



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 685 928

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 16.09.2011 PCT/EP2011/066131

(87) Fecha y número de publicación internacional: 29.03.2012 WO12038348

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 16.09.2011 E 11755362 (8)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 08.08.2018 EP 2618837

(54) Título: Mycobacterium recombinante como vacuna para uso en seres humanos

(30) Prioridad:

20.09.2010 US 384375 P

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 15.10.2018

(73) Titular/es:

VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH (100.0%) Mellendorfer Strasse 9 30625 Hannover, DE

(72) Inventor/es:

GRODE, LEANDER

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Mycobacterium recombinante como vacuna para uso en seres humanos

30

35

40

50

55

La invención se refiere a una nueva vacuna recombinante que proporciona inmunidad protectora especialmente contra la tuberculosis en seres humanos.

- 5 En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la tuberculosis (TB) como una emergencia mundial. En todo el mundo, aproximadamente 2.000 millones de personas ^{1,2} están infectadas con Mycobacterium tuberculosis, el microorganismo causante de la tuberculosis. Todos corren el riesgo de desarrollar síntomas clínicos de la enfermedad. En la mayoría de las personas, la infección por Mycobacterium tuberculosis está contenida inicialmente por las defensas del huésped, pero la infección permanece latente. Sin embargo, la infección latente de TB tiene el potencial de convertirse en una enfermedad activa de TB en cualquier momento, y las personas con TB activa se convierten en fuentes de nuevas infecciones. En 2007, el número de nuevos casos de enfermedad recogido en el informe de la OMS (2009) fue de 9,3 millones¹ y está aumentando constantemente. Aproximadamente 1,8 millones de personas mueren debido a esta enfermedad cada año. Por lo tanto, la tuberculosis sigue siendo una de las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo.
- BCG (Bacillus Calmette-Guérin), una cepa atenuada de Mycobacterium bovis, se ha utilizado como vacuna contra la tuberculosis desde 1921. Hasta la fecha se han administrado aproximadamente 4.000 millones de dosis³. Sin embargo, la vacunación con BCG no es lo suficientemente eficaz como para detener la propagación de esta enfermedad. La BCG puede proteger frente a, o al menos mejorar, las formas graves de TB sistémica en los niños, especialmente la meningitis. La BCG no protege frente a la variante pulmonar e infecciosa de la enfermedad⁴. Esto, sin embargo, sería necesario para la interrupción de la transmisión de la enfermedad.

Sólo hay unos pocos tratamientos antibióticos disponibles. Están fallando cada vez más, ya que va en aumento el número de pacientes que se infectan con cepas de TB resistentes a múltiples fármacos^{1,5}. Para empeorar la situación, se están extendiendo nuevas cepas altamente patógenas, tal como la Mycobacterium tuberculosis Beijing/W⁶.

Un objeto de la presente invención es el desarrollo de una vacuna segura, bien tolerada y eficaz frente a la TB, particularmente para residentes en zonas endémicas y personas en riesgo en zonas no endémicas. Esta vacuna reemplaza la vacuna BCG actualmente usada. La nueva vacuna debería ser al menos tan potente como la cepa actual y debería ser más segura que la BCG^{5,7}.

Mycobacterium tuberculosis y BCG son fagocitadas por los macrófagos del huésped. La localización intrafagosomal produce el tráfico de antígenos bacterianos a través de la ruta del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Esto da como resultado una estimulación preferencial de las células T CD4. Sin embargo, se ha demostrado que las células T citotóxicas CD8 restringidas por MHC clase I son cruciales en la inmunidad frente a Mycobacterium tuberculosis^{8,9}. A diferencia de Mycobacterium tuberculosis, la BCG sólo induce una estimulación débil de las células T citotóxicas CD8^{2,3,10}. Por lo tanto, se generó una cepa de BCG recombinante que expresa un dominio de escape fagolisosómico con el fin de dirigir los antígenos micobacterianos hacia la ruta del MHC de clase I^{2,7}. La cepa segrega listeriolisina (hly) de L. monocytogenes^{7,11}. Esta permite que la cepa escape del fagosoma de células hospedadoras infectadas al perforar la membrana del fagosoma. La inactivación del gen C de la ureasa fue necesaria para asegurar un pH fagosómico ácido para la actividad hly óptima. La perforación provoca la translocación del antígeno en el citoplasma y facilita la presentación cruzada a través del aumento de la apoptosis^{7,9}. Este procedimiento imita la inducción inmune de Mycobacterium tuberculosis de manera muy eficaz. Se espera que el modo de acción dé como resultado una vacuna eficaz y bien tolerada frente a la tuberculosis.

