

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 035**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011** **E 11805020 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2656070**

54 Título: **Determinación de la eficacia de una vacunación anti-micobacteriana recombinante viva**

30 Prioridad:

21.12.2010 US 201061425442 P

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

06.05.2016

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE y
VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DESEL, CHRISTIANE;
KAUFMANN, STEFAN H.E.;
BANDERMANN, SILKE y
GRODE, LEANDER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 035 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

Determinación de la eficacia de una vacunación anti-micobacteriana recombinante viva

- 5 La invención se refiere a métodos y reactivos para determinar la eficacia de una vacuna, particularmente de una vacuna contra la tuberculosis.

10 Cada año, hasta 2 millones de personas mueren de tuberculosis (TB) (1). La única vacuna disponible contra TB es el bacilo Calmette-Guerin (BCG) de *Mycobacterium bovis*, que se usó en seres humanos por primera vez en 1921 (2). Hasta la fecha, se han administrado 4 billones de dosis de BCG, convirtiéndola en la vacuna humana más ampliamente usada en todo el mundo (3). Pese a ello, aún estamos muy lejos de haber conseguido la erradicación de TB. La vacunación con BCG previene la meningitis por tuberculosis y TB miliar en bebés (4). Sin embargo, la protección contra otras formas de TB, especialmente TB pulmonar en adolescentes y adultos, no es concluyente como se enfatiza por un meta-análisis, que reveló que las eficacias de protección que variaban del 0-80 % en adultos (5). Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevas vacunas contra TB. Actualmente, las nuevas estrategias de vacunación contra TB en ensayos clínicos incluyen BCG recombinante para remplazar BCG canónico así como vacunas de subunidad y vacunas basadas en vector vírico no replicante para sensibilizar a BCG de refuerzo (6) (7).

20 La identificación de mecanismos inmunológicos subyacentes a la protección puede facilitar un diseño racional de novedosas estrategias de vacunación para la prevención de TB. Además, esta estrategia podría revelar biomarcadores indicativos para inmunidad protectora que podrían revelar criterios de valoración sustitutos de resultado clínico en ensayos de eficacia de vacuna contra TB clínica, y por tanto podría reducir su duración así como facilitar el ensayo de cantidades mayores de candidatos de vacuna en ensayos paralelos. Se han iniciado estudios de observación centrados en contactos sanos recién infectados de pacientes con TB y en bebés vacunados con BCG para definir dichos marcadores (8). A pesar de la amplia investigación sobre la respuesta inmunitaria a TB, los elementos fundamentales de la memoria protectora aún tienen que dilucidarse. Después de vacunación con BCG, son difíciles de detectar las células T CD4 de memoria específicas de antígeno debido a la escasez de antígenos inmunodominantes. Actualmente, los biomarcadores más ampliamente usados se basan en frecuencias elevadas de células T CD4 que producen IFN γ . Las evidencias crecientes cuestionan el valor de IFN γ como correlato de protección en TB (9,10). Indudablemente, IFN γ desempeña un papel crucial en la defensa contra MTB (11), pero la determinación de IFN γ solo ya no puede considerarse como un marcador fiable de inmunidad protectora.

35 Se describe una cepa de BCG recombinante que expresa un dominio de escape fagolisosómico en el documento WO99/10496. El dominio de escape fagolisosómico posibilita que la cepa escape del fagosoma de células hospedadoras infectadas perforando la membrana del fagosoma. Para proporcionar un pH fagosómico ácido para una actividad óptima de escape fagolisosómico, se desarrolló una cepa recombinante deficiente en ureasa. Esta cepa se describe en el documento WO2004/094469.

40 Una cepa recombinante $\Delta ureC$ Hly+ rBCG (rBCG) que expresa listeriolisina perforante de membrana (Hly) de *Listeria monocytogenes* y desprovista de ureasa C induce protección superior contra exposición aerogénica con MTB en comparación con BCG precursor (pBCG) en un modelo preclínico (12). Esta construcción de vacuna ha demostrado de forma satisfactoria seguridad e inmunogenicidad en un ensayo clínico en fase I (documento US 61/384.375).

45 Jay. K. Kolls (Semin. Immunopathol. (2010), 32; 1-2) (44) describe que células T auxiliares tipo 17 (Th17) han demostrado tener papeles críticos en autoinmunidad e inflamación tisular. Además, estas células pueden inducirse después de vacunación y han demostrado ser críticas para la eficacia de la vacuna contra patógenos tanto extracelulares como intracelulares.

50 Cassan et al. (Clin. Vaccine Immunol. (2010), 17(7); 1066-1073) (45) se refiere a células Th17 y T reguladoras inducidas por vacuna en adultos sanos inmunizados con BCG de *Mycobacterium bovis* vacunados con una nueva vacuna contra la tuberculosis, MVA85A.

55 Lin et al. (Semin. Immunopathol. (2010), 32(1); 79-90) (46) describe el papel de IL17 en respuestas celulares protectoras inducidas por vacuna contra varios patógenos y enfermedades infecciosas, como el patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*.

60 Desel et al. (Journal of Infectious Diseases (2011), 204 (10); 1573-1584) (47) describe un BCG recombinante $\Delta ureC$ gly+ que induce protección superior sobre BCG precursor estimulando una combinación equilibrada de respuestas de citoquina tipo 1 y tipo 17.

65 En el presente estudio, se demuestra que rBCG y pBCG inducen marcadas respuestas inmunitarias Th1, mientras que solamente rBCG provoca una profunda respuesta Th17 adicionalmente. También se observó un reclutamiento prematuro de linfocitos T específicos de antígeno al pulmón tras infección por MTB de ratones vacunados con rBCG. Estas células T producían abundantes citoquinas Th1 después de re-estimulación. La eficacia protectora superior de rBCG aparentemente era dependiente de IL17. La elevada producción de IL17 después de vacunación con rBCG, pero no con pBCG, también se detectó en voluntarios sanos durante un ensayo clínico en fase I. Nuestros hallazgos identifican una ruta inmunológica

general como marcador para estrategias mejoradas de vacunación contra TB que también puede explorarse por candidatos de vacuna de subunidad.

5 Un objeto de estudio de la presente invención es un método para determinar la eficacia de una vacuna, que comprende determinar la respuesta inmunitaria Th17 en un sujeto vacunado, donde la presencia de una respuesta inmunitaria Th17 es indicativa de inmunidad protectora en dicho sujeto.

10 Un aspecto adicional de la presente invención es un kit de reactivos para determinar la eficacia de una vacuna, que comprende al menos un reactivo para detectar una respuesta inmunitaria Th17.

15 En una realización preferida, la vacuna es una vacuna viva, particularmente una célula de *Mycobacterium*. En una realización incluso más preferida, la vacuna es una *Mycobacterium* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un dominio capaz de provocar una respuesta inmunitaria y (b) un dominio de escape fagolisosómico. El dominio capaz de provocar una respuesta inmunitaria es preferiblemente un péptido o polipéptido inmunogénico de un patógeno o un fragmento inmunogénico del mismo. En una realización adicional, la vacuna es una vacuna de subunidad, es decir, una vacuna que comprende un antígeno purificado de un patógeno o un fragmento inmunogénico del mismo, particularmente un antígeno recombinante o un fragmento inmunogénico del mismo. En una realización adicional más, la vacuna es una vacuna basada en una célula patogénica completa o fracción celular inactivada.

20 La célula de *Mycobacterium* es preferiblemente una célula de *M. bovis*, una célula de *M. tuberculosis*, particularmente una célula de *M. tuberculosis* atenuada u otra micobacteria, por ejemplo, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* o *M. fortuitum*. Más preferiblemente, la célula es una célula de *M. bovis* (BCG) recombinante, particularmente una célula de *M. bovis* recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga (43). En una realización especialmente preferida, la vacuna es una célula de *Mycobacterium* deficiente en ureasa recombinante. En una realización especialmente preferida, la secuencia ureC de la célula de *Mycobacterium* está inactivada (Δ UreC), por ejemplo, mediante la construcción de un vector de suicidio que contiene un gen ureC alterado por un gen marcador de selección, transformación de la célula diana con el vector y detección de células positivas al marcador de selección que tienen un fenotipo negativo a ureasa. Más preferiblemente, la célula es BCG recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga caracterizada como rBCG Δ UreC :: Hly⁺:: Hyg^r.

25 El dominio capaz de provocar una respuesta inmunitaria se selecciona preferiblemente de péptidos o polipéptidos inmunogénicos de *M. bovis* o *M. tuberculosis* o de fragmentos inmunogénicos de los mismos que tienen una longitud de al menos 6, preferiblemente al menos 8 aminoácidos, más preferiblemente al menos 9 aminoácidos y, por ejemplo, hasta 20 aminoácidos. Ejemplos específicos para antígenos adecuados son Ag85B (p30) de *M. tuberculosis*, Ag85B (α -antígeno) de BCG de *M. bovis*, Ag85A de *M. tuberculosis* y ESAT-6 de *M. tuberculosis* y fragmentos de los mismos.

30 La vacuna es preferiblemente una vacuna contra infecciones micobacterianas, particularmente infecciones micobacterianas pulmonares, más particularmente tuberculosis.

35 De acuerdo con el método de la invención, se determina la respuesta inmunitaria Th17 en un sujeto vacunado. El sujeto es preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un ser humano. La determinación se realiza preferiblemente en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, donde dicha muestra comprende células inmunitarias, particularmente células T y/o células NK, más particularmente células T específicas de antígeno tales como células T CD4. La muestra puede ser un fluido corporal o muestra tisular, por ejemplo, una muestra de sangre, suero o plasma o una muestra de pulmón o bazo. Los métodos para recoger muestras son bien conocidos en la técnica.

40 El método de la presente invención requiere una determinación de la respuesta inmunitaria Th17. Para este fin, se prefiere re-estimular las células inmunitarias presentes en la muestra en el sujeto a analizar con un inmunógeno y determinar la expresión de citoquinas a partir de dichas células. Las células a analizar son preferiblemente células T específicas de antígeno, más preferiblemente células T CD4. El inmunógeno para la re-estimulación corresponde al inmunógeno presente en la vacuna (cuya eficacia tiene que determinarse). El inmunógeno puede estar presente en una forma idéntica a la forma presente en la vacuna o en una forma diferente. Por ejemplo, cuando la vacuna comprende un polipéptido inmunogénico, el inmunógeno en la etapa de re-estimulación puede comprender un fragmento inmunogénico del mismo o viceversa. Preferiblemente, el inmunógeno usado para la etapa de re-estimulación es un polipéptido o péptido purificado. Para ensayar la eficacia de vacunas contra la tuberculosis, particularmente una vacuna viva contra la tuberculosis como se ha descrito anteriormente, el inmunógeno puede ser ventajosamente un antígeno micobacteriano, por ejemplo, seleccionado del "Derivado de Proteína Purificada" PPD, que es un extracto con glicerol de micobacterias o Ag85A y Ag85B, así como otros antígenos micobacterianos y fragmentos inmunogénicos de los mismos (tal como se ha descrito anteriormente).

