme a la presente invención. Sin embargo, pueden utilizarse grados de coincidencia diferentes. Más particularmente, la coincidencia será una coincidencia de HLA clase I. El HLA clase I comprende subclases A, B y C. Una coincidencia de HLA clase I se dará si existe coincidencia entre la célula utilizada como el segundo constituyente de la composición conforme a la presente invención y las células que constituyen el tumor en un paciente a tratar utilizando dicha composición.

Se reconocerá que la coincidencia y la extensión requerida de la misma están dentro del alcance de las personas con experiencia ordinaria en la técnica. Un posible enfoque experimental consiste en inocular grupos diferentes de animales/pacientes con diferentes grados de coincidencia y enfrentarlos luego con el tumor a fin de examinar los efectos. Alternativamente, el test puede realizarse directamente a los pacientes del tumor.

Una línea de células particularmente preferida es LNCaP que co-expresa interleucina-2 e interferón-gamma y que va a ser utilizada como el segundo constituyente en conexión con la combinación conforme a la presente invención, más particularmente para el tratamiento de cáncer de próstata, en donde el primer constituyente es rBCG: Hly o rBCGΔureC:Hly.

En una realización adicional, el agente biológicamente activo o antígeno es un antígeno parasitario, más particularmente la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium. Preferiblemente, el antígeno respectivo se deriva de Plasmodium falciparum. Preferiblemente, el antígeno respectivo se deriva de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSP-1 de Plasmodium, preferiblemente de la proteína MSP-1 de Plasmodium falciparum. El término antígeno parasitario como se utiliza en esta memoria, significa el antígeno de longitud total así como fragmentos del mismo con la condición de que sean adecuados para provocar una respuesta inmune, más preferiblemente una respuesta inmune TH1 o respuesta mediada por TH1, preferiblemente en un mamífero, incluso más preferiblemente en conexión con la composición conforme a la presente invención, en cuyo caso el primer constituyente es muy preferiblemente rBCG:Hly y rBCGΔureC:Hly, respectivamente.

Esta realización es particularmente útil en el tratamiento de la malaria.

Está dentro de la presente invención que dicho antígeno parasitario puede ser expresado por una célula bacteriana que actúa como primer constituyente de la combinación conforme a la presente invención, o una célula eucariota que actúa como segundo constituyente de la composición conforme a la presente invención. Sin embargo, está también dentro de la presente invención que el antígeno parasitario sea expresado por la célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico como se especifica para diversas realizaciones de la presente invención.

Debe reconocerse que gp190/MSP está constituido por varios dominios existentes naturalmente y que tales dominios, solos o en combinación, pueden ser un antígeno parasitario como se utiliza preferiblemente en esta memoria. gp190/MSP1 ha sido considerado durante bastante tiempo como un candidato potencial para una vacuna contra la malaria. Sin embargo, su preparación ha sido considerada como extremadamente laboriosa, no permitiendo la producción en gran escala de este antígeno. Teniendo esto en cuenta, no se había dispuesto de una vacuna potencial contra la malaria. Sin embargo, basándose en la doctrina técnica de la Solicitud de Patente Internacional WO 98/14583, este antígeno de Plasmodium puede estar disponible ahora en grandes cantidades. Se reconocerá que dicho antígeno parasitario no está limitado al antígeno gp190/MSP1 sino que comprende también homólogos del mismo encontrados en otras especies de Plasmodium aparte de Plasmodium falciparum, tales como P. vivax. La doctrina técnica de dicha Solicitud de Patente Internacional permite a un experto en la técnica preparar cualquier cantidad de este antígeno necesaria a fin de incorporarlo en la composición conforme a la presente invención como segundo constituyente. Vacunas de DNA se describen, por ejemplo, en Grode L, Mollenkopf HJ, Mattow J, Stein M, Mann P, Knapp B, Ulmer J, Kaufmann SH. Aplicación de la proteómica micobacteriana para diseño de vacunas: protección mejorada por vacunación con Mycobacterium bovis BCG prime-Rv3407 DNA contra la tuberculosis. Infect Immun. 2004 Nov; 72(11):6471-9.

En una realización adicional, el agente biológicamente activo o antígeno es una partícula o grupo de partículas virales o una multitud de partículas virales que se libera(n) preferiblemente después de infección de células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV), en donde las partículas (a) están rodeadas por una membrana lipídica en la cual están incrustadas glicoproteínas virales, y (b) no contienen DNA viral ni cápsidas, o son cuerpos

densos, preferiblemente cuerpos densos de citomegalovirus humano. Tales partículas como se describirá con mayor detalle en esta memoria, se utilizan preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de una infección por citomegalovirus humano que es un virus beta-herpes. Un grupo particularmente relevante de individuos que pueden ser tratados utilizando la combinación conforme a este aspecto de la presente invención son pacientes que van a ser sometidos a trasplante de médula ósea.

En las personas inmunocompetentes, la infección por HCMV pasa normalmente desapercibida, teniendo en la mayoría de los casos síntomas moderados e inespecíficos.

Conforme a la doctrina técnica de la Solicitud de Patente Internacional PCT/EP00/01794, se ha demostrado que los denominados cuerpos densos de HCMV son eficientes en términos de inducir una respuesta inmune y finalmente una protección inmune contra la infección de HCMV. A este respecto, dichos cuerpos densos proporcionan una inducción de larga duración de anticuerpos neutralizadores que protegen contra la infección de HCMV de una manera que depende de la cepa. Esto se consigue por inducción eficiente de la denominada "respuesta de las células adyuvantes" (linfocitos T CD4-positivos) contra HCMV a fin de ayudar a la maduración de los linfocitos B secretores de anticuerpos. Adicionalmente, dichos cuerpos densos son adecuados para inducir la formación de células T citotóxicas contra HCMV, por lo cual los linfocitos de este tipo son de importancia crucial para la terminación de una infección de HCMV que ha tenido lugar y limita la propagación del virus en el cuerpo. Finalmente, tales cuerpos densos son adecuados para minimizar los efectos secundarios de una vacuna.

Los cuerpos densos son inducidos por la infección de HCMV y se liberan en el medio de cultivo de cultivos de fibroblastos humanos primarios infectados. Se trata de estructuras que son visibles bajo el microscopio electrónico y más del 90% de cuya masa proteínica está constituida por pp65. Son comparables con partículas de virus en el sentido de que están provistos de una membrana celular lipídica modificada por glicoproteínas virales y que son eyectados por la célula. Las glicoproteínas virales se encuentran muy probablemente en la conformación natural en esta envoltura. Dado que los cuerpos densos no contienen DNA viral alguno ni tampoco cápsula viral, no son infecciosos. Pueden concentrarse en gran cantidad a partir del sobrenadante de cultivo celular por métodos establecidos. Ambas aplicaciones de vacuna, tanto preventivas como terapéuticas, pueden realizarse utilizando tales cuerpos densos, particularmente en combinación con el adyuvante descrito en esta memoria.

Los cuerpos densos están rodeados por una membrana lipídica que hace posible fusionar las partículas con ciertas células de mamífero de tal modo que sus contenidos entran en el citoplasma de la célula. La membrana de las partículas contiene glicoproteínas virales que representan los antígenos principales para los anticuerpos neutralizantes de virus. Las partículas se caracterizan también por el hecho de que no contienen cantidad alguna de DNA viral ni cápsida. Adicionalmente, aquéllas contienen el antígeno viral pp65 de las células T (ppUL83) que estimula a la vez la formación de células T adyuvantes y es un antígeno esencial para inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra HCMV.

Estas propiedades, especialmente la combinación de antígenos capaz de inducir a la vez anticuerpos neutralizantes y una respuesta celular adecuada, hacen que las partículas sean adecuadas como vacunas contra HCMV.

Asimismo, los cuerpos densos inducen, con indiferencia de la ruta de administración, respuestas de las células T adyuvantes del tipo Th1, lo cual los cualifica como vacuna contra HCMV.

En una realización adicional, se describen cuerpos densos o partículas respectivas que contienen una proteína de fusión que comprende por una parte una o más secciones del antígeno pp65 de las células T (ppUL83) o la proteína y por otra parte una o más secciones de una o más proteínas diferentes.

Esto hace que sea posible optimizar la antigenicidad de las partículas dado que esta proteína de fusión está presente en gran cantidad en las partículas. Adicionalmente, se sabe que la expresión de antígenos de la respuesta inmune celular y humoral en una molécula puede aumentar claramente la antigenicidad. Las diversas secciones de pp65 y las otras proteínas pueden fusionarse directamente unas con otras, pero es posible también por ejemplo que cuatro secuencias enlazadoras que no son un constituyente natural de una de las proteínas implicadas, estén presentes entre las diversas secciones. Las secuencias de este tipo pueden originarse debido a la clonación o incorporarse deliberadamente a fin de influir en las propiedades del antígeno. Sin embargo, la proteína de fusión no contiene preferiblemente ninguna secuencia extraña que no sea un constituyente de una de las parejas de fusión. En tales realizaciones, la proteína de fusión está constituida por una o más partes de pp65 y una o más partes de una o más proteínas diferentes.

Es aplicable a todas las realizaciones mencionadas anteriormente en esta memoria que pp65 completa o una o más partes de la misma pueden estar presentes en la proteína de fusión. Para los fines de esta Solicitud de Patente, el enunciado "una proteína de fusión (constituida) de pp65" no debe entenderse como restringido a pp65 completo. Una "parte" o "sección" de una proteína presente en la proteína de fusión comprende al menos 6, preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9, 15 ó 20 aminoácidos consecutivos de la proteína de la que se deriva.

Una realización preferida comprende una proteína de fusión de pp65 (ppUL83) y uno o más epítomos neutralizantes de las glicoproteínas virales gB o gH. Partículas de este tipo pueden generarse como se describe en la Solicitud de

Patente Internacional PCT/EP00/01794. La proteína de fusión puede entrar, por la vía de absorción específica de antígeno, en células B específicas de glicoproteínas que son capaces a su vez de presentar epítomos tanto de las glicoproteínas como de pp65 en el contexto del MHC clase II. Adicionalmente, es posible también que porciones de la proteína de fusión sean presentadas por células presentadoras de antígeno (APC) profesionales en el contexto del MHC clase II. En ambos casos, el resultado es una estimulación eficiente de la respuesta T_H tanto a la proteína pp65 como a las glicoproteínas virales. Estas células T_H son capaces de estimular las células B específicas de glicoproteínas, que presentan péptidos de pp65 y glicoproteínas virales en el contexto de MHC clase II, para formar anticuerpos neutralizantes tanto homóloga como heterológamente. Además, las partículas de este tipo pueden, al igual que los viriones infecciosos, ser absorbidas en las células, y los péptidos de pp65 pueden introducirse por carga exógena en el camino del MHC clase I. Esto hace posible, excepcionalmente para vacunas muertas, una estimulación de la respuesta de CTL al HCMV.