El concepto se ha descrito en los documentos de patente WO 99/10496 y WO 2004/094469. Grode et al. 14 describe dos tipos diferentes de construcciones, es decir hly † rBCG generada a partir de la cepa M. bovis Danesa 1331 y Δ UreC hly † rBCG generada a partir de la cepa M. bovis BCG Pasteur 1173P2, respectivamente (ver página 2477, columna izquierda bajo "Métodos").

45 La cepa de vacuna ΔUreC hly⁺ rBCG proporciona una mayor eficacia frente a la tuberculosis que la BCG parental cuando se prueba en un modelo de ratón, mientras que la cepa de vacuna hly⁺ rBCG generada a partir de la cepa Danesa 1331 se usa como control.

Kaufmann¹⁵ describe una nueva vacuna frente a Mycobacterium tuberculosis VPM1002, una vacuna viva frente a la tuberculosis rBCGΔUreC:hly que superó con éxito la Fase I de ensayo clínico. Sin embargo, no se proporciona una descripción detallada de la construcción VPM1002 propiamente dicha.

En este estudio, se aplicó por primera vez una vacuna BCG recombinante deficiente en ureasa en sujetos humanos. El estudio evaluó la seguridad, la tolerabilidad local y sistémica, así como la inmunogenicidad de la vacuna. Se siguió un diseño secuencial con aumento de dosis en comparación con la BCG comercialmente disponible. Ochenta (80) sujetos en Alemania fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos compuestos por 20 sujetos, cada uno clasificado según su historial de vacunación con BCG.

Se realizó un seguimiento de seguridad intensivo que incluía parámetros de laboratorio, evaluaciones de seguridad

física y análisis por ECG detallados además del seguimiento de seguridad habitual.

Un objeto de la presente invención es una vacuna frente a la tuberculosis para uso en seres humanos que comprende como ingrediente activo una célula de Mycobacterium bovis recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante como se representa en el n.º ID SEC 1 que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de Mycobacterium que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 121-153 de n.º ID SEC 1 y (b) un dominio de escape fagolisosómico que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 211-1722 de n.º ID SEC 1.

Un objeto adicional de la presente invención es una vacuna para uso en el tratamiento de un sujeto humano, una dosis farmacéuticamente eficaz de una célula de Mycobacterium bovis recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante como se representa en el n.º ID SEC 1 que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de Mycobacterium que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 121-153 de n.º ID SEC 1 y (b) un dominio de escape fagolisosómico que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 211-1722 de n.º ID SEC 1.

En una realización especialmente preferida, la secuencia ureC se inactiva (ΔUrec), por ejemplo, construyendo un vector suicida que contenga un gen ureC alterado por un gen marcador de selección, transformando la célula diana con el vector y buscando células positivas con marcadores de selección que tengan un fenotipo negativo para ureasa¹².

La célula es una célula de M. bovis recombinante de la cepa Danesa del subtipo Praga¹³.

25

30

35

40

45

20 En una realización preferida, la célula es BCG recombinante de la cepa Danesa del subtipo Praga caracterizada como rBCG ΔUrec :: hly + :: Hyg + (VPM1002).

La célula de Mycobacterium de la invención comprende la molécula de ácido nucleico representada en el n.º ID SEC 1. Esta molécula de ácido nucleico comprende una secuencia codificante de péptido señal (nucleótido 1 - 120), una secuencia que codifica un dominio inmunogénico (nucleótido 121 - 153), una secuencia codificante de enlazador peptídico (nucleótido 154 - 210), una secuencia que codifica un dominio fagolisosómico (nucleótido 211 - 1722), una secuencia codificante de enlazador peptídico adicional (nucleótido 1723 - 1800) y una secuencia que codifica un péptido aleatorio (nucleótido 1801 - 1870). La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en el n.º ID SEC 2

El dominio capaz de provocar una respuesta inmune comprende la secuencia desde aa.41 hasta aa.51 en el n.º ID SEC 2.