45 La determinación de la respuesta Th17 de acuerdo con la invención puede comprender la determinación de células asociadas con la respuesta Th17, por ejemplo, células productoras de IL-17, mediante marcadores de superficie y citoquinas presentes en y/o secretadas por dichas células. Ejemplos de marcadores de superficie son CD4, CD8, IL-23R, CCR4 y/o CCR6. Ejemplos de citoquinas presentes en y/o secretadas por dichas células son IL-17, IL-21, IL-22,

IL-23, IFN- γ y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la citoquina es IL-17. Dichas células pueden determinarse por métodos citológicos, por ejemplo, por técnicas de clasificación celular usando reactivos de detección inmunológica tales como anticuerpos específicos para marcadores de superficie celular y/o citoquinas, que pueden portar un grupo de marcaje, por ejemplo, un grupo de fluorescencia.

5 Más preferiblemente, las células asociadas con una respuesta inmunitaria Th17 son, por ejemplo, células T CD4 que producen y opcionalmente secretan IL-17.

10 En una realización adicional, la determinación de la respuesta inmunitaria Th17 comprende determinar una citoquina secretada a partir de células asociadas con la respuesta inmunitaria Th17, por ejemplo, IL-17. La citoquina puede determinarse por métodos inmunológicos usando anticuerpos apropiados, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra IL-17.

15 En el método de la invención, la respuesta inmunitaria Th17 se determina en un momento adecuado después de la vacunación. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede determinarse 20-50 días, particularmente 25-35 días después de la vacunación.

20 La invención también se refiere a un kit de reactivos para determinar la eficacia de una vacuna, particularmente para su uso en un método como se ha descrito anteriormente. El kit de reactivos comprende un inmunógeno adecuado para re-estimular células inmunitarias presentes en una muestra de un sujeto que se ha vacunado. Adicionalmente, el kit de reactivos comprende al menos un reactivo adecuado para detectar un marcador de respuesta inmunitaria Th17, como se ha descrito anteriormente. Los reactivos pueden seleccionarse, por ejemplo, de reactivos citológicos y/o inmunológicos de detección, por ejemplo, anticuerpos contra marcadores celulares característicos de células asociadas a respuesta inmunitaria Th17 y/o un reactivo inmunológico específico para citoquinas asociadas con una respuesta inmunitaria Th17, particularmente IL-17 y/o IL-22. Las regiones de detección pueden portar grupos detectables, por ejemplo, grupos de marcaje por fluorescencia.

Además, la invención se describe en más detalle por las siguientes Figuras y **Ejemplos**.

30 Leyendas de las figuras

Figura 1: Carga de MTB en ratones WT. La inmunización s.c. protege contra infección con MTB 90 días p.i. (A). La carga bacteriana es comparable entre grupos vacunados y no vacunados el día 7 p.i. (B). Determinación de CFU en pulmón y bazo después de infección por aerosol con 400 CFU de MTB. Se homogeneizó el lóbulo pulmonar cardiaco (aprox. $71/10^9$ del órgano completo) o la mitad de un bazo; el material restante se usó para ensayos de re-estimulación *in vitro*. Se determinó la significación estadística por ensayo de Mann-Whitney con valores P bilaterales. *, P < 0,05; **, P < 0,01. Los datos son representativos de tres experimentos con resultados similares.

40 **Figura 2: Inducción superior de citoquinas después de vacunación con rBCG sobre pBCG.** Respuestas en pulmón (A) y bazo (B) 83 días después de vacunación s.c. con rBCG o pBCG. Se re-estimuló un total de $2,5 \times 10^5$ (pulmón) o 2×10^6 (bazo) células con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes por ensayos combinados. Las concentraciones de citoquinas se representan como medias \pm ETM de cuatro experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se restó la producción de fondo de citoquinas de los controles de medio. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, P < 0,05; **, P < 0,01.

50 **Figura 3: La vacunación con rBCG acelera el reclutamiento de células T específicas de antígeno al pulmón tras infección por aerosol con MTB.** Secreción de citoquinas por células pulmonares 7 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Se estimuló un total de 2×10^5 células con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes por ensayo combinado (A). Las concentraciones de citoquinas se representan como la media \pm ETM de dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se restó la producción de fondo de citoquinas de los controles de medio. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor (B). Se representan las frecuencias de células T CD4 respondedoras como medias \pm ETM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

60 **Figura 4: La vacunación con rBCG aumenta las respuestas específicas de PPD en bazo tras infección por aerosol con MTB.** Secreción de citoquinas por células de bazo 7 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Se re-estimuló un total de 2×10^6 células con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes por ensayos combinados (A). Las concentraciones de citoquinas se representan como medias \pm ETM de cuatro experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se restó la producción de fondo de citoquinas de los controles de medio. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor (B). Se representan las frecuencias de células T CD4 respondedoras como medias \pm ETM de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó

ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Figura 5: La vacunación con pBCG o rBCG no conduce a cambios significativos en poblaciones de células Treg. Células Treg en el bazo después de inmunización s.c. con rBCG o pBCG. Las barras negras representan células CD25⁺FoxP3⁺ y las barras blancas células CD25⁻FoxP3⁺. Frecuencias de células T CD4 y células Treg CD8 83 días después de inmunización (A y B) así como 7 días (C y D) o 90 días (E y F) después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Tres ratones por grupo, representado como media \pm ETM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

Figura 6: Frecuencias de células T CD8 productoras de citoquinas en el pulmón después de vacunación y posterior infección por aerosol con MTB. Secreción de citoquinas 7 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor. Las frecuencias de células T CD8 respondedoras se representan como medias \pm ETM de dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico.

Figura 7: Frecuencias de células T CD8 productoras de citoquinas en bazo después de vacunación y posterior infección por aerosol con MTB. Secreción de citoquinas 7 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor. Las frecuencias de células T CD8 respondedoras se representan como medias \pm ETM de cuatro experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Figura 8: Respuestas inmunitarias en pulmón durante infección persistente por MTB en ratones vacunados con rBCG. Secreción de citoquinas por células pulmonares 90 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Las células se re-estimularon con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes con ensayos combinados (A). Las concentraciones de citoquinas se representan como medias \pm ETM de dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se restó la producción de fondo de citoquinas de los controles de medio. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor (B). Las frecuencias de células T CD4 respondedoras se representan como medias \pm ETM de dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Figura 9: Frecuencias de células T CD8 productoras de citoquinas después de vacunación y posterior infección por aerosol con MTB. Secreción de citoquinas por células aisladas del pulmón 90 días después de infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Se analizaron células re-estimuladas con PPD durante 6 horas en presencia de Brefeldina A por citometría de flujo multicolor. Las frecuencias de células T CD8 respondedoras se representan como medias \pm ETM de dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, $P < 0,05$.

Figura 10: La vacunación induce producción de IL22 pero no de IL21. Secreción de IL21 (A) e IL22 (B) por células de bazos (2×10^6 células) o pulmones (2×10^5 células) de ratones 83 días después de vacunación y posterior infección por aerosol con 200-400 CFU de MTB. Concentraciones de IL21 medidas a partir de tres muestras por grupo, media \pm ETM representada. Para IL22 se combinaron muestras de un grupo. Los datos son representativos de dos (días 83 post-vacunación) y cinco (día 7 p.i.) experimentos similares. Las células se re-estimularon con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes por ELISA.

Figura 11: rBCG causa reclutamiento aumentado de células T $\gamma\delta$ y células NK sin alterar significativamente las poblaciones de APC. Células reclutadas en la cavidad peritoneal tras administración de 10^6 CFU de rBCG o pBCG i.p. Análisis de poblaciones celulares en fluido de lavado peritoneal por citometría de flujo. APC reclutadas en el peritoneo 5 horas (panel superior) y 6 días (inferior) después de administración i.p. de rBCG o pBCG (A). ICS de poblaciones de células T 5 horas después de inyección (B). Las células se estimularon con anticuerpos α CD3/ α CD28 durante 18 horas en presencia de Brefeldina A. ICS de poblaciones de células T 6 días después de administración (C). Las células se re-estimularon con PPD durante 18 horas en presencia de Brefeldina A. Los datos se presentan como el resumen de tres experimentos independientes con cinco ratones por grupo. La línea horizontal indica la media. Se aplicó ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. Las citoquinas y quimioquinas detectadas en fluido de lavado peritoneal se analizaron por ensayo combinado (D) representadas como concentraciones medias \pm ETM.

Figura 12: rBCG induce IL17 en PBMC humanas de voluntarios sanos de un ensayo clínico en fase I. Producción de IL17 por PBMC humanas aisladas de voluntarios humanos sanos de un estudio clínico en fase I. Se re-estimuló un total de 5×10^5 células aisladas 29 días post-vacunación con rBCG o pBCG, con PPD durante 20 horas y se analizaron los sobrenadantes por ensayo combinado. La significación estadística se determinó por ensayo de Mann-Whitney con valor P unilateral y corrección de Welch. *, $P < 0,05$; n=3 para pBCG y n=7 para rBCG.

Ejemplo**Materiales y métodos**

5

Ratones

Se criaron ratones BALB/c hembra en el Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) en Berlín. Los ratones eran de 6-8 semanas de edad al inicio de los experimentos y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Los experimentos en animales se realizaron con la aprobación del Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo, Berlín, Alemania).

10

Bacterias

El MTB H37Rv y las cepas pBCG y rBCG usadas se describieron previamente (12). Las bacterias se cultivaron en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol, Tween 80 al 0,05 % y ADC. Se recogieron cultivos semi-logarítmicos y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Todas las reservas se titularon antes de su uso. Se obtuvieron suspensiones bacterianas de células individuales por transferencia repetida a través de una jeringa con una aguja 27G.

20

Vacunación e infección por MTB

Se administraron pBCG o rBCG (10^6 CFU) por vía subcutánea (s.c.) en cercana proximidad a la base de la cola. Se realizó infección aerogénica de ratones con MTB usando un sistema de exposición por inhalación Glas-Col. Las cargas bacterianas se evaluaron por alteración mecánica de órganos retirados de forma aséptica en PBS con Tween 80 al 0,05 % v/v y siembra de diluciones en serie en placas de agar Middlebrook 7H11 1 suplementadas con OADC. Después de 3 semanas, se contaron las colonias MTB. La significación estadística de los resultados se determinó por ensayo de Mann-Whitney con valores P bilaterales para datos no paramétricos usando GraphPad Prism 5.0.

25

Aislamiento de células, estimulaciones y citometría de flujo

Las células se purificaron como se ha descrito previamente (42). Los grupos experimentales comprendían cinco ratones. Se combinaron dos bazos o pulmones y se procesó una muestra individualmente, produciendo tres muestras por grupo de cinco ratones para posteriores estimulaciones. Las células se estimularon con 50 µg/ml de PPD (SSI, Copenhague, Dinamarca) durante 20 horas para análisis de citoquinas por ensayo combinado o durante 6 horas en presencia de 25 µg/ml de Brefeldina A para tinción de citoquinas intracelulares (ICS). Se usaron los siguientes anticuerpos: CD4 (RM4-5), IFN γ (XMG-1.2), IL2 (JES6-5H4), Ly6G/C (RB6-8C5), CD11b (M1/70), $\gamma\delta$ -TCR (GL-3), conjunto de tinción FoxP3 y CD49b (clon DX5) todos de eBioscience. CD8 α (YTS169), TNF- α (XT22), CD16/CD32 (2.4G2), F4/80 (Cl:A3-1) y CD11 c (N418) se purificaron de sobrenadantes de hibridoma y se marcaron de forma fluorescente en el propio laboratorio. IL-17 (TC11-18H10) se obtuvo de BD Biosciences. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCanto II o LSR II y el software FACSDiva (BD Biosciences). Las citoquinas se midieron usando los inmunoensayos basados en perlas Bio-Plex de Th1/Th2 de ratón, IL17 e IL6 de Bio-Rad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midieron IL21 e IL22 por ELISA de R&D systems. Se detectó IL17 humana con un ensayo Milliplex de 42 combinaciones de Millipore.