En una realización preferida adicional, las partículas contienen una proteína de fusión constituida por pp65 y una o más partes de otra proteína de HCMV, la proteína IE1 (ppUL123). Las partes de la proteína IE1 que tienen que estar presentes en particular son aquéllas contra las cuales se forman las células T citotóxicas en humanos durante la infección natural. Los péptidos de la proteína IE1 son presentados en algunos casos por diferentes moléculas del MHC clase I que son péptidos de pp65. La adición de tales epítomos adicionales "CTL" de IE1 tiene por objeto asegurar que, después de la inmunización, los individuos inoculados que expresan moléculas de MHC clase I diferentes son capaces de generar CTL contra HCMV de una manera lo más exhaustiva posible.

En una realización preferida adicional, las partículas contienen una proteína de fusión constituida por pp65, uno o más epítomos neutralizantes de las glicoproteínas de HCMV y uno o más epítomos de CTL de IE1. La fusión de pp65 con los epítomos neutralizantes y epítomos de CTL tiene por objeto asegurar que es posible simultáneamente que tanto anticuerpos neutralizantes como CTL sean formados por los individuos inoculados de una manera lo más exhaustiva posible, es decir por el número máximo de personas que difieran en el patrón de MHC clase I.

En una realización preferida adicional, las partículas contienen una proteína de fusión de pp65 y uno o más epítomos de otro patógeno humano. Porciones adecuadas de otros patógenos humanos son antígenos contra los cuales se forman anticuerpos neutralizantes en humanos. Es posible, por una fusión de tales "antígenos neutralizantes" con el antígeno pp65 de las células T, esperar un aumento acusado en la respuesta inmune (respuesta de anticuerpos) comparada con el uso de la "neutralización de un antígeno" aislada. Ejemplos de tales "antígenos neutralizantes" que deberían mencionarse son proteínas de la superficie del virus de la hepatitis B (de la región HBsAg) del virus de la hepatitis C (por ejemplo E2), de virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, de la región Env), o de virus de la gripe (hemaglutinina, neuraminidasa, nucleoproteína) u otros patógenos virales. Patógenos humanos adecuados adicionales son bacterias tales como *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis* y otras. Finalmente, antígenos de patógenos eucariotas tales como plasmodios (malaria) podrían fusionarse a pp65.

En una realización preferida adicional, las partículas contienen una proteína de fusión constituida por pp65 y una o más porciones de proteínas de otros patógenos contra los cuales se generan CTL en humanos en la infección natural de estos patógenos. Ejemplos de tales epítomos de CTL que pueden mencionarse son porciones de proteínas de HIV-1, de HBV, de HCV o del virus de la gripe. La intención de un procedimiento de este tipo es utilizar las propiedades inmunógenas singulares de los cuerpos densos para generar CTL protectores contra los patógenos heterólogos en humanos.

En una realización preferida adicional, las partículas contienen una proteína de fusión constituida por pp65, uno o más epítomos neutralizantes de un patógeno heterólogo y uno o más epítomos de CTL del mismo patógeno. Esta fusión tiene por objeto asegurar que los individuos inoculados son capaces de formar a la vez anticuerpos protectores y CTL contra este patógeno.

La invención se refiere adicionalmente a partículas virales que contienen al menos dos glicoproteínas diferentes que son variantes de la misma glicoproteína de diferentes cepas HCMV.

Una realización preferida contiene exactamente dos variantes, correspondiendo una variante a la cepa de HCMV Towne, y correspondiendo la otra variante a la cepa de HCMV Ad169. La realización preferida contiene la glicoproteína gB tanto de la cepa Towne como de la cepa Ad169.

Estas dos proteínas pueden incorporarse con eficiencia idéntica en la membrana de los cuerpos densos recombinantes en la célula infectada. Tales cuerpos densos recombinantes son adecuados para inducir no sólo el solapamiento de las cepas sino también la respuesta inmune neutralizante específica de la cepa a las dos cepas de HCMV prototipo.

Se da a conocer también un método por el cual se preparan partículas virales que están completamente exentas de virus infeccioso. Como se utiliza preferiblemente en esta memoria, el término exento de virus infeccioso significa que las preparaciones así obtenidas no son infecciosas con respecto al nivel de detección. Si se producen partículas a partir de una población de células que ha sido infectada con HCMV, existe el riesgo de que partículas infecciosas de virus sean arrastradas durante la purificación de las partículas. Esto representa una desventaja para una vacuna.

El método minimiza este riesgo. A este fin, se produce inicialmente una cepa de HCMV que alberga una delección en un gen esencial. Por esta expresión se entiende una delección de la función del gen. En la mayoría de los casos, esta está basada en la ausencia de un producto génico funcional, pero es posible también que la función de una secuencia génica reguladora se altere de tal manera que el HCMV no sea ya viable. Esto puede tener lugar por alteración de la secuencia de ácido nucleico de HCMV, por ejemplo por mutaciones puntuales, delecciones reales, inserciones u otras mutaciones. Este virus deficiente puede replicarse únicamente de células que expresen el gen que ha sido delecionado en HCMV y por consiguiente lo hagan disponible para el ensamblaje de los viriones. Los fibroblastos primarios representan actualmente el único sistema razonablemente permisivo para la replicación in vitro de HCMV. La transfección estable de tales células ha sido posible hasta la fecha únicamente con ayuda de métodos de transferencia de retrovirus. Sin embargo, esto es una desventaja importante si tales células deben utilizarse para producir vacunas. El método de la invención pone a disposición células transfectadas de manera estable que pueden producirse sin transferencia de genes de retrovirus pero en las cuales puede replicarse también el HCMV.

El método comprende el uso de fibroblastos de prepucio humano que han sido transfectados de manera estable con el gen UL86 principal de la proteína de la cápsida. La transfección se lleva a cabo preferiblemente con un adyuvante que contiene lípido que conduce a una eficiencia de transfección muy alta. En una realización preferida, se emplea para la transfección el "reactivo Fugene" que puede adquirirse de Roche Diagnostics, Mannheim.

El virus deficiente cuyo gen UL86 principal de la proteína de la cápsida ha sido delecionado, puede replicarse en estas células. Si se infectan fibroblastos "no complementarios" con este virus deficiente, es posible aislar luego de los mismos partículas de vacuna viral exentas de partículas de virus infeccioso.

Otra posibilidad para la producción de las partículas sin riesgo de infección es reconstituir las partículas en células sin infección con HCMV. A este fin, todos los genes que codifican constituyentes de las partículas tienen que expresarse en estas células. Para este propósito, dichos genes tienen que insertarse en las células.

Para este propósito se utilizan preferiblemente células de insecto infectadas por baculovirus. Los genes que codifican los constituyentes polipeptídicos de las partículas se clonan en vectores de expresión de baculovirus. La producción de baculovirus recombinantes va seguida por co-infección de células de insecto, preferiblemente células Sf9, con los diversos virus. Los genes se expresan en las células de insecto, y los polipéptidos resultantes se combinan para dar las partículas deseadas. Finalmente, las partículas son liberadas por las células de insecto. Esto representa una posibilidad para producir partículas no infecciosas que pueden utilizarse como vacunas.

Una posibilidad alternativa consiste en clonar los constituyentes necesarios para reconstitución de cuerpos densos en baculovirus recombinantes bajo el control del promotor/intensificador IE principal (MIEP) de HCMV. Se ha demostrado que los baculovirus recombinantes son capaces de infectar células eucariotas superiores tales como, por ejemplo, células de mamífero, y que los genes extraños bajo el control de un promotor eucariota fuerte tal como MIEP se expresan fuertemente en tales células. La ventaja de un procedimiento de este tipo podría ser que cualesquiera modificaciones importantes, tales como glicosilación, de proteínas antigénicas de los cuerpos densos podrían tener lugar de una manera más natural en células de mamífero que en células de insecto. Adicionalmente, existen varias líneas de células de este tipo que han sido aprobadas ya para producción de vacunas.

En una realización adicional, el agente biológicamente activo o antígeno es una célula presentadora de antígeno, en donde dicha célula presentadora de antígeno presenta antígenos adecuados para provocar una respuesta inmune contra la tuberculosis y más específicamente contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. paratuberculosis*. En una realización preferida, la célula presentadora de antígeno es un microorganismo, más preferiblemente un microorganismo seleccionado del grupo que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. africanum* y *M. paratuberculosis*. La combinación conforme a la presente invención que comprende una célula bacteriana como primer constituyente y dicha célula presentadora de antígeno o dicho antígeno propiamente dicho como el segundo constituyente o como agente biológicamente activo, puede utilizarse preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de la tuberculosis. Preferiblemente, el antígeno es el antígeno 85.

Está dentro de la presente invención que el primer constituyente de la composición conforme a la presente invención como se define en las reivindicaciones en sus diversas formas descritas en esta memoria y en particular los microorganismos que tienen un dominio de escape fagolisosómico en sus diversas realizaciones tales como rBCGΔureC:Hly, es activo y puede utilizarse por tanto como adyuvante, lo que significa que el mismo es responsable del aumento del estado inmune de un paciente que va a ser tratado, o que se encuentra en necesidad de tratamiento. Más preferiblemente el estado inmune está relacionado con TH1 y aún más preferiblemente el estado inmune se caracteriza por un aumento en la respuesta TH1, en cuyo caso dicha respuesta TH1 está incrementada en comparación con un inhibidor sin tratar.