La molécula de ácido nucleico recombinante comprende además un dominio de escape fagolisosómico, es decir, un dominio polipeptídico que proporciona un escape del polipéptido de fusión desde el fagolisosoma al citosol de las células de mamífero. El dominio de escape fagolisosómico es un dominio de escape fagolisosómico de Listeria, que se describe en el documento de patente US 5.733.151, derivado del gen de listeriolisina (hly) de L. monocytogenes y codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende los nucleótidos 211 - 1722 como se muestra en el n.º ID SEC 1.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de escape fagolisosómico como se describió anteriormente se puede obtener directamente de un organismo de Listeria o de cualquier fuente recombinante, por ejemplo, una célula recombinante de E. coli que contiene la molécula de ácido nucleico de Listeria correspondiente o una variante de la misma como se describió anteriormente.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión contiene una secuencia que codifica un péptido señal. Más preferiblemente, la secuencia señal es una secuencia señal activa en Mycobacteria, preferiblemente en M. bovis, por ejemplo, una secuencia señal de M. bovis nativa. Un ejemplo preferido de una secuencia señal adecuada es la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal Ag85B que se representa en el n.º ID SEC 1 de los nucleótidos 1 a 120.

Además, se prefiere proporcionar un enlazador peptídico entre el dominio inmunogénico y el dominio de escape fagolisosómico. Preferiblemente, dicho enlazador peptídico tiene una longitud de 5 a 50 aminoácidos. Más preferiblemente, una secuencia que codifica un enlazador como se muestra en el n.º ID SEC 1 de los nucleótidos 154 a 210.

El ácido nucleico puede estar localizado en un vector recombinante. Preferiblemente, el vector recombinante es un vector procariota, es decir, un vector que contiene elementos para la replicación y/o integración genómica en células procariotas. Preferiblemente, el vector recombinante porta la molécula de ácido nucleico de la presente invención unida operativamente con una secuencia de control de expresión. La secuencia de control de expresión es preferiblemente una secuencia de control de expresión activa en Mycobacteria, particularmente en M. bovis. El vector puede ser un vector extracromosómico o un vector adecuado para la integración en el cromosoma. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de dichos vectores y, por ejemplo, se citan en Sambrook et al. supra.

En algunas realizaciones, la célula de Mycobacterium recombinante puede portar un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina (hyg). En otras realizaciones, la célula de Mycobacterium recombinante no porta un gen de resistencia a antibióticos.

Preferiblemente, la vacuna es una vacuna viva para su uso en seres humanos, por ejemplo, para uso en residentes en zonas endémicas en infecciones por micobacterias, tal como tuberculosis o para uso en personas en riesgo en 5 zonas no endémicas. La vacuna puede ser para administrar a sujetos sin tratamiento previo frente a Mycobacterium, por ejemplo, BCG, por ejemplo, un ser humano que no haya sido preexpuesto a un desafío inmunogénico de Mycobacterium o a un ser humano que no hava sido preinmunizado con BCG. Los ejemplos de dichos sujetos son, por ejemplo, recién nacidos o niños, por ejemplo, hasta 8 años, por ejemplo, en zonas endémicas en infecciones por 10 micobacterias, tal como tuberculosis, o personas en riesgo en zonas no endémicas. La vacuna es particularmente adecuada para administrar a sujetos con padres VIH positivos, por ejemplo, madres. La vacuna se puede administrar a sujetos sin tratamiento previo frente a Mycobacterium, por ejemplo, BCG, en una población endémica de infecciones por VIH. En otras realizaciones, la vacuna puede ser para administrar a sujetos preexpuestos a Mycobacterium, por ejemplo, BCG, por ejemplo, niños de 9 años o adultos, por ejemplo, que viven en zonas con tuberculosis endémica o 15 sujetos preinmunizados con BCG. En dichos sujetos, la vacuna de la invención tiene un efecto potenciador sobre el estado inmune inducido por BCG ya existente.

En una realización preferida adicional, la administración de la vacuna da como resultado un aumento de la respuesta de IFN-γ en sujetos no tratados o preinmunizados y en una regulación positiva de células T CD4+, particularmente de células T CD4+ multifuncionales.