35

40

45

Lavado peritoneal

Se prepararon de forma reciente pBCG o rBCG de cultivos semi-logarítmicos. Las bacterias se lavaron tres veces con PBS y se determinó la concentración midiendo la densidad óptica a 580 nm. La administración de 10^6 CFU se realizó por vía intraperitoneal. Se obtuvieron células reclutadas de la cavidad peritoneal 5 horas o 6 días después por inyección de 5 ml de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Las citoquinas y quimioquinas en el fluido de lavado se determinaron usando el kit Bio-Plex de citoquinas de ratón de 23 combinaciones de Bio-Rad.

50

Resultados

55

Respuestas Th1/Th17 después de vacunación con rBCG y pBCG

En un intento por dilucidar los mecanismos inmunitarios relevantes para la eficacia de vacuna contra TB, se compararon las respuestas inmunitarias contra rBCG y pBCG en ratones. Se había determinado originalmente una eficacia superior de protección de rBCG después de inmunización i.v. (12). Aquí se demuestra que la administración s.c. de rBCG inducía niveles comparables de protección y retenía su eficacia superior sobre pBCG (Figura 1A). A continuación, se analizaron respuestas de memoria a largo plazo en pulmones y bazos de ratones 83 días después de vacunación s.c. con rBCG o pBCG. Las células se re-estimularon con PPD y se analizaron los sobrenadantes por ensayos combinados para citoquinas. La inmunización con rBCG indujo producción significativamente mayor de citoquinas por células aisladas del pulmón en comparación con pBCG (Figura 2A). Estas incluían IFN γ , IL2, IL6, y GM-CSF. En contraste, las citoquinas de tipo 2 IL4, IL5, e IL10 no estaban aumentadas por encima de los niveles de

60

65

fondo (datos no mostrados). Curiosamente, se produjeron concentraciones aproximadamente 3 veces mayores de IL17 por células pulmonares de ratones vacunados con rBCG. Obsérvese que pudieron aislarse solamente unas pocas células de los pulmones de ratones no infectados. Por consiguiente, las concentraciones globales de citoquinas fueron inferiores que en bazo donde podían usarse densidades celulares 10 veces mayores por pocillo para la estimulación (Figura 2B). En los bazos, ambas vacunas provocaron respuestas Th1 igual de fuertes como se refleja por las concentraciones comparables de IL2, IL6, IFN γ y GM-CSF. Además, las células del bazo de ratones vacunados con rBCG produjeron significativamente más IL17 tras re-estimulación con PPD en comparación con animales vacunados con pBCG. Por tanto, la inmunización con rBCG, pero no con pBCG, inducía respuestas Th1 y Th17 concomitantes y fuertes en pulmones y bazos, que estaban sostenidas durante periodos prolongados de tiempo.

Reclutamiento acelerado de células T específicas de MTB tras infección con MTB virulento en ratones vacunados con rBCG

Las células TH17 se han vinculado a la vigilancia inmunitaria mejorada (13). Se compararon respuestas de células T específicas de antígeno en animales vacunados tras infección por aerosol con MTB virulento, en pulmones y bazos 7 días post-infección. Se detectó producción marcada de IFN γ , IL17, IL2 y GM-CSF por células pulmonares de ratones vacunados con rBCG 20 horas después de la re-estimulación con PPD (Figura 3A) o péptidos Ag85A (datos no mostrados). En contraste, estas citoquinas se secretaban escasamente por células de ratones vacunados con pBCG. En animales no vacunados infectados con MTB, la producción de citoquinas estuvo por debajo del límite de detección, de acuerdo con los informes previos de que las células T específicas de MTB no aparecen antes de 3 semanas después de infección con MTB (13). Las citoquinas de tipo 2 IL4, IL5 e IL10 no se detectaron y TNF α , IL12p70 e IL6 estuvieron solamente en niveles escasamente por encima de los de fondo en este punto temporal prematuro posterior a exposición a MTB (datos no mostrados).

Se determinó la producción de citoquinas por células T pulmonares por citometría de flujo 7 días después de infección con MTB (Figura 3B). Las células se estimularon con PPD durante 6 horas seguido por tinción de citoquinas intracelulares para IL2, IL17, IFN γ y TNF α . En controles no vacunados, una pequeña proporción de células T CD4 produjo IL2, TNF α o IFN γ . En ratones vacunados, las células T CD4 secretaban IL2, IFN γ , TNF α y también IL17. Las frecuencias de células productoras de una citoquina fueron las más altas, aunque no significativas, en el grupo de rBCG. En animales vacunados se detectaron células T multifuncionales implicadas en inmunidad protectora (14). Las células T productoras de múltiples citoquinas fueron predominantemente productoras dobles IL2⁺TNF α ⁺ y aumentaron significativamente tras vacunación con rBCG. Las células productoras triples fueron casi exclusivamente IL2⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺ y estaban ligeramente aumentadas en ratones vacunados con rBCG en comparación con ratones vacunados con pBCG. Además, las células positivas cuádruples IL2⁺TNF α ⁺IFN γ ⁺IL17⁺ aparecían exclusivamente en el grupo de rBCG aunque a frecuencias muy bajas.

En principio, las células T esplénicas produjeron patrones de citoquinas similares a los de células T pulmonares (Figura 4). La producción de IL2 y GM-CSF fue significativamente mayor en los animales vacunados con rBCG en comparación con el grupo de pBCG y por debajo del nivel de detección en controles no vacunados, aunque en controles no vacunados, un pequeño porcentaje de células T CD4 produjo IFN γ . En resumen, la vacunación con pBCG o rBCG inducía células T CD4 que secretaban IFN γ y TNF α con frecuencias mayores de productores individuales y múltiples en ratones vacunados con rBCG en comparación con el grupo de pBCG.

A los 7 días p.i., las células T CD4 eran las principales productoras de citoquinas; se detectaron productores de citoquinas CD8 con frecuencias inferiores en el pulmón (Figura 6) y el bazo (Figura 7) aunque con patrones similares. Es de observar que se detectaron frecuencias significativamente mayores de células T CD8 productoras individuales de TNF α en el grupo de rBCG.

La producción diferencial de citoquinas y las frecuencias de células productoras no se debían a diferentes cargas bacterianas en este punto temporal prematuro después de infección, como se confirmó por las cantidades comprobables de unidades formadoras de colonias (CFU) en pulmones y bazos (Figura 1B). Las cantidades totales de células Treg aumentaron tras infección hasta un grado comprobable en los dos grupos vacunados (Figura 5).

La vacunación con rBCG confiere potentes respuestas inmunitarias durante infección persistente

Se analizaron las respuestas inmunitarias específicas de MTB 90 días p.i. cuando las cargas bacterianas pulmonares eran aproximadamente 10 veces inferiores en animales inmunizados con rBCG en comparación con el grupo de pBCG y 100 veces inferiores en comparación con el grupo de control no vacunado. Las células de pulmones de ratones vacunados y controles no tratados se re-estimularon con PPD durante 20 horas y se midieron las concentraciones de citoquinas por ensayos combinados (Figura 8A). Las citoquinas detectadas tras re-estimulación eran predominantemente de tipo 1. Sin embargo, no pudieron detectarse diferencias en IFN γ o IL17 entre los grupos vacunados durante infección persistente. En contraste, las cantidades de IL2, IL6, GM-CSF y TNF α fueron mayores en ratones vacunados con rBCG. En todos los grupos, IL4 e IL5 estuvieron por debajo del límite de detección y se midió algo de IL12p70 e IL10 (datos no mostrados). Adicionalmente, el análisis de células pulmonares por citometría de flujo multicolor reveló predominantemente células T CD4 productoras de citoquinas durante

infección persistente (Figura 8B). Se detectaron células T CD4 que secretaban solamente IFN γ en todos los grupos con frecuencias similares. Tras vacunación, también pudieron detectarse células T CD4 productoras de IL2, IFN γ , TNF α e IL17 en diferentes combinaciones. Curiosamente, las frecuencias de células T CD4 respondedoras no diferían significativamente entre vacunación con rBCG y pBCG a pesar de las mayores concentraciones de IL2 y TNF α en los sobrenadantes. Se asume que ambas vacunas aumentaban las frecuencias de células T CD4 específicas de antígeno en el pulmón durante infección con MTB persistente llegando a ser las células T inducidas por rBCG productores más potentes de citoquinas. Las células T CD8 secretaban casi exclusivamente IFN γ con frecuencias comparables en todos los grupos mientras que se detectaron significativamente más células T CD8 productoras de solamente TNF α en el grupo de rBCG. Aparecían células T CD8 multifuncionales escasamente por encima del fondo (Figura 9).

La vacunación causa producción de IL22 pero no de IL21

Las células Th17 pueden producir citoquinas efectoras adicionales tales como IL21 (15) e IL22 (16). Se han identificado células productoras de IL22 en pacientes con TB, pero éstas parecen distintas de las células productoras de IL17 (17). No se detectó IL21 después de estimulación con PPD de células de bazo o pulmonares de ratones vacunados y posteriormente infectados con MTB (Figura 10A). Se produjo IL22 a concentraciones elevadas por esplenocitos estimulados con PPD durante 20 horas (Figura 10B) en ratones inmunizados con rBCG pero no aumentaron adicionalmente poco después de infección con MTB. La producción de IL22 por células pulmonares se observó solamente en el grupo vacunado con rBCG y disminuyó después de infección con MTB en aerosol.

rBCG intraperitoneal causa reclutamiento aumentado de células T $\gamma\delta$ y células NK sin alterar significativamente las poblaciones de APC