Como se da a conocer en esta memoria, el segundo constituyente es físicamente diferente o está separado físicamente del primer constituyente en la medida en que el mismo debe ser el agente que proporciona una respuesta específica biológica, bioquímica, fisiológica o médica del paciente. El hecho de que el primer y el segundo constituyente estén separados físicamente hace posible una administración independiente o separada de dichos dos constituyentes. En el caso en que el agente biológicamente activo o antígeno es una célula manipulada genéticamente que expresa una citocina y más preferiblemente cuando dicha célula es una célula de cáncer, la

respuesta inmune específica está dirigida contra los antígenos introducidos por dicha célula manipulada genéticamente. No obstante, tiene que reconocerse que las citocinas, debido a su modo de acción, proporcionan un efecto global beneficioso que podría considerarse como un efecto adyuvante, asimismo, como el proporcionado ya por el primer constituyente.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la combinación conforme a la presente invención y un portador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable u otro(s) vehículo(s). Preferiblemente, dichos portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos son inertes y no tóxicos. La composición farmacéutica está adaptada en sus diversas realizaciones para administración por diversas vías. Dicha administración comprende administración sistémica y local así como oral, subcutánea, parenteral, intravenosa, 10 intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intratecal e intraocular. Una composición farmacéutica preferida es un tampón acuoso o fisiológico que contiene a la vez el primer y el segundo constituyente.

- 15 Será reconocido por las personas expertas en la técnica que la cantidad de la composición farmacéutica a administrar depende del estado clínico del paciente individual, el sitio y método de administración, el protocolo de administración, la edad, el sexo, el peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La cantidad farmacéuticamente eficaz para propósitos de prevención y/o tratamiento se determina así por consideraciones tales como las conocidas en las técnicas médicas. Preferiblemente, la cantidad es eficaz para conseguir mejoras con inclusión, pero sin carácter limitante, de la mejora del estado de enfermedad o para proporcionar una recuperación, mejora o eliminación más rápida de los síntomas y otras indicaciones como las que se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en las técnicas médicas.

- 20 En una realización preferida, la composición farmacéutica conforme a la presente invención puede comprender otros compuestos farmacéuticamente activos.

La composición farmacéutica se formula preferiblemente de tal manera que proporcione una administración en una sola dosis o una administración multidosis.

- 25 En una realización, el primer constituyente y el segundo constituyente, como tales o como parte de una composición farmacéutica o como una composición farmacéutica, se proporcionan simultáneamente, sea como una sola formulación o como formulaciones separadas cada una. En el caso de una formulación separada, la primera formulación contiene el primer constituyente y la segunda formulación contiene el segundo constituyente. Dicha primera y dicha segunda formulación, respectivamente, están formuladas en realizaciones preferidas como cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en esta memoria.

- 30 Está también dentro de la presente invención que el primer y el segundo constituyente, respectivamente, se administren por separado. Preferiblemente, la diferencia del tiempo entre el primer y el segundo constituyente, respectivamente, es aproximadamente una hora o menos de una hora, con preferencia aproximadamente 30 minutos o menos, y más preferiblemente alrededor de 15 minutos o menos.

- 35 Se reconocerá que está también dentro de la presente invención el que el primer o el segundo constituyente o ambos constituyentes pueden, en las diversas formas que se describen en esta memoria, utilizarse para la prevención de cualquiera de las enfermedades descritas en esta memoria.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por referencia a las figuras y ejemplos de los cuales pueden deducirse características, realizaciones y ventajas adicionales de la invención, en los cuales

- 40 Fig. 1 muestra un diagrama que representa la respuesta inmune expresada como células CD8 + Tet + T después de administración combinada de BKG y vacuna comparada con los controles;

Figs. 2-4 muestran esquemas de inmunización para vacunación profiláctica de tumores;

Figs. 5-7 muestran esquemas de inmunización para vacunación terapéutica de tumores; y

Figs. 8 y 9 son diagramas que representan el efecto de esquemas de inmunización diferentes sobre el número de células T CD8 IFN-gamma positivas después de estimulación utilizando péptidos diferentes.

45 **Ejemplo 1: Uso de BKG como adyuvante para una vacuna tumoral.**

En este ejemplo, se describen experimentos a fin de determinar la idoneidad de BKG como adyuvante para una vacuna tumoral. BKG, como se hace referencia al mismo en esta memoria, expresa el péptido de escape fagolisosómico de *Listeria monocytogenes* (Hly) y es adicionalmente deficiente en ureC. Se hace referencia también en esta memoria a dicho BCG modificado como rBCG:delta ureC:Hly.

- 50 Básicamente, los pacientes y modelos animales, respectivamente, tienen que ser vacunados por un protocolo de vacunación estándar al que se hace referencia también como protocolo de refuerzo principal. Subsiguientemente, los animales se enfrentan a un tumor. En tales condiciones, los animales con vacunación por BKG/células tumorales después del enfrentamiento al tumor no desarrollarán tumor alguno o pueden resistir el enfrentamiento al tumor más

tiempo que el animal que recibió la vacunación tumoral sin BKG como adyuvante. Los pacientes con vacunación BKG/células tumorales pueden soportar su tumor durante más tiempo comparados con los pacientes que recibieron la vacunación del tumor sin BKG como adyuvante.

Salvo que se indique lo contrario, se utilizaron los materiales y métodos siguientes.

5 **Células:**

Se utilizaron las líneas de células siguientes: J558^{mOVA} (células J558 que expresan OVA y que tienen fijada la misma a la membrana celular), J558^{sOVA} (células J558 que expresan OVA y que secretan la misma en el ambiente) y EL-4^{OVA} (células EL-4 que expresan OVA). Los cultivos de células se mantuvieron inicialmente bajo presión de G418 durante 14 días. Un test de micoplasma dio resultado negativo. Después de pases iniciales para aumentar el número de células, las tres líneas de células se congelaron en porciones de 10×10^6 con DMSO y se guardaron en N₂ líquido durante al menos 7 días antes de la primera utilización en un animal.

Bacterias

Las bacterias utilizadas están etiquetadas: BKG (rBCG delta ureC:Hly); consignada ulteriormente como "BKG". BKG se había dejado crecer en medio completo 7H9, y se congeló en 10% glicerol/PBS. Las bacterias pudieron descongelarse y recongelarse una sola vez (pero se recongelaron solamente sin dilución previa).

Para la vacunación primaria y las dos vacunaciones de refuerzo siguientes, se inyectaron $19,3 \mu\text{L} = 1 \times 10^6$ BKG en los ratones.

Preparación de la vacuna:

Las células congeladas se descongelaron y se lavaron dos veces en medio DMEM estéril. Subsiguientemente, las células se resuspendieron en DMEM estéril y se contaron. El volumen total de inyección era 100 μL (preparado conforme a la Tabla 1). Antes de la inyección, las células se irradiaron con una jeringuilla estéril (radiación gamma de 150 Gy). Controles in vitro: a partir de células descongeladas antes de la irradiación y después de la irradiación, respectivamente, se retiró una parte alícuota por línea de células y se puso en cultivo de células. Estos controles demostraron una recuperación satisfactoria después de descongelación (células no irradiadas) y sin proliferación alguna de células durante más de 14 días después de la irradiación.

Ratones:

C57/B6 hembra de 12 semanas (entregados a la edad de 6 semanas y acomodados al laboratorio de test durante 6 semanas); vacunados por vía subcutánea, 100 μL ; aguja 25 G; base de la cola; después de 7 días, se extrajeron 0,3 ml de sangre para inmunomonitoreización (tetrámero para OVA) bajo anestesia general. El uso de los ratones fue aceptado por las autoridades respectivas.

Protocolo BKG del EXP. #1:

Día 0	Vacunación primaria (Principal)
7 días	Primera extracción de sangre
28 días	Primera vacunación de refuerzo (primer Refuerzo)
35 días	Segunda extracción de sangre
53 días	Segunda vacunación de refuerzo (segundo Refuerzo)
60 días	Tercera extracción de sangre
74 días	Enfrentamiento al tumor

Los ratones utilizados se dividieron en dos grupos experimentales y un grupo de control:

- grupo de vacunación más BKG (n = 9): subgrupos #1.1, #1.3 y #1.5 (véase Tabla 1)
- grupo de vacunación menos BKG (n = 9): subgrupos #1.2, # 1,4 y #1.6
- grupo de control (n = 2): subgrupo #1.7.

Tabla 1: Subgrupos y vacunas inyectadas

Grupo Exp.	Células	BKG	DMEM [μ L]	BKG [n]	BKG [μ L]	Células [n]	Células [μ L]	n =
#1.1	J558mOVA	+	-	1x10 ⁶	19,3	10 x 10 ⁶	80,7	3
#1.2	J558mOVA	-	-	-	-	10 x 10 ⁶	100,0	3
#1.3	J558sOVA	+	-	1x10 ⁶	19,3	10 x 10 ⁶	80,7	3
#1.4	J558soVA	-	-	-	-	10 x 10 ⁶	100,0	3
#1.5	EL-4OVA	+	-	1x10 ⁶	19,3	10 x 10 ⁶	80,7	3
#1.6	EL_4OVA	EL-4OVA	-	-	-	10 x 10 ⁶	100,0	3
#1.7	Ctr	-	100	-	-	-	-	2
								20

Alojamiento de los Animales:

Condiciones S2, jaulas IVC, 2 jaulas; intervalo de cambio 3-4 días.

5 Análisis FACS:

Se realizó una prueba FACS para detectar la cantidad de células T específicas de SIINFEKEL en modalidad a ciegas. Después de clasificar los componentes celulares, se congela el plasma y se guarda para evaluación ulterior a -80°C.

Experimentos In Vitro Paralelos:

10

Cultivo de células Generación de las células para vacunación y enfrentamiento al tumor in vitro. Se utilizaron controles de las células en los experimentos con animales. Se utilizaron cultivos de las células como controles en los experimentos FACS, por produciéndose los tetrámeros

Vectorología Se ha diseñado un vector (SINvector) recombinante para IL-2, IFN gamma y OVA. Este vector se utiliza para crear una línea de células de tumor de ratón correspondiente a las células LNCaP-IL-2-IFN gamma

Resultados:

15 Los primeros resultados de la monitorización inmunológica que se representa en la Figura 1 muestran que existe cierta tendencia hacia una mayor cantidad de células T que son capaces de reconocer el péptido OVA en el grupo de ratones que tenían BKG como adyuvante que en el grupo de animales que no tenían adyuvante alguno. Esto respalda el hecho de que BKG es un adyuvante para una vacunación de tumor que mejora la respuesta inmunológica a la vacuna.