- En una realización preferida, la vacuna es un liofilizado que comprende la célula de Mycobacterium y opcionalmente agentes, por ejemplo, glucosa y/o dextrano. Opcionalmente, la vacuna comprende adicionalmente un fluido de reconstitución, agua para inyección o disolución salina. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una dosis de aproximadamente 10³-10⁴ CFU (unidades formadoras de colonias), aproximadamente 10⁴-10⁵ CFU o aproximadamente 10⁵-10⁶ CFU.
- Se podría elegir la administración a una superficie de mucosa (por ejemplo, el tracto ocular, intranasal, oral, gástrico, intestinal, rectal, vaginal o urinario) o por la vía parenteral (por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal). Especialmente preferida es la administración intradérmica.
- En algunas realizaciones, la vacuna es para administrar en una dosis única que incluye una inmunización de sujetos no inmunizados previamente frente a Mycobacterium o una vacunación de refuerzo de sujetos preexpuestos a Mycobacterium, por ejemplo, sujetos que han sido prevacunados con una vacuna basada en Mycobacterium, por ejemplo, una vacuna de BCG nativa para sujetos que han entrado en contacto con Mycobacteria, por ejemplo, Mycobacteria patogénicas antes de la administración de la vacuna de la invención. Alternativamente, la vacuna de la invención se puede administrar en dos o más dosis. Las dosis respectivas se pueden administrar entre intervalos de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 meses o más.
- La vacuna de la presente invención es para usar frente a las infecciones por Mycobacteria, más particularmente para usar frente a la tuberculosis.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras, listados de secuencias y ejemplos.

- Fig. 1: Correlación del tamaño medio de eritema por grupo de tratamiento y día de estudio
- Fig. 2: Tamaño medio de induración por grupo de tratamiento y día de estudio
- 40 Fig. 3: Cambios medios desde la base de referencia para la respuesta de IFN-γ después de estimulación con Ag 85B en sujetos no tratados previamente.
 - A. PBMC ELISA para IFN-y,
 - B. ELISpot,
 - C. ELISA de sangre completa para IFN-y.
- Todos los ensayos han sido estimulados con 2 μg/mL de Ag 85B. El VPM1002 (5x10⁵) en barras rojas, grupo BCG en barras azules.

Estimulación: 2 μg/mL de Ag 85B. VPM1002 aumenta la respuesta de IFN-γ.

- Fig. 4: Cambios medios desde la base de referencia para la respuesta de IFN-γ después de estimulación con Ag 85B en sujetos preinmunizados
- 50 A. PBMC ELISA para IFN-γ,
 - B. ELISA de sangre completa para IFN-y.

Todos los ensayos han sido estimulados con 2 μ g/mL de Ag 85B. El VPM1002 (5x10 5) en barras rojas, grupo BCG en barras azules.

Estimulación: 2 µg/mL de Ag 85B. VPM1002 aumenta la respuesta de IFN-y.

- Fig. 5: Cambio desde la base de referencia de las células T CD4⁺ únicas y multifuncionales en sujetos no tratados previamente
 - A. La frecuencia de células T CD4 únicas positivas (expresión de IFN-y) reestimulada con PPD
 - B. La frecuencia de células T CD4 multifuncionales (expresión de IFN-γ e IL-2) reestimulada con Ag 85B.
 - C. La frecuencia de células T CD4 multifuncionales (que expresan IFN- γ , IL-2 y TNF- α) reestimulada con PPD o
 - D. Reestimulada con Ag 85B, se determinó mediante FACS ICS de PBMC de adultos inmunizados con VPM1002 (rojo) o control con BCG (azul).
 - n.º ID SEC 1: muestra la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de Mycobaterium 85B y un dominio de escape fagolisosómico de Listeria.
- n.º ID SEC 2: muestra la correspondiente secuencia de aminoácidos de la molécula de ácido nucleico de n.º ID SEC 1.

Ejemplo

5

10

15

Estudio clínico de fase 1 para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una vacuna de la invención (VPM1002) en comparación con BCG en voluntarios sanos varones estratificados para el historial de vacunación con BCG.