Se deseaba definir los mecanismos subyacentes a la inducción de células Th17 preferentes después de inmunización con rBCG. Para este fin, se administraron i.p. rBCG y pBCG, se aislaron las células inmigrantes de la cavidad peritoneal 5 horas y 6 días después de la administración y se analizaron por citometría de flujo (Figura 11A). Los neutrófilos (definidos como Gr1^{HI}, CD11b^{HI}, MHCII⁻, CD11c⁻) entraron rápidamente en la cavidad peritoneal y permanecieron elevados en el día 6 p.i. en los grupos de pBCG y rBCG al mismo grado. Las frecuencias de macrófagos peritoneales residentes (definidos como CD11b^{HI}, F4/80^{HI}, Gr1⁻, MHCII^{HI}, CD11c⁻) y células dendríticas (CD11c⁺, CD11b^{LO}, Gr1⁻) permanecieron inalteradas a bajos porcentajes. En resumen, no fueron detectables diferencias significativas entre los grupos de rBCG y pBCG. Las células peritoneales recogidas 5 horas después de vacunación se sometieron a estimulación policlonal (Figura 11B) con anticuerpos α CD3/ α CD28. Las frecuencias de células T CD4 y células NK fueron comparables entre todos los grupos como la producción de IFN γ e IL17. Seis días después de la administración, estas células aumentaron numéricamente y alcanzaron las mayores frecuencias en el grupo de rBCG (Figura 11C). Se usó PPD para la re-estimulación de células en el punto temporal de 6 días. Las células T CD4 no produjeron cantidades apreciables de IFN γ o IL17, aunque una proporción sustancial de células NK produjo IFN γ después de administración de rBCG. Las células T $\gamma\delta$ se han identificado como una fuente principal de IL17 prematura en TB (18). Se identificaron proporciones aumentadas, aunque no significativas, de células T $\gamma\delta$ que producen IFN γ 5 horas post-inyección con rBCG. Esta población celular aumentaba adicionalmente y se detectaron frecuencias marcadamente mayores de células T $\gamma\delta$ que producen IL17 en grupo el de rBCG 6 días después de la inyección. No se detectaron células T CD8 en el peritoneo en ninguno de los grupos. Se analizaron las citoquinas y quimioquinas presentes en la cavidad peritoneal por ensayo combinado de fluido de lavado peritoneal (Figura 11D). Aumentaron rápidamente MCP-1, MIP1 α , G-CSF y KC tras inyección; los niveles de Eotaxina permanecieron inalterados y se detectó IL12p40 en concentraciones mayores después de 6 días. Las concentraciones de IL12p70, IFN γ , IL1 α , IL2, IL3, IL4, IL5, IL10, IL17, GM-CSF, y TNF α estuvieron por debajo del límite de detección mientras que IL1 β , IL6, IL9, IL13, MIP1 β y RANTES pudieron medirse, pero la producción fue comparable entre rBCG y pBCG. Por tanto, rBCG y pBCG inducían reclutamiento de APC así como producción de quimioquinas y citoquinas en el sitio de administración a un grado similar. Curiosamente, las proporciones de células T $\gamma\delta$ que secretan IL17 y células NK que producen IFN γ fueron las más abundantes después de administración de rBCG.

La vacunación con rBCG genera células productoras de IL17 en seres humanos

Por último, se analizaron las PBMC de voluntarios humanos sanos de un ensayo clínico en fase I para cuestionar si la producción de IL17 estaba aumentada en participantes del estudio vacunados con rBCG. Se obtuvo sangre de los voluntarios 29 días después de inmunización con rBCG o pBCG y se aislaron las PBMC y se congelaron. Las PBMC se descongelaron y dejaron en reposo durante la noche, seguido por re-estimulación de 20 horas con PPD. Se analizó la producción de citoquinas por ensayos combinados. La producción de IL17 se detectó exclusivamente en PBMC de participantes del estudio inmunizados con rBCG (Figura 12). Obsérvese que estaba disponible una cantidad limitada de muestras.

Análisis

La identificación de marcadores inmológicos de protección es crucial para el diseño racional de vacunas novedosas contra TB. Estos marcadores también podrían establecer la base para la definición de marcadores sustitutos para

predecir criterios de valoración de resultado clínico en ensayos de eficacia de vacuna contra TB y por tanto proporcionar directrices para la mejora de candidatos actuales de vacuna. La importancia de las citoquinas clave que activan las capacidades antimicrobianas de los macrófagos incluyendo IFN γ (21) y TNF α (22), y la necesidad de IL2 en la expansión de células de memoria (23) está bien establecida y por tanto se usa habitualmente para controlar los ensayos de vacuna contra TB.

En un intento por identificar biomarcadores de eficacia de vacuna, se compararon las respuestas inmunitarias de memoria a largo plazo provocadas por rBCG que demostraron conferir protección superior sobre su cepa precursora, pBCG. Las respuestas diferían en términos tanto cuantitativos como cualitativos. Se detectó abundancia aumentada de citoquinas de tipo 1 así como IL17 después de vacunación con rBCG en el pulmón (Figura 2A). El análisis de respuestas inmunitarias inducidas por vacuna en pulmón obviamente no es factible en el contexto de ensayos clínicos. Por lo tanto, también se analizaron las respuestas de memoria sistémica a largo plazo (Figura 2B). Curiosamente, se detectaron concentraciones comparables de citoquinas que dirigen el tipo 1 en los grupos de pBCG y rBCG. En contraste, la producción de IL17 por esplenocitos estuvo significativamente elevada tras vacunación con rBCG. Por tanto, se concluyó que IL17, en lugar de IFN γ o IL2 reúne los requisitos de un marcador de protección superior inducida por rBCG.

Las células Th17 contribuyen a la defensa antimicrobiana atrayendo y activando neutrófilos (24) que están entre las primeras células a reclutarse en respuesta a IL17. Se ha demostrado que IL17 es dispensable durante infección primaria por MTB (25,26), pero gana importancia en las respuestas de memoria (13). Además, los recientes informes sobre la expresión de CCR6 en células Th17 humanas (27, 28) apuntan hacia un bucle de retroalimentación positiva, porque CCR6 es el receptor para CCL20 producido por neutrófilos (29) y CCL20-CCR6 se ha implicado en la inmunopatogénesis de TB (30). Por tanto, las células Th17 podrían facilitar el reclutamiento acelerado de células T de memoria específicas de antígeno a los sitios de residencia bacteriana. Analizando las respuestas inmunitarias inducidas por vacuna 7 días después de infección por aerosol con MTB, se demuestra que la vacunación con rBCG de hecho conduce a reclutamiento acelerado de células efectoras a los sitios de replicación bacteriana. Se observaron frecuencias aumentadas de células T CD4 específicas de antígeno y producción elevada de IL2, IL17, IFN γ y GM-CSF por células de pulmón (Figura 3) y bazo (Figura 4).

Las células T CD4 multifuncionales que co-producen IL2, IFN γ y TNF α se implicaron por primera vez en estrategias de vacunación satisfactoria contra *Leishmania major* (14) y posteriormente también contra MTB (31). Recientemente, estas células T CD4 polifuncionales también se detectaron en ensayos clínicos de vacuna contra TB (32, 33). Se detectaron células T CD4 polifuncionales tras vacunación con rBCG y pBCG y posterior infección (Figuras 3 y 4); sin embargo, la composición de citoquinas (IL2, IL17, IFN γ y TNF α) en productores dobles y triples varió considerablemente entre experimentos así como entre animales individuales. Si las células multifuncionales fueran un correlato verdadero de protección, entonces sus frecuencias globales, que eran mayores en el grupo de rBCG, en lugar de su composición, parecen más relevantes.

¿Por qué rBCG inducía una respuesta Th17? La inmunización con rBCG y pBCG causaba reclutamiento de APC así como de productores de quimioquinas y citoquinas a un grado similar. Curiosamente, las proporciones de células T $\gamma\delta$ que secretan IL17 y células NK que producen IFN γ eran altamente abundantes después de vacunación con rBCG. Esto es coherente con los informes que demuestran que IL17 puede producirse rápidamente por células T $\gamma\delta$ (34, 18) así como células T NK (35). Las células NK, que también estaban aumentadas tras vacunación con rBCG, son una fuente importante de IFN γ prematuro. Ya se ha demostrado que diferentes componentes moleculares liberados de rBCG residen en el citosol de macrófagos infectados (12). Nod-2 es un PRR citosólico importante y su participación se ha vinculado al desarrollo de respuestas de células T de memoria Th17 (19).

La apoptosis inducida durante infección bacteriana induce células Th17 (36). Se han obtenido evidencias de que rBCG induce apoptosis aumentada en comparación con pBCG (12), que podría contribuir adicionalmente al desarrollo aumentado de células Th17. La activación de inflammasomas podría también contribuir a las respuestas de memoria Th17 mediante la producción de IL1 β (37). Se ha descubierto que NLRP3, por ejemplo, detecta la presencia de listeriolisina a través de cambios en los niveles de ATP (38). Por tanto, la inducción de células Th17 tras vacunación con rBCG podría requerir una interacción compleja de estímulos intracelulares y apoptosis aumentada.

Las células Th17 se consideran instrumentales en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias tales como artritis inducida por colágeno (39), EAE (40, 39) e hipersensibilidad alérgica de las vías respiratorias (41, 39) en lugar de ser beneficiosas para una vacunación satisfactoria. Este papel patogénico habitualmente está asociado con el desarrollo de una respuesta inflamatoria mediada por IL21 profunda. Nunca se detectó IL21 después de vacunación y posterior infección con MTB por encima de los niveles de fondo en ningún experimento (Figura 10A). Además, nunca se observaron signos de autoinmunidad o inflamación excesiva en el sitio de inyección tras vacunación con rBCG ni en el pulmón hasta 200 días post-infección con MTB.

En un primer intento por comparar los datos de TB experimental en ratones con datos humanos, se analizaron los perfiles de citoquinas de PBMC congeladas de un ensayo clínico en fase I con rBCG y pBCG. En una cantidad limitada de muestras se detectó producción de IL17 después de vacunación con rBCG, pero no con pBCG. Se han

detectado células Th17 en sangre periférica de seres humanos infectados con MTB (17). Recientemente, se ha informado de células T CD4 productoras de IL17 en adolescentes vacunados con un candidato de vacuna contra TB compuesto de virus vaccinia modificado Ankara que expresa Ag85A (33). Las respuestas alcanzaron el máximo entre los días 7 y 28 post-vacunación y disminuyeron después de ello. Esto está en línea con nuestros datos que muestran producción elevada de IL17 en el día 29 post-vacunación en el grupo de rBCG (Figura 12). Por tanto, es tentador proponer IL17 como correlato de protección en ensayos de vacuna contra TB.

En resumen, se ha demostrado que la vacunación con rBCG conduce a generación preferente de células Th17, probablemente dependiente del reconocimiento intracelular de componentes bacterianos por Nod-2. Estas células Th17 a su vez aceleran el reclutamiento de células T específicas de antígeno al pulmón. Finalmente, esta cascada de eventos provoca contención prematura de MTB y, por tanto, protección superior por rBCG en comparación con pBCG. Se detectó producción de IL17 exclusivamente por PBMC de voluntarios vacunados con rBCG en un ensayo clínico en fase I completado de forma satisfactoria. Como IL17 parece instrumental para el reclutamiento acelerado de células T específicas de antígeno a los sitios de replicación de MTB, las futuras vacunas contra TB deberían estar adaptadas a inducir de forma concomitante respuestas Th1 y Th17 equilibradas.