Ejemplo 2: Optimización del régimen de tratamiento para vacunación de tumor utilizando BKG

20 Los que sigue es un protocolo para optimización del régimen de administración del concepto terapéutico reseñado en el Ejemplo 1 a fin de permitir que un experto en la técnica optimice el régimen de tratamiento básico descrito en esta memoria. Los materiales y métodos son como se reseña en conexión con el Ejemplo 1 anterior, si no se indica lo contrario.

25 Régimen 1: Utilizando la línea de células J558 transfectadas triple y establemente (H2K^b) que expresaba IL-2, IFN gamma y ovoalbúmina, se inyectan tres dosis diferentes de estas células en ratones (C57 BL/6 (H2K^b)), a saber 5 x 10⁶ células, 10 x 10⁶ células y 15 x 10⁶ células. Para cada dosis, el grupo de ratones está constituido por 5 animales y su esquema de inyección es como sigue: inmunización principal con 3 refuerzos cada 30 días; con lo cual la inyección ocurre con o sin BKG (1 x 10⁶ CFU). Los animales se examinan inmunológicamente tanto si presentan respuesta inmune específica de ovoalbúmina como en caso negativo, y en particular un aumento en la respuesta inmune mediada por BKG.

30 Régimen 2:

Esta prueba consiste en una serie de Experimentos Preliminares ("Experimentos Preliminares 1 a 7") y experimentos mayores ("Experimentos 1 a 4").

Experimento Preliminar 1: Decisión de la dosis del tumor de vacunación con y sin BKG como adyuvante

5 Un total de 14 grupos de ratones, constituido cada uno por 5 ratones (C57BL/6 (H2K^b)) se inmunizan con dosis crecientes de tumor de vacunación (cada 2 de los 14 grupos reciben la misma dosis de tumor de vacunación). El tumor de vacunación se compone de células tumorales J559 alogénicas irradiadas que expresan ovoalbúmina (H2K^b) que se inyectan por vía subcutánea. Se inyecta BKG a una dosis de 1×10^6 CFU junto con las células tumorales en 7 grupos. Después de una semana, así como 5, 9 y 13 semanas, se extraen 0,5 ml de sangre de los animales, y se ensaya la reacción inmune específica de ovoalbúmina por medio de ELISA, tinción intracelular de citocinas o tinción con tetrámero. Se utiliza un total de 7 dosis de células diferentes de los tumores de vacunación con o sin BKG. Las dosis respectivas son $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$, $50,0 \times 10^6$, 100×10^6 por lo que las pruebas clínicas correspondientes en seres humanos utilizan dosis con un intervalo preferido de 10×10^6 a 300×10^6 células. Los ratones en el total de dos grupos de control no reciben tumor de vacunación alguno. Un grupo de control recibe una inyección de BKG.

15 Experimento Preliminar 2: Decisión de la dosis de tumor de test (melanoma B16_{OVA})

En esta prueba, cuatro grupos de ratones (C57BL/6 (H2K^b)) reciben dosis crecientes del tumor de test (melanoma B16_{OVA} por vía subcutánea). Se monitoriza el crecimiento del tumor hasta que el volumen del tumor alcanza 2 cm. Una vez que se alcanza este volumen de tumor, se sacrifican los ratones por eutanasia, se recupera la sangre y el material de tumor y se guarda para análisis in vitro. Si no hay crecimiento alguno del tumor, los ratones se sacrifican al cabo de 12 semanas. Una vez más, cada grupo consiste en 5 ratones, utilizándose 4 dosis de células diferentes del tumor de test, a saber $1,0 \times 10^6$ células, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$, y $50,0 \times 10^6$ células.

Experimento Preliminar 3: Determinación de la dosis de adyuvante

25 Basándose en la dosis identificada en el Experimento Preliminar 1, la dosis de BKG se varía, variándose la dosis del adyuvante por un factor de 10, 100 y 1000, y 0,1, 0,01 y 0,001 comparada con la dosis que se utiliza en el Experimento Preliminar 1. Después de una semana, así como de 5, 9 y 13 semanas, se extraen 0,5 ml de sangre de los animales y se ensaya la reacción inmune específica de ovoalbúmina por medio de ELISA, tinción intracelular con citocina o tinción con tetrámero.

Experimento Preliminar 4: Estudios sobre el modo de administración

30 La dosis de las células tumorales de vacunación determinada en el Experimento Preliminar 1 y la dosis de BKG determinada en el Experimento Preliminar 3 se varían con relación al modo de administración. Los modos de administración son intravenosa, intradérmica, intraperitoneal e ipsilateral subcutánea. Para cada modo de administración, la dosis de BKG es 1 vez, 0,1 veces o 0,01 veces la dosis como se define en el Experimento Preliminar 3. Los modos de administración ensayados en esta memoria son similares a un uso clínico potencial con humanos y difieren con relación al compartimiento del sistema inmune que se ha puesto en contacto primeramente con el adyuvante. Después de una semana, así como de 5, 9 y 13 semanas, se extraen 0,5 ml de sangre de los animales y se ensaya la reacción inmune específica de ovoalbúmina por medio de ELISA, tinción intracelular con citocinas o tinción con tetrámero.

Experimento Preliminar 5: Estudios sobre el esquema de inmunización

40 Utilizando la dosis de las células tumorales de vacunación como se define en el Experimento Preliminar 1 y la dosis de BKG determinada en el Experimento Preliminar 3, se examinan los esquemas de inmunización siguientes:

1. Esquema de inmunización 1: una co-inyección simple de tumor de vacunación y adyuvantes (grupos de control)
2. Esquema de inmunización 2: este esquema corresponde a la inmunización profiláctica de algunas enfermedades como sarampión, en la que existe una inmunización triple básica y un refuerzo, en el cual la inmunización básica se realiza al comienzo, después de 2 y 4 semanas y se administra un refuerzo después de 6 semanas más
3. Esquema de inmunización 3: este esquema corresponde a un esquema que resultó esencial para vacunación terapéutica acompañada de una aplicación en curso de las vacunas en un intervalo de vacunación distinto. Más específicamente, pueden definirse los 3 subesquemas siguientes.

Esquema de inmunización 3a: vacunación cada 3 semanas (última muestra de sangre y eutanasia después de 12 semanas);

Esquema de inmunización 3b: vacunación cada 6 semanas (última toma de muestra de sangre y eutanasia después de 25 semanas);

Esquema de inmunización 3c: vacunación cada 12 semanas (última toma de muestra de sangre y eutanasia después de 43 semanas).

Los tres esquemas de inmunización se repiten, por lo cual la dosis del adyuvante BKG es o bien la dosis determinada en el Experimento Preliminar 3, o la dosis 10 veces mayor o 10 veces menor de la misma.

Experimento Preliminar 6: Decisión de la Dosis del tumor de vacunación (TRAMP) con y sin BKG

- 5 Un total de 12 grupos de ratones TRAMP (Jackson Laboratory Lines Núms. 003135) se vacunan con 0,1 veces, 1 vez, y 10 veces la dosis de células tumorales de vacunación TRAMP-C1 definida en la bibliografía (5×10^6 células). Las células del tumor de vacunación se utilizan sin modificación genética alguna (wtTRAMP) o como células transfectadas con IL-2/IFN γ . Los ratones se inmunizan por vía subcutánea utilizando 5×10^5 , 5×10^6 y 5×10^7 células TRAMP. Seis grupos reciben 1×10^6 CFU BKG como adyuvante activo junto con las células tumorales. Una semana después de la inmunización y subsiguientemente después de cada 6 semanas, se extraen 0,5 ml de sangre y se determina la reacción inmune específica de TRAMP-C1 por ELISA, tinción intracelular de citocinas o tinción de tetrámero. Cada 12 semanas se realiza una CT a fin de monitorizar el progreso de la enfermedad. Los ratones TRAMP que experimentan una enfermedad de cáncer de próstata sin efecto alguno tienen que sacrificarse a la edad de 32 a 35 semanas a fin de evitar sufrimiento innecesario. Con objeto de explorar si debido a la vacunación puede observarse un cambio en el rasgo de la enfermedad, los ratones deben observarse hasta la semana 40-ava.

Experimento Preliminar 7: Estudios sobre la dosis de adyuvante

- La dosis de las células del tumor de vacunación determinada en el Experimento Preliminar 6 se varía con relación a la dosis de BKG (0,1 vez, 1 vez y 10 veces la dosis BKG determinada en el Experimento Preliminar 6). Análogamente al Experimento Preliminar 6, tanto wtTRAMP-C1 como las células IL-2/IFN γ -TRAMP-C1 modificadas por ingeniería genética se ensayan. Una semana después de la inmunización y posteriormente cada 6 semanas, se extraen nuevamente muestras de 0,5 ml de sangre de los animales y se determina la reacción inmune específica de TRAMP-C1 por ELISA, tinción intracelular de citocinas o tinción de tetrámero. Cada 12 semanas se realiza una CT a fin de monitorizar el progreso de la enfermedad. La última toma de muestra de sangre y la eutanasia se realizan en la semana 40.

Experimento 1: Vacunación profiláctica de tumor utilizando el sistema de ovoalbúmina

- Se inmunizan ratones C57BL/6 (H2K^b) utilizando células tumorales de vacunación, es decir células tumorales J558 alogénicas irradiadas que expresan ovoalbúmina (H2K^b) con una dosis como se define en el Experimento Preliminar 1. Algunos de los animales reciben el adyuvante activo BKG (dosis definida en el Experimento Preliminar 3) junto con el tumor de vacunación. Después de una semana, se extraen de nuevo de los animales 0,5 ml de sangre y se determina la reacción inmune específica de ovoalbúmina por ELISA, tinción intracelular de citocinas o tinción de tetrámero. Después de 4 semanas más, la reactividad del sistema inmune contra las células de tumor vivas se determina por medio de inyección subcutánea de células tumorales B16 que expresan ovoalbúmina y control regular del crecimiento del tumor con la dosis de las células tumorales que corresponde a la determinada en el Experimento Preliminar 2.

- Adicionalmente, el efecto BKG sobre el aumento de la reacción inmune específica del tumor se compara con bacterias BCG de tipo salvaje. Como modalidad de administración, se utiliza la modalidad óptima determinada en el ejemplo preliminar 4 en combinación con los dos esquemas de inmunización óptimos determinados en el Experimento Preliminar 5 que comprenden el esquema de refuerzo principal óptimo y el esquema óptimo de aplicación continua.