1. Identidad de la vacuna VPM 1002

- 20 La VPM1002 es una vacuna BCG genéticamente modificada derivada de Mycobacterium bovis BCG de la cepa Danesa subtipo Praga, caracterizada como rBCG ΔureC :: hly ⁺ :: hyg ⁺. La VPM1002 estuvo disponible en forma de una torta liofilizada de Mycobacterium bovis BCGΔureC :: Hly ⁺ :: Hyg ⁺ viva. Un vial contenía 5x10⁶ CFU (intervalo 2-8x10⁶ CFU) de VPM 1002.
- El gen para la listeriolisina (hly) se ha incorporado al gen de la ureasa C (ureC) que da como resultado la eliminación de la actividad de la ureasa C y la introducción de la actividad de la listeriolisina.
 - La VPM 1002 es resistente a la higromicina (hyg). La resistencia a la higromicina sirvió como un marcador de selección durante la ingeniería genética de la cepa y servirá como marcador específico en el seguimiento del organismo genéticamente modificado (OMG) y el plan de emergencia de OMG. La VPM1002 es sensible a los antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de la infección por micobacterias, es decir, isoniazida, rifampicina y etambutol.
- 30 La VPM1002 se suministró como una torta liofilizada (liofilizada) que se reconstituyó con 1 mL de H₂O (*aqua ad iniectabilia*). La concentración después de la reconstitución fue de aproximadamente 5 x 10⁶ CFU. Para la administración de dosis de 5 x 10³ y 5 x 10⁴ CFU, la suspensión reconstituida de VPM 1002 se diluyó a 1:100 o 1:10, respectivamente, usando una disolución estéril lista para usar de cloruro de sodio al 0,9%.

2. Objetivos

40

45

35 El objetivo principal de este estudio fue investigar la seguridad de dosis únicas de VPM 1002.

El objetivo secundario de este estudio fue investigar la inmunogenicidad de dosis únicas de VPM1002 para la vacunación frente a la tuberculosis.

3. Metodología (diseño del estudio):

Esta fue la primera aplicación de VPM1002 en seres humanos. El estudio siguió un diseño abierto, aleatorizado, controlado, de dosis crecientes para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de una dosis única de VPM1002.

Se administró una sola vacuna con VPM1002 por vía intradérmica a sujetos que no habían sido previamente vacunados con Bacille Calmette-Guerin (BCG) o que tenían una preinmunización con BCG (vacunación con BCG documentada en los documentos de vacunación o cicatriz BCG y en ambos casos más prueba cutánea de derivado proteico purificado (PPD) no superior a débilmente positivo). Se investigaron tres dosis crecientes de VPM1002. Un grupo de referencia de sujetos recibió una dosis única de vacuna BCG.

Después de la vacunación, se controlaron de cerca los parámetros de seguridad hasta 4 horas después de la aplicación. A partir de entonces, los sujetos fueron dados de alta de la clínica, a excepción de los primeros 3 sujetos dentro de cada grupo de dosis, que permanecieron en la clínica hasta 24 horas después de la vacunación.

Se realizaron evaluaciones de seguridad y farmacodinámicas hasta el día 57 y nuevamente 6 meses después de la vacunación.

Se realizó un análisis provisional de seguridad después de que los resultados del día 57 estuvieran disponibles de los primeros 3 sujetos de cada cohorte. Basándose en estos datos, la administración de VPM1002 en dosis de hasta 5x10⁵ CFU se consideró segura y bien tolerada. Con base en las variables secundarias del estudio de inmunogenicidad, se realizó una nueva estimación estadística del tamaño de la muestra. Los resultados de este análisis (p1 = 0,0119) mostraron que fue suficiente el tamaño de muestra planificado de 80 sujetos incluidos en el estudio. No fue necesaria una extensión del tamaño de la muestra.

4. Número de sujetos

15

20

25

Se planificó la inclusión de cuarenta (40) sujetos sin tratamiento previo con BCG y 40 sujetos con vacunación previa con BCG (o PPD positivo) en este estudio. Los 80 sujetos, a excepción de 1 sujeto, que se perdió durante el seguimiento, completaron el estudio según lo planeado.

	Cohortes de estudio								
	Sin vacı		via con BC0 ativo	G y PPD	Con vac				
Grupo de tratamiento	BCG	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	BCG	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	En general
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Sujetos incluidos	10	10	10	10	10	10	10	10	80
Sujetos que completaron el estudio	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (90)	79 (98,8)
Sujetos retirados	0	0	0	0	0	0	0	1 (10)	1 (1,3)
Motivo									
Otros motivos	-	-	-	-	-	-	-	1 (10)	1 (1,3)

Tratamiento: BCG = 5 x 10E5 CFU BCG (intervalo 2 - 8 x 10E5),

Grupo 1 = 5 x 10E3 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E3),

Grupo 2 = 5 x 10E4 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E4),

Grupo 3 = 5 x 10E5 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E5),

5. Diagnóstico y principales criterios para la inclusión:

Varones sanos, con edades entre 18-55 años (extremos incluidos), sin ningún síntoma, signos físicos o valores de laboratorio que sugirieran trastornos sistémicos o enfermedad actual y sin ningún signo de infección activa o latente por tuberculosis (LTBI). La prueba de tuberculina-PPD tenía que ser < 10 mm para los sujetos con vacuna previa de BCG y < 1 mm para los sujetos sin tratamiento previo al inicio del estudio.