Lista de referencias

1. Hoja informativa de tuberculosis n.º 104 marzo. OMS. 2010.
2. Calmette A. Sur la vaccination preventive des enfants nouveau-nés contre tuberculose par le BCG. *Ann Inst Pasteur.* 1929;41201-232.
3. Reece ST, Kaufmann S. H. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int J Med Microbiol.* 2008;298(1-2):143-150.
4. Trunz BB, Fine P., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.* 2006;367(9517):1173-1180.
5. Colditz GA, Brewer T. F., Berkey C. S., Wilson M. E., Burdick E., Fineberg H. V. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994;271 (9):698-702.
6. Skeiky YA, Sadoff J. C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(6):469-476.
7. Kaufmann SH, Baumann S., Nasser Eddine A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10(10):1068-1079.
8. Fletcher HA. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med.* 2007;7(3):319-325.
9. Goldsack L, Kirman J. R. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87(6):465-473.
10. Tchilian EZ, Desel C., Forbes E. K., Bandermann S., Sander C. R., Hill A. V. et al. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing M. tuberculosis antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect Immun.* 2009;77(2):622-631.
11. Pearl JE, Saunders B., Ehlers S., Orme I. M., Cooper A. M. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol.* 2001;211(1):43-50.
12. Grode L, Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Nasser Eddine A. et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2472-2479.
13. Khader SA, Bell G. K., Pearl J. E., Fountain J. J., Rangel-Moreno J., Cilley G. E. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-377.
14. Darrach PA, Patel D. T., De Luca P. M., Lindsay R. W., Davey D. F., Flynn B. J. et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 2007;13(7):843-850.
15. Korn T, Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jager A., Strom T. B. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007;448(7152):484-487.
16. Liang SC, Tan X. Y., Luxenberg D. P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M. et al. Interleukin (IL)-22

- and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279.
- 5 17. Scriba TJ, Kalsdorf B., Abrahams D. A., Isaacs F., Hofmeister J., Black G. et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol.* 2008;180(3):1962-1970.
- 10 18. Lockhart E, Green A. M., Flynn J. L. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2006;177(7):4662-4669.
- 15 19. van Beelen AJ, Zelinkova Z., Taanman-Kueter E. W., Muller F. J., Hommes D. W., Zaat S. A. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 2007;27(4):660-669.
- 20 20. Ferwerda G, Girardin S. E., Kullberg B. J., Le Bourhis L, de Jong D. J., Langenberg D. M. et al. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005;1(3):279-285.
- 25 21. Flynn JL, Chan J., Triebold K. J., Dalton D. K., Stewart T. A., Bloom B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993;178(6):2249-2254.
- 30 22. Flynn JL, Goldstein M. M., Chan J., Triebold K. J., Pfeffer K., Lowenstein C. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-572.
- 35 23. Williams MA, Tyznik A. J., Bevan M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441(7095):890-893.
- 40 24. Happel KI, Dubin P. J., Zheng M., Ghilardi N., Lockhart C., Quinton L. J. et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med.* 2005;202(6):761-769.
- 45 25. Khader SA, Pearl J. E., Sakamoto K., Gilmartin L., Bell G. K., Jolley-Gibbs D. M. et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol.* 2005;175(2):788-795.
- 50 26. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-145.
- 55 27. Singh SP, Zhang H. H., Foley J. F., Hedrick M. N., Farber J. M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* 2008;180(1):214-221.
- 60 28. Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7948-7957.
- 65 29. Scapini P, Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S. et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):1981-1988.
30. Lee JS, Lee J. Y., Son J. W., Oh J. H., Shin D. M., Yuk J. M. et al. Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis. *Scand J Immunol.* 2008;67(1):77-85.
31. Forbes EK, Sander C., Ronan E. O., McShane H., Hill A. V., Beverley P. C. et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol.* 2008;181(7):4955-4964.
32. Abel B, Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D. et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(12):1407-1417.
33. Scriba TJ, Tameris M., Mansoor N., Smit E., van der Merwe L., Isaacs F. et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(1):279-290.
34. Roark CL, Simonian P. L., Fontenot A. P., Born W. K., O'Brien R. L. gamma delta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):353-357.

35. Rachitskaya AV, Hansen A. M., Horai R., Li Z., Villasmil R., Luger D. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol.* 2008;180(8):5167-5171.
- 5 36. Torchinsky MB, Garaude J., Martin A. P., Blander J. M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2009;458(7234):78-82.
37. Meng G, Zhang F., Fuss L. Kitani A., Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity.* 2009;30(6):860-874.
- 10 38. Mariathasan S, Weiss D. S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006;440(7081):228-232.
- 15 39. Nakae S, Nambu A., Sudo K., Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171 (11):6173-6177.
40. Langrish CL, Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J. D. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201 (2):233-240.
- 20 41. Hellings PW, Kasran A., Liu Z., Vandekerckhove P., Wuyts A., Overbergh L. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):42-50.
- 25 42. Kursar M, Koch M., Mittrucker H. W., Nouailles G., Bonhagen K., Kamradt T. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2007; 178(5):2661-2665.
- 30 43. Brosch R, Gordon SV, Gamier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST, *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 de marzo de 2007; 104 (13): 5596-601. Epub 19 de marzo de 2007.
- 35 44. Jay K. Kols Th17 cells in mucosal immunity and tissue inflammation. *Semin Immunopathol.* 2010; 32:1-2
- 40 45. de Cassan S.C., Pathan A.A., Sander C.R., Minassian A., Rowland R., Hill A.V.S., McShane H, Fletcher H.A. Investigating the Induction of Vaccine-Induced Th17 and Regulatory T Cells in Healthy, *Mycobacterium bovis* BCG-Immunized Adults vaccinated with a New Tuberculosis Vaccine, MVA 85A. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(7):1066-1073.
- 45 46. Lin Y., Slight S.R., Khader S.A. Th17 cytokines and Vaccine Induced Immunity. *Semin. Immunopathol.* 2010; 32(1):79-90.
47. Desel C., Dorhoi A., Bandermann S., Grode L., Elsele B., Kaufmann S.H.E. Recombinant BCG Aure C hly + Induces Superior Protection over Parental BCG by stimulating a Balanced Combination of Type 1 and Type 17 Cytokine Responses. *Journal of Infectious Diseases.* 2011; 204(10):1573-1584.
- 50 48. Documento WO 99/10496 (MAX PLANCKGESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) [DE]
49. Documento WO 2004/094469 (MAX PLANCKGESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) [DE]
50. Documento US 61/384.375 (MAX PLANCKGESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) [DE]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar la eficacia de una vacuna viva micobacteriana recombinante, que comprende determinar la respuesta inmunitaria T auxiliar de tipo 17 (Th17) en un sujeto vacunado, en el que una respuesta inmunitaria Th17 detectable es indicativa de inmunidad protectora en dicho sujeto.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la vacuna es una *Mycobacterium* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un dominio capaz de provocar una respuesta inmunitaria y (b) un dominio de escape fagolisosómico.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la *Mycobacterium* es deficiente en ureasa.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la *Mycobacterium* es rBCGΔUreC :: Holy* :: Hyg⁺.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que la vacuna es una vacuna de subunidad.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la vacuna es una vacuna contra infecciones micobacterianas, particularmente infecciones micobacterianas pulmonares, más particularmente tuberculosis.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la determinación de la respuesta inmunitaria Th17 comprende someter a una muestra que comprende células inmunitarias de dicho sujeto vacunado a una re-estimulación con un inmunógeno correspondiente al inmunógeno en dicha vacuna y determinar la presencia y/o la cantidad de células asociadas a respuesta inmunitaria Th17 en dicha muestra.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la determinación de la respuesta inmunitaria Th17 comprende determinar IL17, por ejemplo, por métodos inmunológicos.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la respuesta inmunitaria Th17 se determina 20-50 días después de la vacunación.
- 35 11. Uso de un kit de reactivos en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para determinar la eficacia de una vacuna viva micobacteriana recombinante, que comprende (a) un reactivo para la re-estimulación de células inmunitarias de un sujeto previamente vacunado, y (b) un reactivo para la determinación de una respuesta inmunitaria Th17.