Experimento 2: Vacunación terapéutica de tumor utilizando el sistema de ovoalbúmina

- En contraste con la inmunización profiláctica de tumores como se expone en el experimento 1, se genera un crecimiento de tumor en ratones C57BL/6 (H2K^b) por inyección subcutánea de las células tumorales de test no irradiadas utilizando la dosis identificada en el Experimento Preliminar 2. Una vez que el tumor tiene un diámetro de 0,5 cm, se ensayan los esquemas de vacunación descritos en el Experimento 1. Los tests se detienen una vez que el tumor ha alcanzado un diámetro de 2 cm. Sin embargo, los animales se monitorizan durante un máximo de 1 año. A fin de reflejar los procesos inmunológicos que tienen lugar, se extraen 0,5 ml de sangre de los ratones cada 4 semanas con objeto de determinar la respuesta inmune como se define en el experimento 1.

Experimento 3: Vacunación profiláctica de tumor (TRAMP)

- Los ratones TRAMP exhiben primeramente neoplasia intraepitelial en la sexta a séptima semana y un cuadro clínico acusado de carcinoma de próstata a partir de la semana decimoquinta. Dicho carcinoma de próstata está limitado

localmente al comienzo, pero a partir de la semana 24 en adelante aproximadamente el 10% de los animales desarrollan metástasis y pueden esperarse condiciones graves de enfermedad comenzando a partir de la semana 32 a la 35. La vacunación profiláctica del tumor se inicia a partir de la semana quinta en adelante. Se utiliza una sola inyección de células de tumor de vacunación sin adyuvante y con adyuvantes. Como células tumorales de
 5 vacunación se utilizan células TRAMP-C1 radiadas letalmente, que es una línea de células de carcinoma de próstata derivada de ratones TRAMP. Las células del tumor de vacunación se utilizan sin ser modificadas por ingeniería genética (wtTRAMP) o como células transfectadas con IL-2/IFN γ . Adicionalmente, se ensayan los dos esquemas de inmunización óptimos (esquema de refuerzo principal y esquema de largo plazo) como se determina en los experimentos preliminares. Como control del desarrollo de Pa los animales se someterán a CT cada 12
 10 semanas. Pueden definirse los grupos siguientes:

- | | | |
|----|--------|--|
| | HV3.1 | sin vacunación (grupo de control) |
| | HV3.2 | vacunación con tumor sólo (células wtTRAMP-C1) s. c. |
| | HV3.3 | vacuna BKG (células wtTRAMP-C1 + BKG) s. c. |
| | HV3.4 | vacuna BCG (células wtTRAMP-C1 + BCG) s. c. |
| 15 | HV3.5 | vacunación con tumor sólo (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.6 | vacuna BKG (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 20 | HV3.7 | vacuna BCG (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.8 | vacunación con tumor sólo (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.9 | vacuna BKG (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 25 | HV3.10 | vacuna BCG (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.11 | vacunación con tumor sólo (células IL2/IFN γ -TRAMP-C1) s. c. |
| | HV3.12 | vacuna BKG (células IL2/IFN γ TRAMP-C1 + BKG) s. c. |
| | HV3.13 | vacuna BCG (células IL2/IFN γ -TRAMP-C1 + BCG) s. c. |
| 30 | HV3.14 | vacunación con tumor sólo (IL2/IFN γ TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.15 | vacuna BKG (IL2/IFN γ -TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 35 | HV3.16 | vacuna BCG (IL2/IFN γ -TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.17 | vacunación con tumor sólo (IL2/IFN γ -TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV3.18 | vacuna BKG (IL2/IFN γ -TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 40 | HV3.19 | vacuna BCG (IL2/IFN γ -TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |

El esquema de inmunización de los grupos HV3.2 a HV3.4 y HV3.11 a HV3.13 se representa como Fig. 2, representando los números

1: nacimiento de los ratones; semana -5

45 2: vacunación; tiempo 0 (ratones a la edad de 5 semanas)

3: toma de muestra de sangre después de una semana

4: toma de muestra de sangre después de siete semanas

5: toma de muestra de sangre y CT después de 13 semanas

6: toma de muestra de sangre después de 19 semanas

7: toma de muestra de sangre y CT después de 25 semanas

5 8: toma de muestra de sangre después de 31 semanas

9: toma de muestra de sangre y CT después de 37 semanas

10: toma de muestra de sangre después de 40 semanas y eutanasia de los ratones

El esquema de inmunización de los grupos HV3.5 a HV3.7 y HV3.14 a HV3.16 se representa como Fig. 3, representando los números

10 1: nacimiento de los ratones; semana -2

2: vacunación; tiempo 0 (principal I)

3: toma de muestra de sangre después de una semana

4: vacunación después de dos semanas (principal II)

5: vacunación después de cuatro semanas (principal III) (a la edad de 6 semanas)

15 6: toma de muestra de sangre después de cinco semanas

7: vacunación después de ten semanas (vacunación de refuerzo) (a la edad de 12 semanas)

8: toma de muestra de sangre y CT una semana después de la vacunación de refuerzo

9: toma de muestra de sangre siete semanas después de la vacunación de refuerzo

10: toma de muestra de sangre y CT 13 semanas después de la vacunación de refuerzo

20 11: toma de muestra de sangre 19 semanas después de la vacunación de refuerzo

12: toma de muestra de sangre y CT 25 semanas después de la vacunación de refuerzo

13: toma de muestra de sangre 28 semanas después de la vacunación de refuerzo (a la edad de 40 semanas) y eutanasia de los ratones

25 El esquema de inmunización de los grupos HV3.8 a HV3.10 y HV3.17 a HV3.19 se representa como Fig. 4, representando los números

1: nacimiento de los ratones; semana -2

2: primera vacunación; tiempo 0

3: toma de muestra de sangre después de una semana

30 4: segunda vacunación después de seis semanas (intervalo de vacunación como se determina en el Experimento Preliminar 5)

5: toma de muestra de sangre después de una semana

6: tercera vacunación después de doce* semanas

7: toma de muestra de sangre y CT después de una semana

8: cuarta vacunación después de 18* semanas

35 9: toma de muestra de sangre después de una semana

10: quinta vacunación después de 24* semanas

11: toma de muestra de sangre y CT después de una semana

12: sexta vacunación después de 30* semanas

13: toma de muestra de sangre después de una semana

14: toma de muestra de sangre después de seis semanas

15: toma de muestra de sangre después de 40 semanas y eutanasia de los ratones

* el intervalo de vacunación depende de los resultados del Experimento Preliminar 5

5 Experimento 4: Vacunación terapéutica de tumores (TRAMP)

10 Todos los ratones TRAMP desarrollan un tumor prostático a la edad de 15 semanas, que se desarrolla plenamente en la semana 32 y causa problemas clínicos a los animales. Por tanto, los animales deben inmunizarse en la semana 24. El experimento se detiene una vez que se cumple uno de los criterios de parada. Como máximo, los animales deben monitorizarse durante 40 semanas. A fin de monitorizar los procesos inmunológicos, se toma una muestra de sangre de 0,5 ml de los ratones cada 6 semanas y se estudia la respuesta inmune como se describe en conexión con el experimento 1, y se utiliza un procedimiento de obtención de imágenes tal como CT, cada 12 semanas. Se utilizan las mismas células tumorales que se describen en conexión con el experimento 3.

Se ensayan los grupos siguientes.

- | | | |
|----|---------|--|
| | HV4.1 | sin vacunación (grupo de control) |
| 15 | HV4.2 | tumor de vacunación sólo (células wtTRAMP-C1-C1) s.c.) |
| | HV4.3 | vacuna BKG (células wtTRAMP-C1-C1 + BKG) s. c. |
| | HV4.4 | vacuna BCG (células wtTRAMP-C1-C1 + BCG) s. c. |
| | HV4.5 | tumor de vacunación sólo (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 20 | HV4.6 | vacuna BKG (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV4.7 | vacuna BCG (wtTRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 25 | HV4.8 | tumor de vacunación sólo (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV4.9 | vacuna BKG (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HCV4.10 | vacuna BCG (wtTRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 30 | HV4.11 | tumor de vacunación sólo (IL2/IFNgamma-células TRAMP-C1) s. c. |
| | HV4.12 | vacuna BKG (IL2/IFNgamma-células TRAMP-C1 + BKG) s.c. |
| | HV4.13 | vacuna BCG (IL2/IFNgamma-células TRAMP-C1 + BCG) s. c. |
| | HV4.14 | tumor de vacunación sólo (IL2/IFNgamma-TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 35 | HV4.15 | vacuna BKG (IL2/IFNgamma-TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV4.16 | vacuna BCG (IL2/IFNgamma-TRAMP) como refuerzo principal como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| 40 | HV4.17 | tumor de vacunación sólo (IL2/IFNgamma-TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HV4.18 | vacuna BKG (IL2/IFNgamma-TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |
| | HCV4.19 | vacuna BCG (IL2/IFNgamma-TRAMP) como inmunización a largo plazo como se determina en el Experimento Preliminar 5 |

Fig. 5 muestra el esquema de inmunización 1 para los grupos HV4.2-HV4.4 y HV4.11-HV4.13, representando los números:

- 1: nacimiento de los ratones
- 2: toma de muestra de sangre después de 6 semanas
- 5 3: toma de muestra de sangre y CT después de 12 semanas
- 4: toma de muestra de sangre después de 18 semanas
- 5: vacunación después de 24 semanas
- 6: toma de muestra de sangre y CT después de 25 semanas
- 7: toma de muestra de sangre después de 30 semanas
- 10 8: toma de muestra de sangre y CT después de 36 semanas
- 9: toma de muestra de sangre después de 40 semanas y eutanasia de los ratones

Fig. 6 muestra el esquema de inmunización 2 para los grupos HV4.5-HV4.7 y HV4.14-HV4.16, representando los números:

- 1: nacimiento de los ratones
- 15 2: toma de muestra de sangre después de 6 semanas
- 3: toma de muestra de sangre y CT después de 12 semanas
- 4: toma de muestra de sangre después de 18 semanas
- 5: vacunación después de 24 semanas (principal I)
- 6: toma de muestra de sangre y CT después de 25 semanas
- 20 7: vacunación después de 26 semanas (principal II)
- 8: vacunación después de 28 semanas (principal III)
- 9: toma de muestra de sangre después de 30 semanas
- 10: vacunación (vacunación de refuerzo) después de 34 semanas
- 11: toma de muestra de sangre y CT después de 36 semanas
- 25 12: toma de muestra de sangre después de 40 semanas y eutanasia de los ratones

Fig. 7 muestra el esquema de inmunización 3 para los grupos HV4.8-HV4.10 y HCV4.17-HV4.19, representando los números:

- 1: nacimiento de los ratones
- 2: toma de muestra de sangre después de 6 semanas
- 30 3: toma de muestra de sangre y CT después de 12 semanas
- 4: toma de muestra de sangre después de 18 semanas
- 5: vacunación después de 24 semanas (principal I)
- 6: toma de muestra de sangre y CT después de 25 semanas
- 7: vacunación después de 30 semanas (principal II)
- 35 8: toma de muestra de sangre después de 31 semanas
- 9: vacunación después de 36 semanas (principal III)
- 10: toma de muestra de sangre y CT después de 37 semanas
- 11: vacunación después de 42 semanas (principal IV)

12: toma de muestra de sangre después de 43 semanas y eutanasia de los ratones

Los intervalos de vacunación dependen preferiblemente de los resultados del Experimento Preliminar 5.