6. Producto de ensayo, dosis y modo de administración, número de lote:

El ingrediente activo de VPM1002 fue Mycobacterium bovis rBCGΔureC::hly*::hyg*, liofilizado y normalizado para el número de micobacterias viables (unidades formadoras de colonias (CFU)) por aplicación.

Niveles de dosis: 5 x 10³ CFU VPM1002 (intervalo 2-8 x 10³ CFU)

5 x 10⁴ CFU VPM1002 (intervalo 2-8 x 10⁴ CFU)

 5×10^5 CFU VPM1002 (intervalo 2-8 x 10^5 CFU)

Se administraron aproximadamente 0,1 mL de suspensión de VPM1002 reconstituida y diluida mediante inyección intradérmica con una jeringa de 1 mL subgraduada en centésimas de mL (1/100 mL) con una aguja de bisel corta (25G/0,50 mm o 26G/0,45 mm, 10 mm de longitud). No se permitieron inyectores a chorro ni múltiples dispositivos de punción.

5 7. Duración del tratamiento:

Una sola vacuna

8. Terapia de referencia, dosis y modo de administración, número de lote:

Vacuna BCG SSI, polvo y disolvente para suspensión inyectable,

de Statens Serum Institut Denmark.

10 Después de la reconstitución, 1 dosis (0.1 mL) contenía:

Mycobacterium bovis BCG (Bacillus Calmette-Guerin), cepa danesa 1331, vivo atenuado, 2-8 x 10⁵ CFU.

La administración se realizó como se describe para VPM1002.

9. Criterios de evaluación:

Parámetros de seguridad:

- incidencia de eventos adversos, perfil temporal de eventos adversos, otros perfiles de eventos adversos
 - evaluación de la reacción local en el sitio de vacunación y fotodocumentación de la reacción local en el sitio de vacunación (Días 1, 5, 11, 29, 57, después de 6 meses)
 - parámetros de laboratorio de seguridad estándar (hematología, coagulación, química clínica que incluyen enzimas hepáticas, análisis de orina)
- Prueba de oro QuantiFeron al inicio del estudio, día 57 y mes 6
 - examen físico que incluye electrocardiograma (ECG), signos vitales

y peso corporal

- · radiografía de pecho
- imágenes hepáticas sonográficas al inicio del estudio, día 57 y mes 6
- evaluación global de tolerabilidad de los sujetos.

Parámetros de inmunogenicidad:

- prueba de estimulación de linfocitos (LST): cantidad de interferón (IFN)-y por célula
- técnica de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELIspot): número de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que segregan IFN-γ por número total de PBMC
- 30 análisis de sangre completo (WBA): cantidad de IFN-γ por número de linfocitos
 - tinción intracelular de citoquinas (ICS) (análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS)): número de linfocitos CD4+ y CD8+; que fueron xxx-brillante, xxx-brillante y xxx-brillante ("células triple-positivas"); por número total de linfocitos.

10. Variables del estudio:

35 Variable primaria:

Para evaluar la seguridad de una dosis única de VPM1002 evaluada mediante examen físico, signos vitales, ECG, ecografía hepática, radiografía de tórax, parámetros de seguridad del laboratorio (incluidos hematología, coagulación, química clínica y análisis de orina), tolerancia, registro de medicación concomitante y seguimiento de eventos adversos.

- 40 Variables secundarias: Inmunogenicidad, evaluada por
 - LST para la tuberculina (PPD) con el posterior ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas específicas de IFN-γ (ELISA) en sobrenadantes de PBMC.

- ELIspot específico para el número de PBMC secretoras de IFN-γ después de estimulación con PPD.
- WBA para estimular células durante 3 días con PPD y medir IFN-γ en el plasma mediante ELISA.