Figura 1

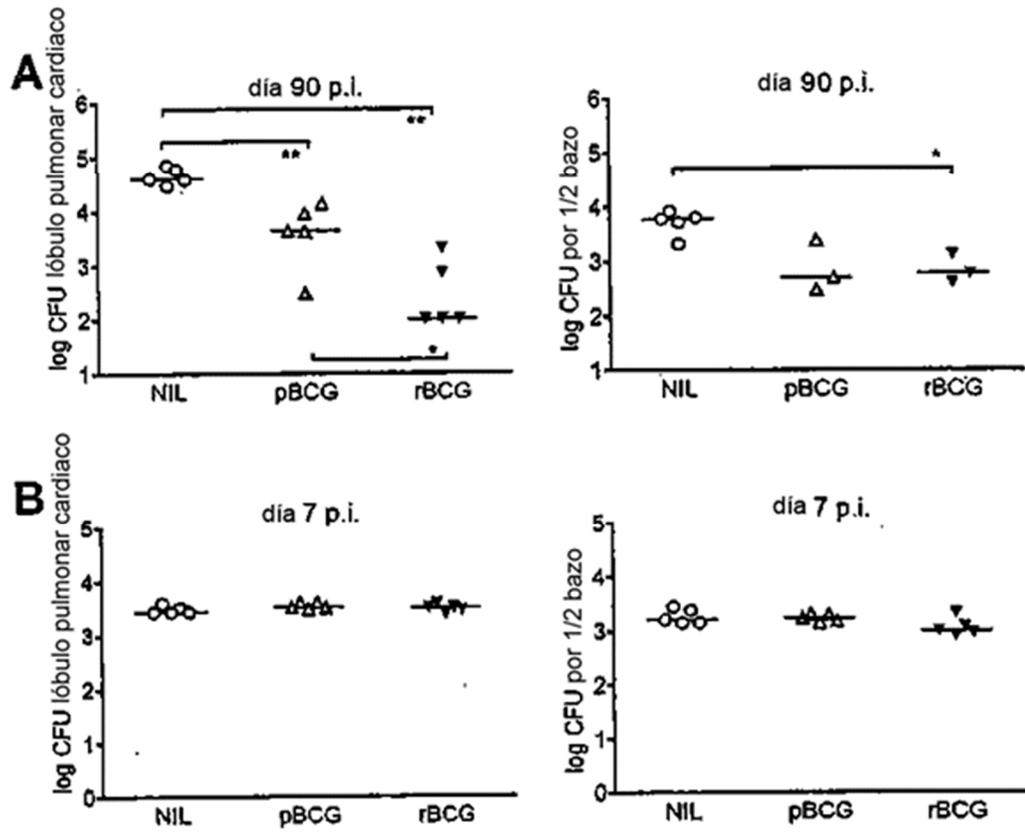


Figura 2

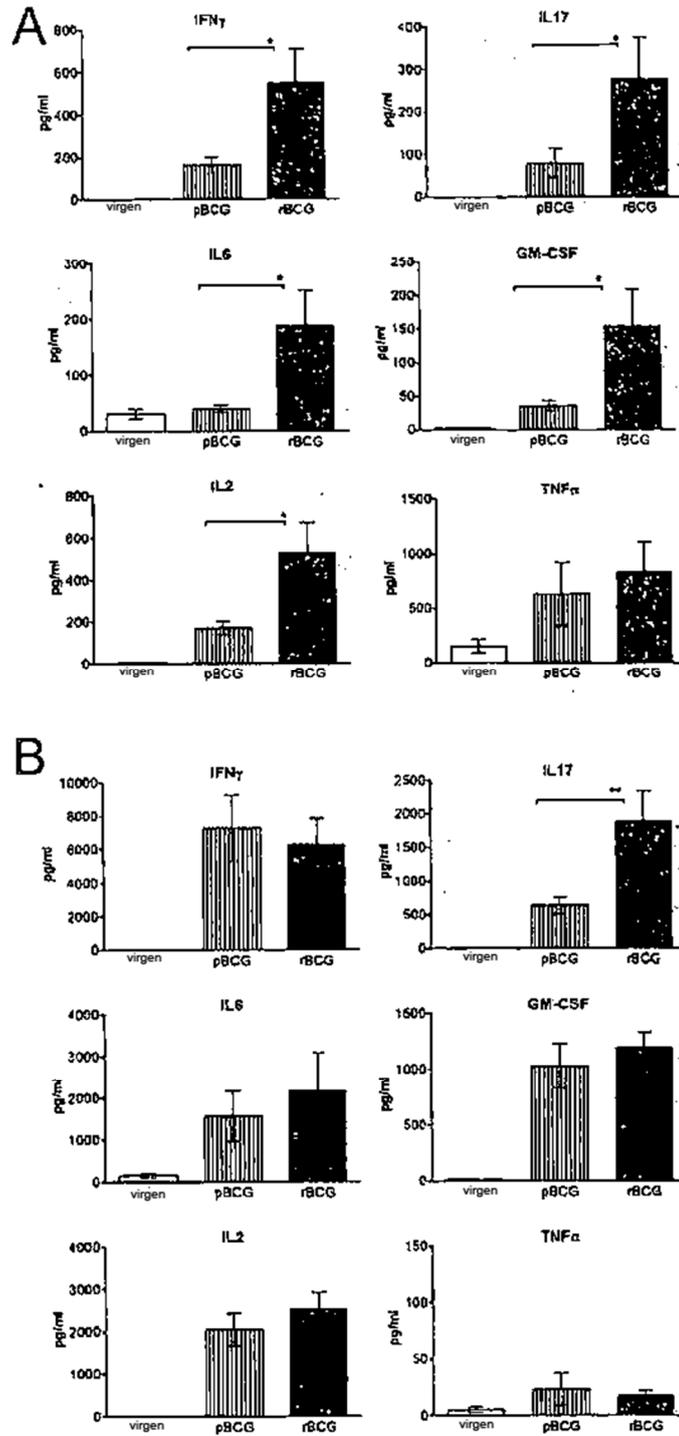


Figura 3

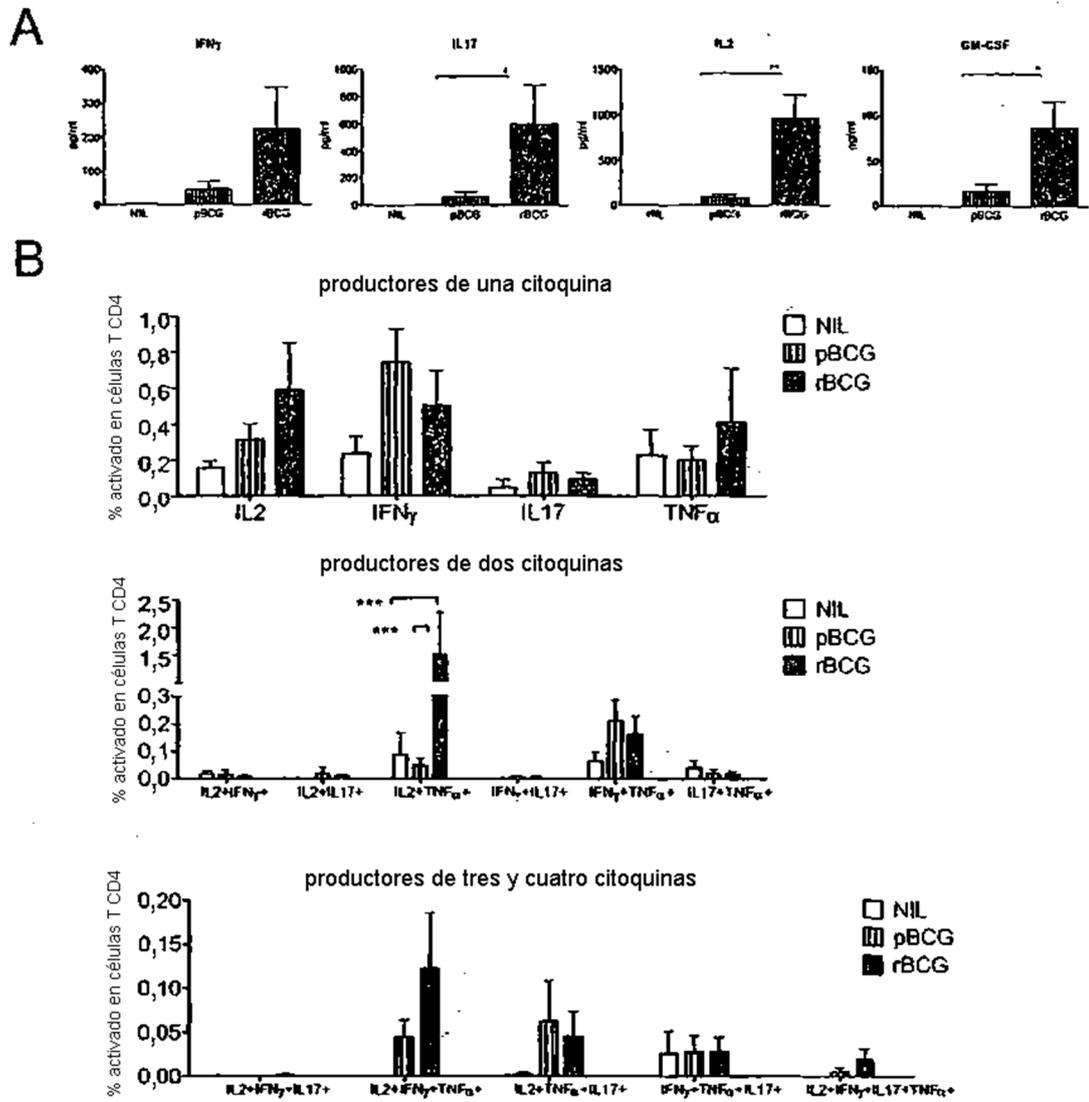


Figura 4

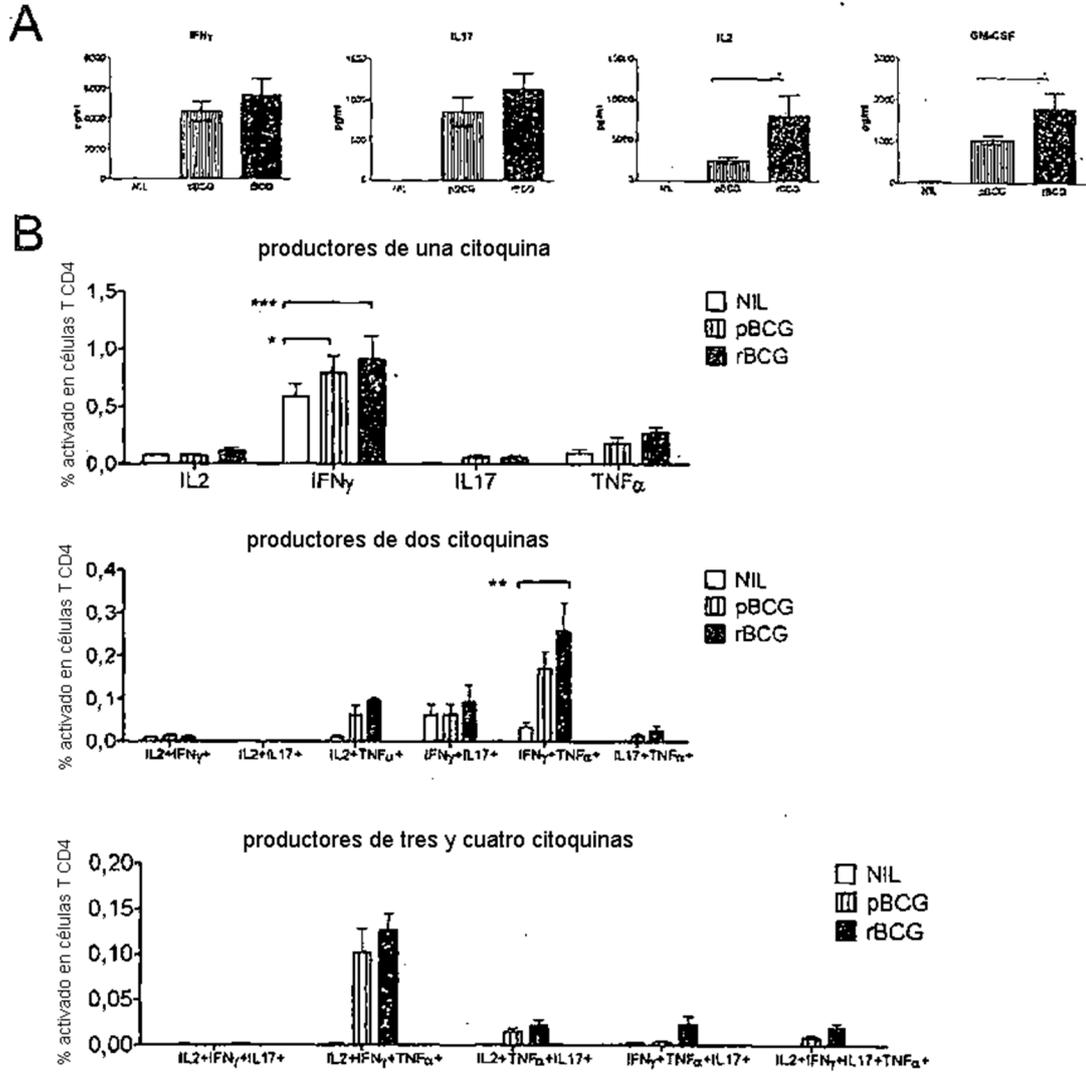