Ejemplo 3: Composición para el tratamiento del cáncer de próstata

5 Una composición que es adecuada para el tratamiento del cáncer de próstata contiene como primer constituyente BCG, que expresa el péptido de escape fagolisosómico de *Listeria monocytogenes* (Hly) y es adicionalmente deficiente en ureC. A dicha BCG modificada se hace referencia también en esta memoria como rBCG:delta ureC:Hly. La composición contiene como segundo constituyente células LNCaP modificadas por ingeniería genética. Estas células son células de carcinoma de próstata que expresan interleucina-2 (IL2) recombinante, e interferón-gamma (IFNgamma). Preferiblemente, tales células LNCaP expresan ambas citocinas de una manera aproximadamente equimolar. Esta clase de células LNCaP se describen v.g. en la Solicitud de Patente Internacional WO 94/18995. Tales células de cáncer de próstata recombinantes se irradiaron con rayos gamma a fin de destruir su capacidad para replicarse antes de la utilización.

15 Ambos constituyentes se suspendieron en una solución salina tamponada con fosfato y se proporcionaron para administración a un paciente. La composición contiene 1×10^6 células BCG y 1×10^6 células LNCaP contenidas en 50 µL. La composición se inyecta por vía intravenosa. Con objeto de ensayar la eficacia, se realiza un análisis ELISPOT. Dicho análisis ELISPOT se describe, por ejemplo, en Mollenkopf H.J., Dietrich G., Fensterle J., Grode L., Diehl K.D., Knapp B., Singh M., O'Hagan D. T., Ulmer J.B., y Kaufmann S.H. Eficacia protectora mejorada de una vacuna de DNA de la tuberculosis por adsorción en micropartículas catiónicas de PLG. Vaccine. 29 de julio de 2004; 22 (21-22): 2690-5.

20 En un régimen de tratamiento alternativo, se administra una sola vez la composición arriba mencionada, seguida por administración ulterior de las células LNCaP. A este respecto, es un principio general de la presente invención que el primer y el segundo constituyente pueden administrarse con una frecuencia diferente y siguiendo un patrón de tiempo diferente.

25 En ensayos clínicos se registra la histología y estadificación de los tumores clínicos, así como el estado de salud de los pacientes así tratados. Un parámetro sustitutivo será la evolución del nivel de PSA y el número de pacientes que tienen una evolución favorable del nivel de PSA.

Debido a la combinación particular administrada al paciente, se observará una evolución favorable tanto del nivel de PSA como una tasa mejorada de supervivencia que es mayor comparada con los efectos observados sin el adyuvante, es decir después de la administración de las células LNCaP exclusivamente.

30 **Ejemplo 4: Uso de BKG como adyuvante para una vacuna de HCMV**

Este ejemplo presenta la combinación con éxito de BKG como adyuvante y cuerpos densos de HCMV como se describe en esta memoria a fin de inducir inmunidad celular contra la infección con el citomegalovirus humano. Más particularmente, se demuestra que puede inducirse inmunidad celular en un periodo de tiempo corto. Dicha inducción rápida de inmunidad al HCMV es particularmente importante en pacientes que sufren un trasplante de médula ósea que acompaña con gran frecuencia a una infección de HCMV amenazante para la vida. Para los pacientes de trasplante existe necesidad de regeneración rápida de la inmunidad celular dado que no hay tiempo para una vacunación a lo largo de un periodo de tiempo más largo conforme a la práctica estándar.

Se utilizó el esquema de vacunación siguiente:

Antígeno: cuerpos densos

40 dosificación: 20 mg/animal

esquema de inmunización:

D: día 0/7/21

C: día 0/7

B: día 0

Adyuvante: dosificación: 1×10^6 /animal

45 esquema de inmunización: día 0

Estructura de los grupos:

Gr.	Número de animales	Vacunas (por animal) día 0	Vacunas (por animal) día 7	Vacunas (por animal) día 21
A	4			
B1	6	20 µg cuerpos densos		
B2	6	20 µg cuerpos densos + 1×10^6 BKG		
C1	6	20 µg cuerpos densos	20 µg cuerpos densos	
C2	6	20 µg cuerpos densos + 1×10^6 BKG	20 µg cuerpos densos	
D1	6	20 µg cuerpos densos	20 µg cuerpos densos	20 µg cuerpos densos
D2	6	20 µg cuerpos densos + 1×10^6 BKG	20 µg cuerpos densos	20 µg cuerpos densos

La preparación se realiza cada 8 y 9 días, respectivamente, después de la última inmunización.

Los resultados se representan en Figs. 8 y 9, donde Fig. 9 es un diagrama que representa el número de células IFN-gamma-positivas por 10^5 células T CD8+ después de estimulación con una mezcla de péptidos específica de HCMV (de JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania). Las secuencias se toman de la proteína pp65 de HCMV. Se trata de una mezcla (Pepmix) de 138 péptidos (de 15 aminoácidos cada uno) que exhiben superposiciones de secuencia de 11 aminoácidos). Fig. 8 es un diagrama similar al de Fig. 9, en el cual el número respectivo de células T CD8+ se determinó después de estimulación con un péptido de control inespecífico. Como puede deducirse de dichas figuras, en el caso de utilización de BKG como adyuvante en la vacunación inicial, en cada caso, el número de células CD8 IFN-gamma-positivas por 10^5 células T CD8 aumentaba significativamente. El aumento más pronunciado puede observarse en los grupos B2 y C2. Esto significa que una vacunación básica con BKG en combinación con cuerpos densos, en la cual los cuerpos densos se administran el día 0 y al cabo de 7 días, es ya suficiente para aumentar significativamente el número de células IFN-gamma-positivas. Esto confirme el descubrimiento sorprendente subyacente de la presente invención, en el sentido de que es posible inducir inmunidad celular contra HCMV cuando se combinan a la vez cuerpos densos y BKG.

Ejemplo 5: Composición para el tratamiento y prevención de la malaria

Una composición para el tratamiento y prevención de la malaria comprende un primer constituyente rBCG:delta ureC:Hly y como segundo constituyente el antígeno de malaria gp190/MSP1. Se reconocerá que el antígeno puede estar presente como un péptido o formar parte de un péptido, polipéptido o incluso proteína mayor.

La composición comprende 50 µg de la proteína MSP1 y aproximadamente 1×10^6 rBCG:delta ureC:Hly en 50 µL de un tampón de PBS. La composición se administra por vía subcutánea a ratones. Después de la inmunización, el bazo y la sangre de los ratones inmunizados se recogerán y se utilizarán en métodos analíticos.

El progreso del proceso de vacunación se monitoriza una vez más utilizando la tecnología ELISPOT (Mollenkopf H.J., supra) y un ensayo de inhibición de la invasión de Merozoítos (Blackman et al., 1990 J. Exp. Med. Volumen 172 p: 379-382). Se espera una estimulación inmune y secreción de IFN-gamma mejoradas después de estimulación con péptidos específicos de MSP-1. Se espera también inhibición de la invasión inducida por los sueros recogidos de ratones inmunizados. Los resultados de ELISPOT IFN-gamma y de la inhibición de Merozoítos están correlacionados con las protecciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Vakzine Projekt Management GMBH
<120> Combinación de una célula bacteriana y un agente biológicamente activo
<130> V 10001 PCT
- 10 <140>
<141>
- <150>
<151>
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 20 <210> 1
<211> 1881
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: molécula de ácido nucleico recombinante
- <220>
<223> CDS que comprende un dominio fagolisosómico (211-1722 nt) y un codón de terminación (1879-1881)
- 30 <400> 1

```

atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca 60
gcggtgtag tccttccggg cctggtgggg cttgccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg 120
ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcagtctg caaagcaatc cgctgcaaat 180
aaattgcact cagcaggaca aagcacgaaa gatgcatctg cattcaataa agaaaattca 240
atbtcacca tggcaccacc agcatctccg cctgcaagtc ctaagacgcc aatcgaaaag 300
aaacacgcgg atgaaatcga taagtatata caaggattgg attacaataa aaacaatgta 360
ttagtatacc acggagatgc agtgacaaat gtgccgccaa gaaaaggtta caaagatgga 420
aatgaatata ttgttggtga gaaaaagaag aaatccatca atcaaaataa tgcagacatt 480
caagttgtga atgcaatttc gagcctaacc tatccagggtg ctctcgtaaa agcgaattcg 540
gaattagtag aaaatcaacc agatgttctc cctgtaaaac gtgattcatt aacactcagc 600
attgatattg caggtatgac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgcactaaa 660
tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgctcaa 720
gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca 780
caattaattg cgaaatttgg tacagcattt aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaac 840
ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagttttaa acaaatctac 900
tataacgtga atgttaatga acctacaaga ccttcagat ttttcggcaa agctgttact 960
aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctctgcata tatctcaagt 1020
gtggcgtatg gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta 1080
aaagctgctt ttgatgctgc cgtaagcgga aaatctgtct caggtgatgt agaactaaca 1140
aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa 1200
gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact 1260
tttaatcgag aacaccagg agttcccatt gcttatacaa caaacttctt aaaagacaat 1320
gaattagctg ttattaaana caactcagaa tatattgaaa caacttcaaa agcttataca 1380
gatggaaaaa ttaacatcga tcaactctgga ggatacgttg ctcaattcaa catttcttgg 1440
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa 1500
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga 1560
aatattaatg ttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatgggtg gagaacggta 1620
attgatgacc ggaacttacc acttggtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg 1680
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga 1740
agtcagggtg atcttaatcc attaattaat gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt 1800
ctttcctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgta ggcgcggtac cggaattcga 1860
agcttatcga tgtcgacgta g