Figura 5

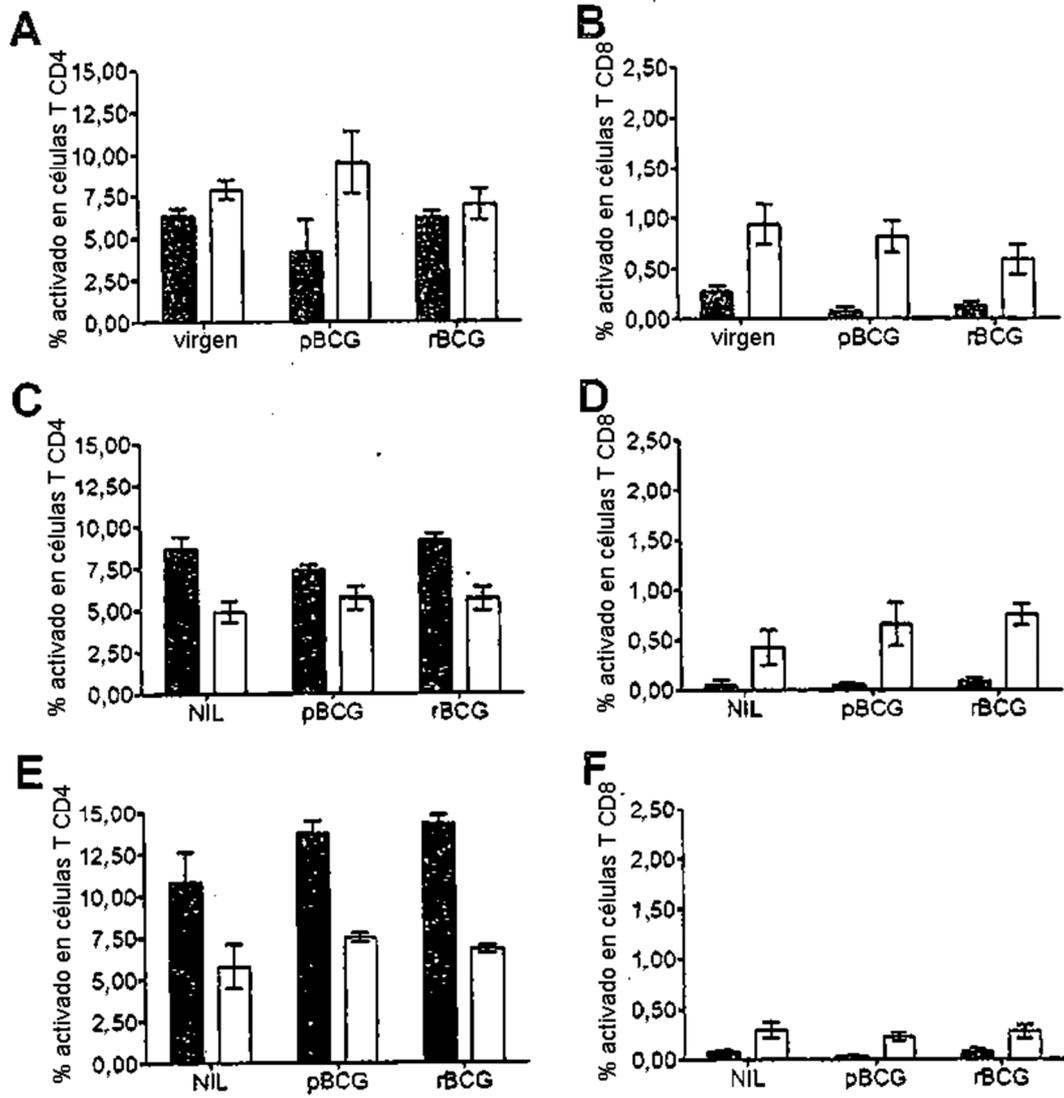


Figura 6

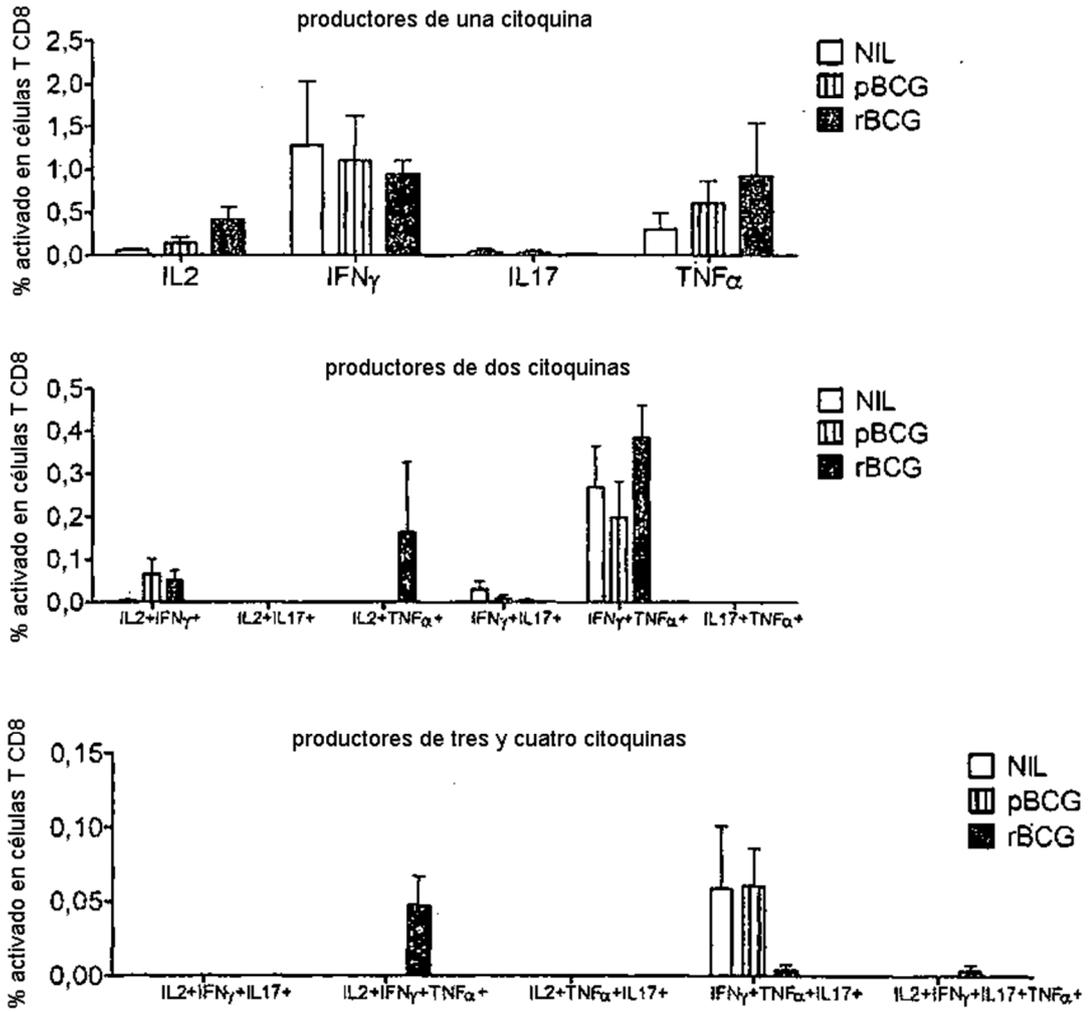


Figura 7

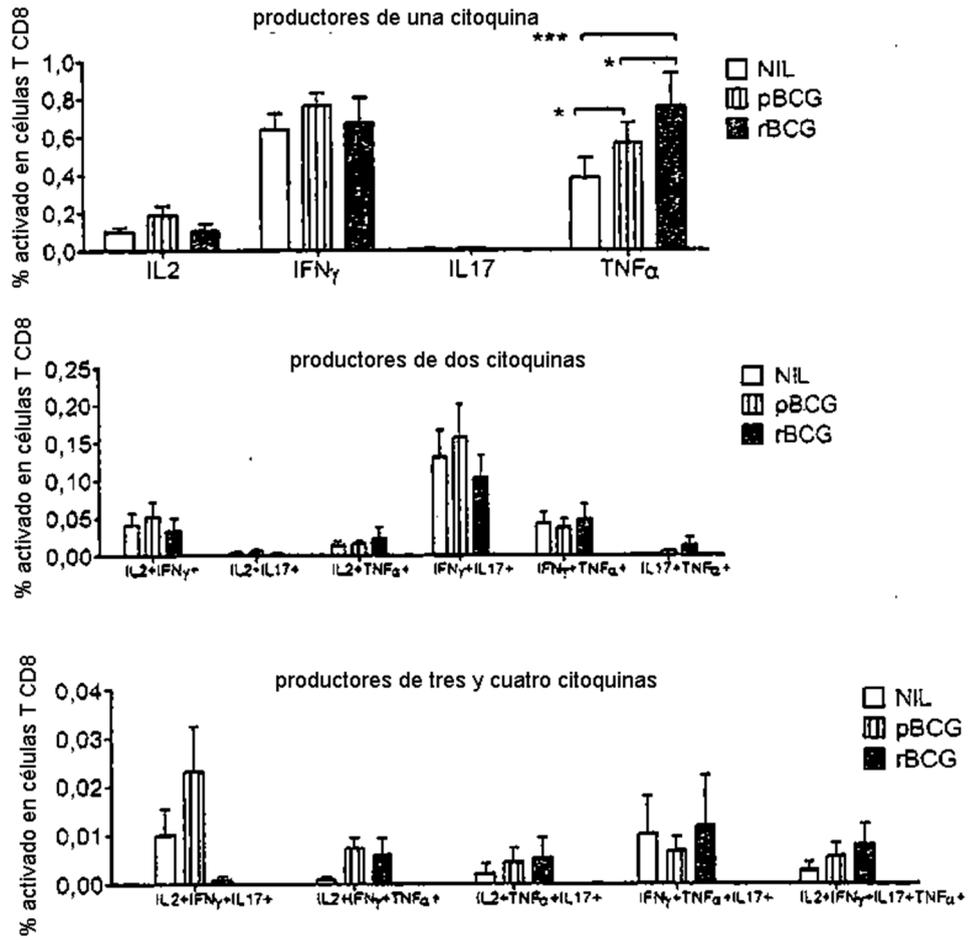


Figura 8