```

<210> 2
5 <211> 626
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia 1 de ácidos nucleicos

<400> 2

ES 2 524 921 T3

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
 1 5 10 15

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
 20 25 30

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45

Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser
 50 55 60

Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr
 85 90 95

Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly
 100 105 110

Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val
 115 120 125

Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
 130 135 140

Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile
 145 150 155 160

Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val
 165 170 175

Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val
 180 185 190

Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn
 195 200 205

Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn
 210 215 220

Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala
 245 250 255

Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala
 260 265 270

ES 2 524 921 T3

Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys
 275 280 285

Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn
 290 295 300

Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr
 305 310 315 320

Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala
 325 330 335

Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser
 340 345 350

Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val
 355 360 365

Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys
 370 375 380

Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu
 385 390 395 400

Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys
 405 410 415

Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr
 420 425 430

Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn
 435 440 445

Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile
 450 455 460

Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp
 465 470 475 480

Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
 485 490 495

Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser
 500 505 510

Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu
 515 520 525

Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg
 530 535 540

Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr
 545 550 555 560

Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala
 565 570 575

Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile
 580 585 590

Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu
 595 600 605

ES 2 524 921 T3

Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
610 615 620

Ser Thr
625

REIVINDICACIONES

1. Una combinación adecuada para uso en un método para provocación de una respuesta inmune TH1, en donde la combinación comprende un primer constituyente y un segundo constituyente separado, en donde el primer constituyente es una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa; y en donde el segundo constituyente es un antígeno.
2. Una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa, para uso como adyuvante.
3. La combinación conforme a la reivindicación 1 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 2 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde la célula es una célula de Mycobacterium bovis.
4. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, y la célula bacteriana conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde al menos un ácido nucleico codificante de una subunidad celular de ureasa de la célula bacteriana está desactivado.
5. La combinación conforme a la reivindicación 4 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 4 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde al menos la secuencia codificante de la subunidad C de ureasa bacteriana está desactivada.
6. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, y la célula bacteriana conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el dominio de escape fagolisosómico es un dominio de escape fagolisosómico de Listeria.
7. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6 y la célula bacteriana conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el dominio fagolisosómico está codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:
- una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 211-1722 como se muestra en SEQ. ID. NO. 1;
 - una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de a); y
 - una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones severas con la secuencia de a) o b).
8. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7 y la célula bacteriana conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde la célula bacteriana comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.
9. La combinación conforme a la reivindicación 8 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 8 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el péptido o polipéptido se selecciona de autoantígenos, antígenos tumorales, antígenos virales, antígenos parasitarios, antígenos bacterianos y fragmentos inmunógenos de los mismos.
10. La combinación conforme a la reivindicación 8 ó 9 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 8 ó 9 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el péptido o polipéptido forma parte de un polipéptido de fusión.
11. La combinación conforme a la reivindicación 10 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 10 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el polipéptido de fusión comprende
- al menos un dominio de un polipéptido, en donde el dominio de polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero, y
 - un dominio de escape fagolisosómico.
12. La combinación conforme a la reivindicación 11 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 11 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el polipéptido es el polipéptido que se define en la reivindicación 8 o parte del mismo.
13. La combinación conforme a la reivindicación 11 ó 12 y la célula bacteriana conforme a la reivindicación 11 ó 12 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde el dominio de escape fagolisosómico es un dominio del dominio de escape fagolisosómico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

14. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13 y la célula bacteriana conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 para uso como se define en la reivindicación 2, en donde la célula bacteriana es rBCG Δ ureC:Hly.
- 5 15. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14, en donde el antígeno se selecciona del grupo que comprende una célula tumoral inmunógena, una célula eucariota que expresa un antígeno asociado a un tumor, una célula eucariota que expresa un antígeno específico de tumor y una célula que expresa un antígeno parasitario.
- 10 16. La combinación conforme a la reivindicación 6, en donde la célula del tumor es un tumor inmunógeno y en donde la célula del tumor se selecciona preferiblemente del grupo que comprende células de melanoma, células de carcinoma renal, células de tumor de mama, células de tumor cerebral, células de tumor prostático, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.
17. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en donde la célula es una célula alogénica y está adaptada al HLA clase I.
- 15 18. La combinación conforme a la reivindicación 15, en donde el antígeno parasitario es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium, preferiblemente Plasmodium falciparum, o un fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.
19. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14, en donde el antígeno es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium, preferiblemente Plasmodium falciparum, o un fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.
- 20 20. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14, en donde el antígeno es citomegalovirus humano.
21. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14, en donde el antígeno es una partícula viral o una multitud de las mismas, liberada(s) preferiblemente después de infección de células de mamífero por el citomegalovirus humano, en donde las partículas (a) están rodeadas por una membrana lipídica en la cual están embebidas glicoproteínas virales, y (b) no contienen cantidad alguna de DNA viral ni cápsidas.
- 25 22. La combinación conforme a la reivindicación 21, en donde las partículas contienen una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno de las células T pp65 (UL83) y una o más partes de una o más proteínas que no son pp65.
- 30 23. La combinación conforme a la reivindicación 22, en donde el antígeno pp65 de las células T está fusionado a una o más partes de una glicoproteína del citomegalovirus humano, en donde la glicoproteína se selecciona del grupo que comprende la glicoproteína gH de HCMV, la proteína IE₁ de HCMV (ppUL123), y la glicoproteína gB de HCMV.
- 35 24. La combinación conforme a la reivindicación 22, en donde el antígeno de las células T está fusionado a una o más partes de una proteína que forma parte de un patógeno humano distinto de HCMV.
25. La combinación conforme a la reivindicación 24, en donde el patógeno se selecciona del grupo que comprende HIV-1, HBV, HCV y gripe.
26. La combinación conforme a la reivindicación 21 a 25, en donde la(s) partícula(s) contiene(n) partes de al menos dos glicoproteínas que son variantes de una glicoproteína particular de cepas de HCMV diferentes.
- 40 27. La combinación conforme a la reivindicación 26, en donde una de las dos variantes de la glicoproteína particular de HCMV es la variante de la cepa Towne de HCMV, y la otra es la variante de la cepa Ad 169 de HCMV.
28. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde las células de mamífero son fibroblastos, preferiblemente fibroblastos de prepucio.
29. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28, en donde la partícula es un cuerpo denso.
- 45 30. La combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 14, en donde el antígeno es un cuerpo denso, preferiblemente un cuerpo denso de HCMV, o un cuerpo denso conforme a la reivindicación 29.
31. Una composición farmacéutica, en donde la composición comprende una combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 32. Uso de una combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 30 o de una composición farmacéutica conforme a la reivindicación 31 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas.

33. Uso conforme a la reivindicación 32, en donde el cáncer es un tumor inmunógeno y se selecciona más preferiblemente del grupo que comprende cáncer de próstata, melanoma, carcinoma renal, tumor de mama, tumores cerebrales, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de colon, y tumor escamoso de cabeza y cuello.
34. Uso conforme a la reivindicación 32, en donde la enfermedad infecciosa es malaria.
- 5 35. Uso conforme a la reivindicación 34, en donde el antígeno es la proteína gp190/MSP1 de Plasmodium o un fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero.
36. Uso conforme a la reivindicación 32, en donde la enfermedad infecciosa es infección de HCMV.
37. Uso conforme a la reivindicación 36, en donde el antígeno es un cuerpo denso como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 10 38. Uso de una combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 30 para la fabricación de una vacuna terapéutica y/o profiláctica para provocar una respuesta inmune TH1.
39. La combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 30 o la composición farmacéutica de la reivindicación 31, para uso en un método para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad y se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar la combinación conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 30 o la composición farmacéutica conforme a la reivindicación 31.
- 15 40. La combinación y composición farmacéutica conforme a la reivindicación 39, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas.
41. Un método para la fabricación de una composición farmacéutica conforme a la reivindicación 31, que comprende los pasos de
- 20 - proporcionar como primer constituyente una célula bacteriana que comprende al menos una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un péptido o polipéptido de escape fagolisosómico, en donde la célula bacteriana es una célula de Mycobacterium que es deficiente en ureasa;
- proporcionar como segundo constituyente un antígeno; y
- formular el primer constituyente y el segundo constituyente en una composición farmacéutica.