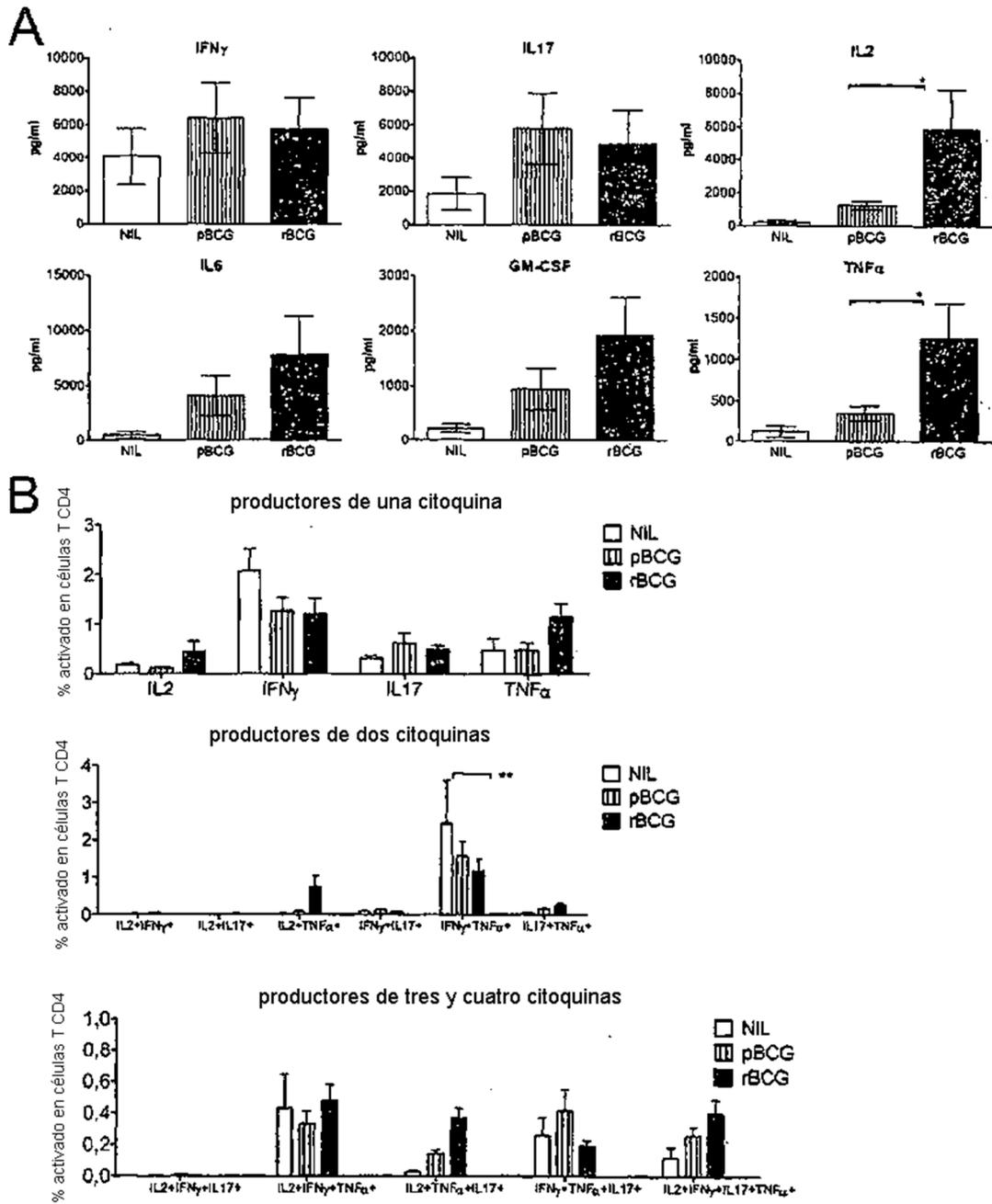


Figura 9

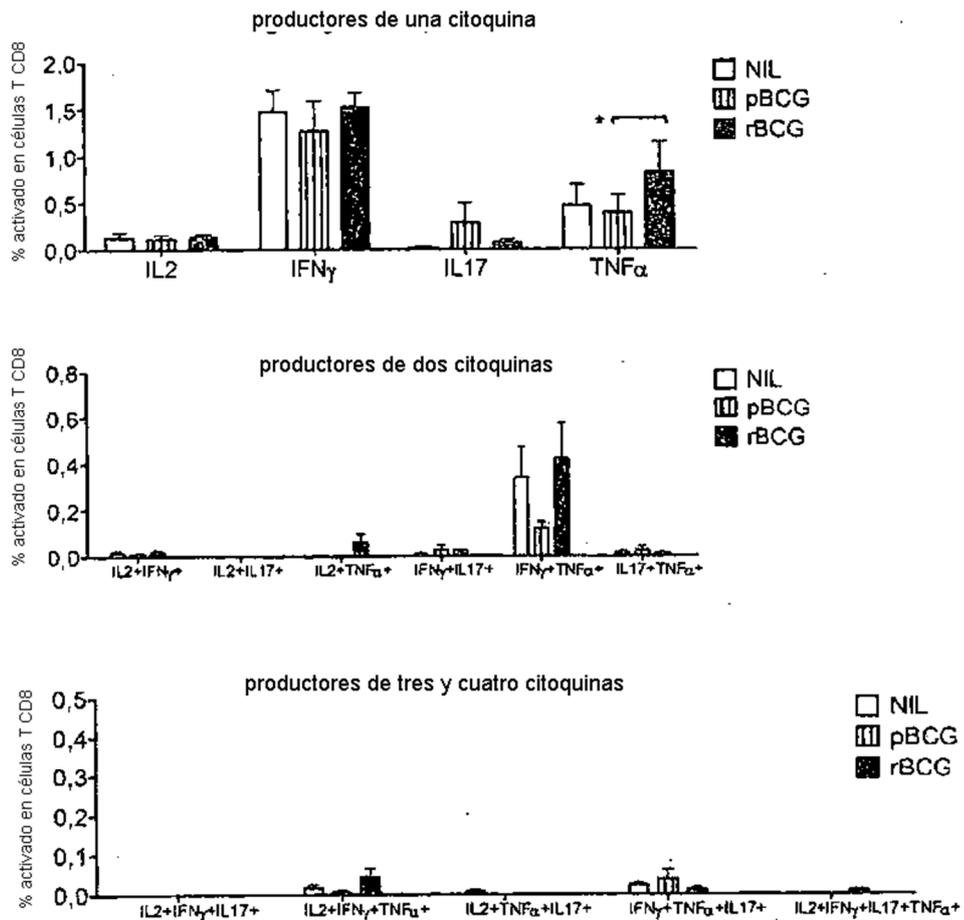


Figura 10

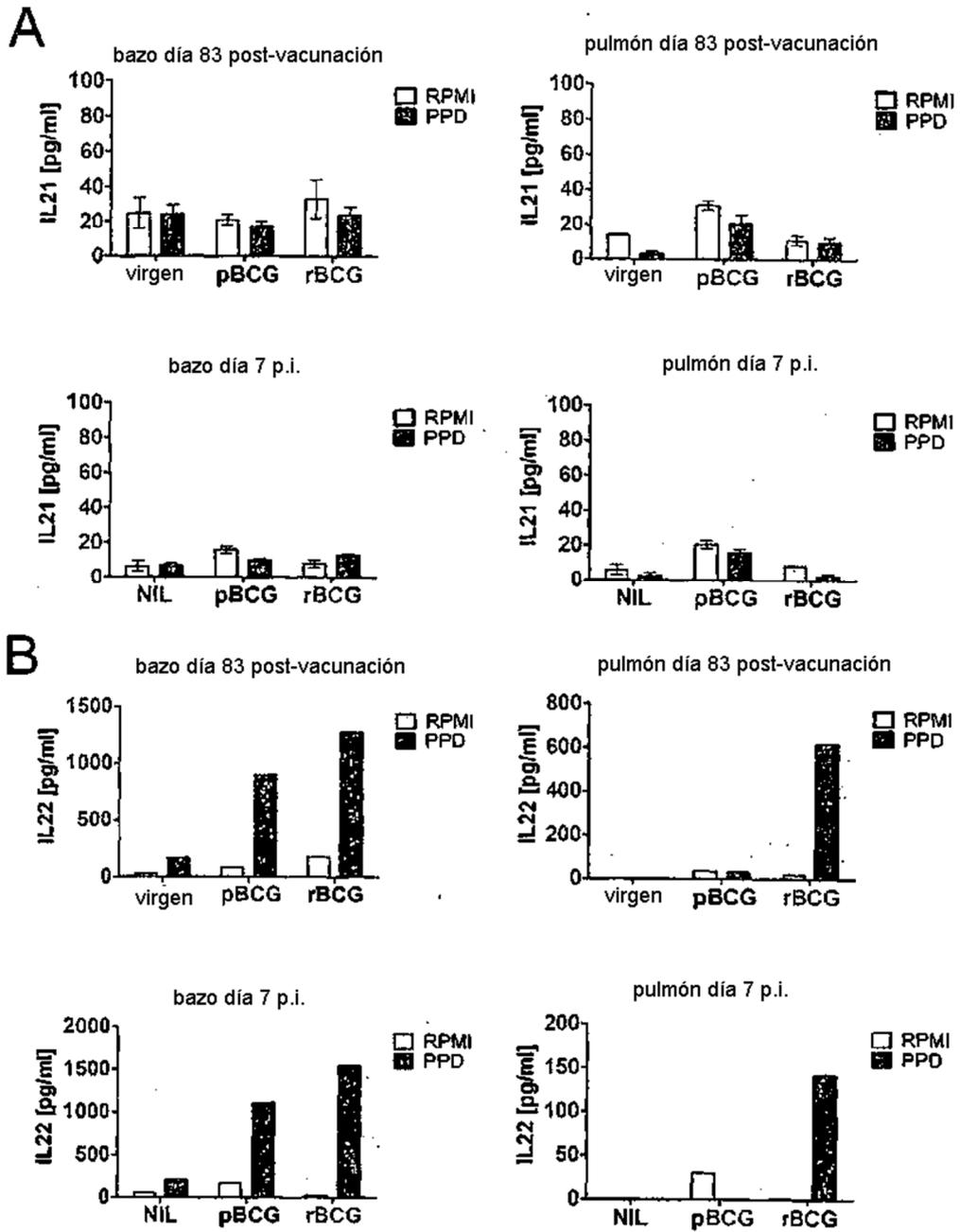


Figura 11

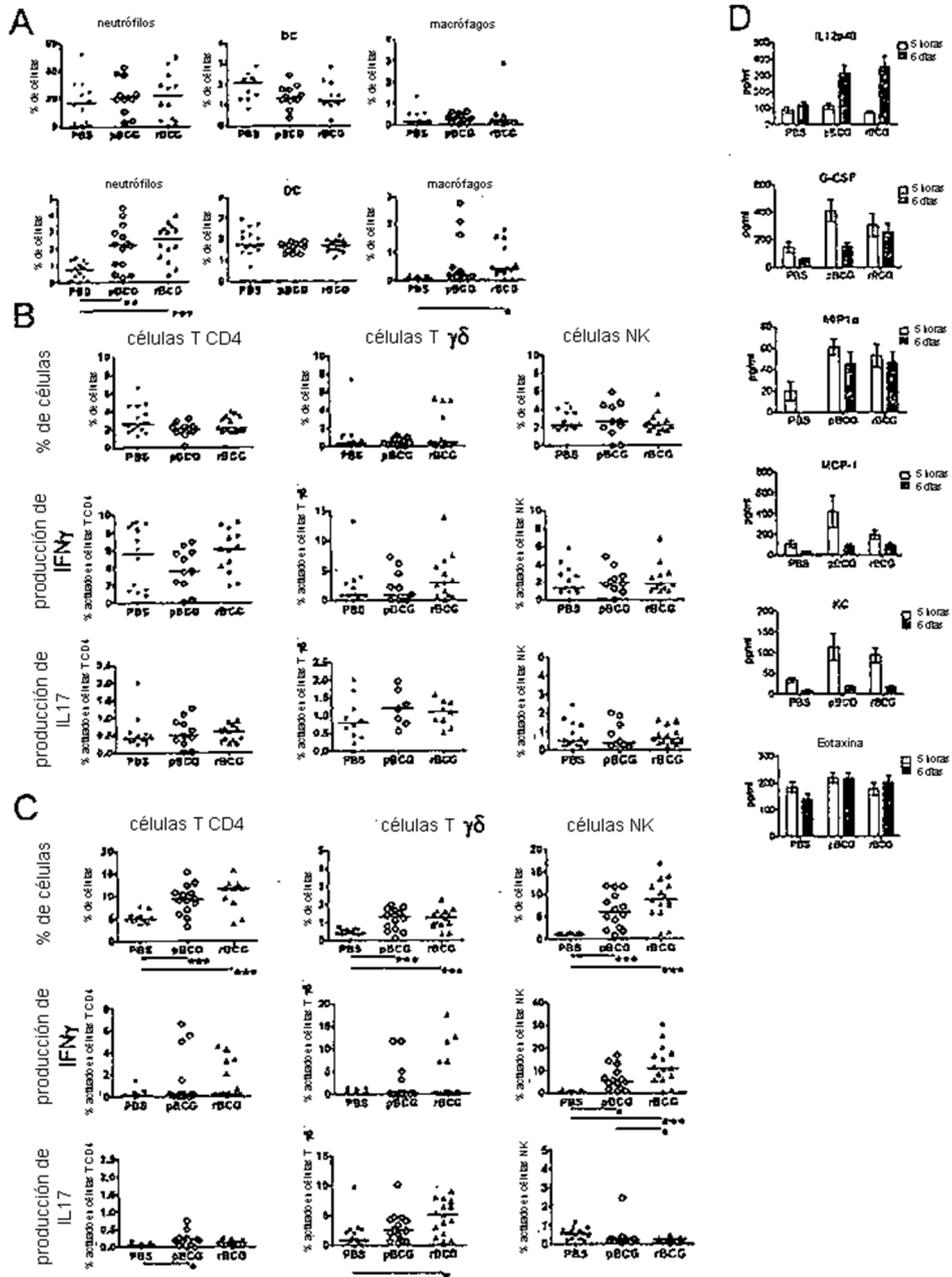


Figura 12