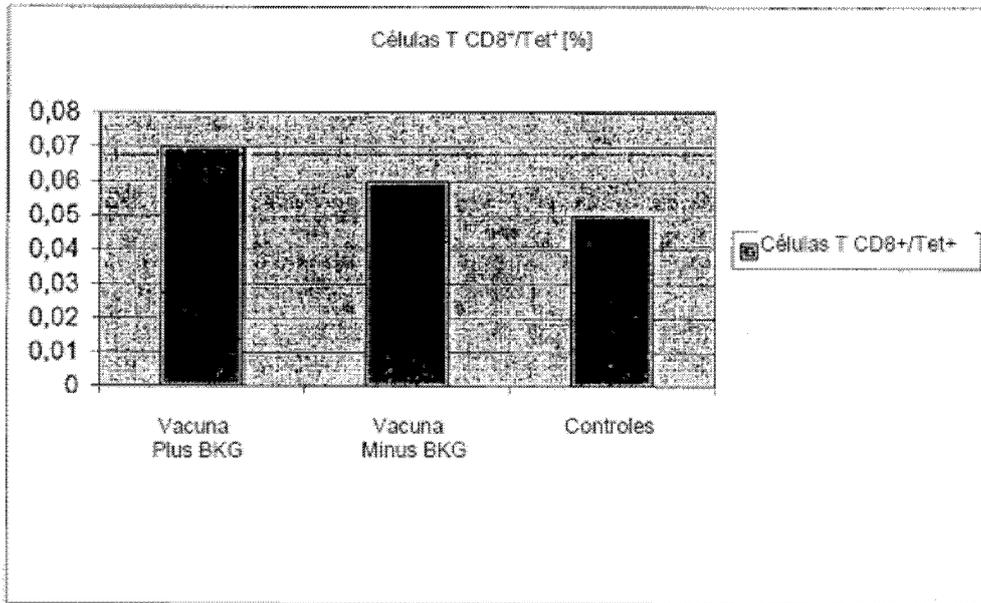


Fig. 1

Experimento 3: Esquema de inmunización 1: Gr. HV3.2 – HV3.4 y HV3.11 – HV3.13



Fig. 2

Experimento 3: Esquema de inmunización 2: Gr. HV3.5 – HV3.7 y HV3.14 – HV3.16



Fig. 3

Experimento 3: Esquema de inmunización 3: Gr. HV3.8 – HV3.10 y HV3.17 – HV3.19

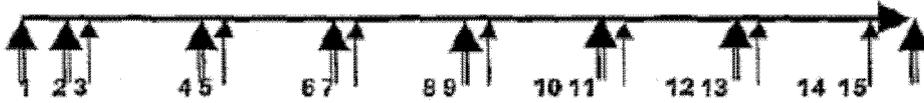


Fig. 4

Experimento 4: Esquema de inmunización 1: Gr. HV4.2 – HV4.4 y HV4.11 – HV4.13

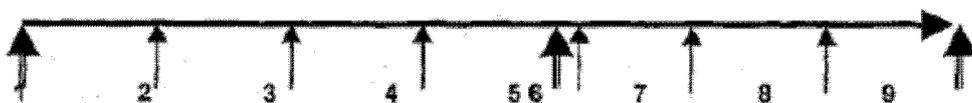


Fig. 5

Experimento 4: Esquema de inmunización 2: Gr. HV4.5 – HV4.7 y HV4.14 – HV4.16

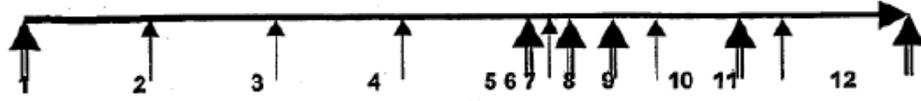


Fig. 6

Experimento 4: Esquema de inmunización 3: Gr. HV4.8 – HV4.10 y HV4.17 – HV4.19

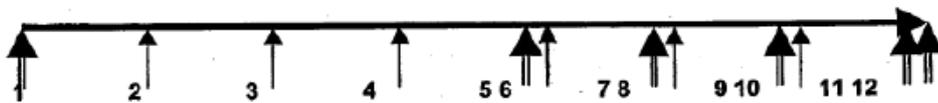


Fig. 7

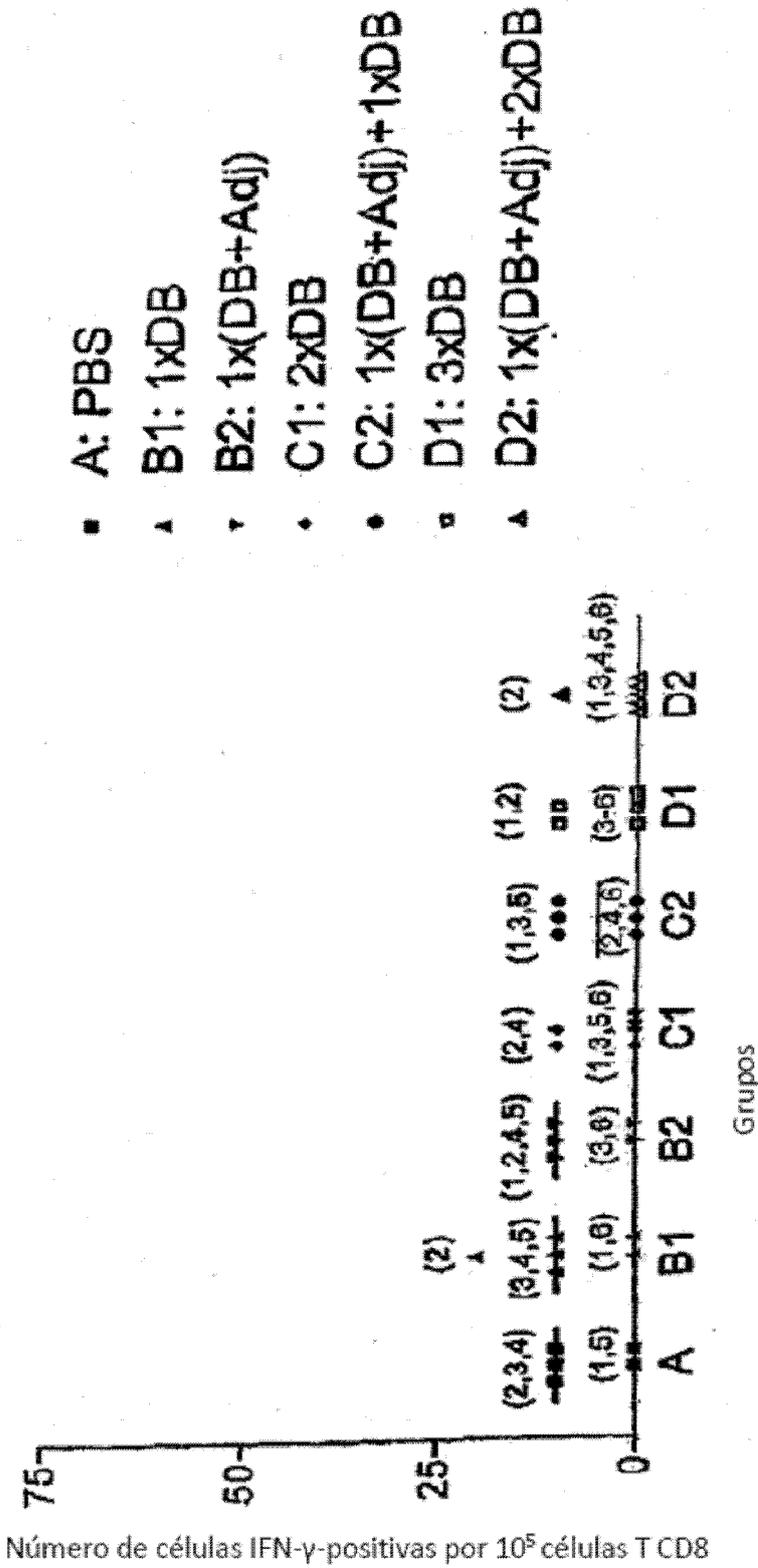


Fig. 8

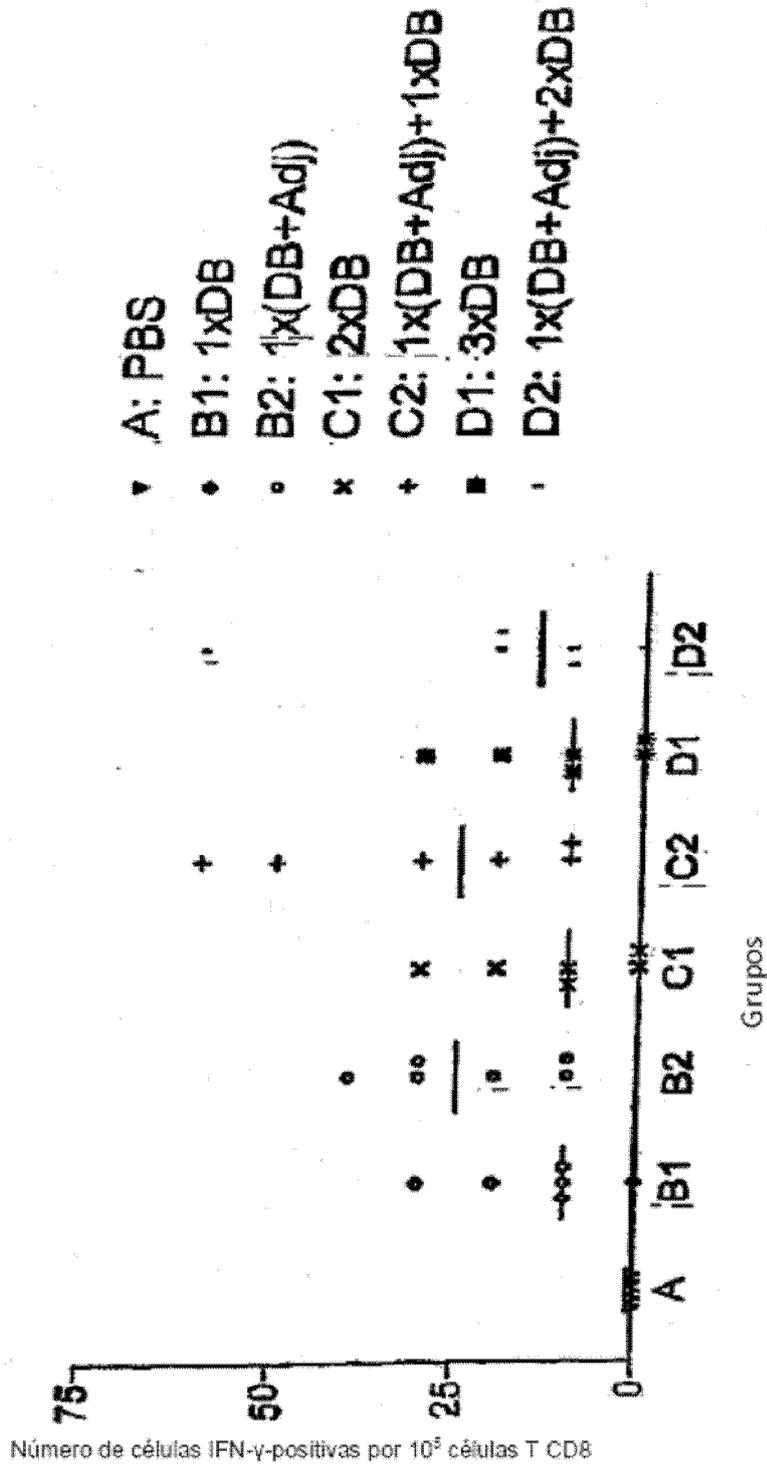


Fig. 9