Variables exploratorias: inmunogenicidad, evaluada por

- Análisis FACS de ICS para IFN-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α e interleucina (IL)-2 en linfocitos CD4+ y CD8+ tras la estimulación nocturna con PPD.
 - · Análisis FACS de tinción intracelular con carboxifluoresceína

diacetato succinimidil ésteres (CFSE) en linfocitos CD4+ y CD8+ tras la estimulación nocturna con PPD

- · LST, ELIspot, ICS y WBA para la estimulación con el cóctel peptídico del antígeno de la tuberculosis (TB-Ag) 85b.
- Concentración de anticuerpos séricos contra PPD o el cóctel peptídico TB-Ag85B; cuantificación de los subtipos G de inmunoglobulina (Ig) de estos anticuerpos séricos.

11. Métodos estadísticos:

10

15

30

40

45

Se utilizó estadística descriptiva para la evaluación de parámetros de seguridad. Se utilizaron los siguientes procedimientos de prueba estadística para los datos de inmunogenicidad:

- Prueba de Jonckheere Terpstra (α = 0,05) para detectar una relación dosis-respuesta en los cambios ajustados desde el inicio en una configuración de medición repetida en comparación con el grupo BCG
 - Modelo de regresión lineal para ajustar los cambios desde el inicio hasta las visitas individuales después del inicio en el parámetro respectivo con covariables putativas prospectivamente definidas y cofactores del factor de tratamiento (Selección hacia atrás)
- Estimación de los efectos del tratamiento (cambios desde el inicio) utilizando intervalos de confianza del 95%, tanto dentro de los grupos como comparando los grupos VPM1002 con el grupo BCG
 - Eliminación hacia atrás de covariables/cofactores estadísticamente irrelevantes en los modelos de regresión ajustados
 - X 2-test, t-test, U-test para comparaciones exploratorias entre dos grupos de tratamiento
- regresión lineal multivariable en lugar de la prueba Jonckheere-Terpstra para estimar la sensibilidad de los análisis 25 no paramétricos.

12. Resumen de la población de estudio:

Los 80 sujetos se incluyeron en la población de seguridad y la población de intención de tratar (ITT). Los 80 sujetos proporcionaron evaluaciones válidas e interpretables para los parámetros de inmunogenicidad y no tuvieron una desviación de protocolo importante; por lo tanto, todos los sujetos fueron válidos para la inmunogenicidad (IM) y la población por protocolo (PP).

La edad media general fue de 33,1 años (medias para las diferentes cohortes entre 25,2 y 38,7 años). La altura promedio fue de 179,7 cm (entre 177,2 y 181,8 cm), el peso promedio fue de 78,8 kg (entre 73,0 y 82,5 kg) y el IMC promedio fue de 24,38 kg/m² (entre 22,98 y 25,78 kg/m²). Las diferencias entre los grupos de tratamiento se consideraron no clínicamente relevantes.

35 13. Resumen de la farmacodinámica:

El objetivo secundario de este estudio fue mostrar la inmunogenicidad de VPM1002. Se cumplió el objetivo secundario. El estudio muestra que VPM1002 induce cuantitativamente y cualitativamente muy buenas respuestas inmunes celulares en ambos estratos, los sujetos "sin tratamiento previo" y "preinmunizados" de BCG. Todos los datos observados muestran una clara respuesta inmune tipo Th1 provocada por VPM1002. El objetivo inicial del desarrollo de esa cepa de vacuna particular VPM1002 fue aumentar la respuesta inmune mediada por células e inducir respuestas inmunitarias cualitativamente mejores que la BCG. Se pudieron cumplir estos objetivos. Además, también muestra un potencial para impulsar la vacunación sobre una respuesta inmune preexistente inducida por BCG.

Para la cantidad de IFN-γ por número de linfocitos (variables secundarias LST y WBA), se observó una correlación dosis-respuesta entre los grupos que recibieron VPM1002 mediante estadísticas paramétricas y no paramétricas. Dentro de cada estrato, los cambios promedio desde el inicio fueron más altos en el grupo de 5 x 10⁵ CFU VPM1002 y el más bajo en el de 5 x 10³ CFU VPM1002 en todos los días de estudio. Esto demuestra el efecto de VPM1002 para el receptor.

El análisis de regresión lineal de los cambios desde el inicio en las variables secundarias mostró que la edad, el peso,

PBMC total al inicio del estudio y el total de linfocitos al inicio del estudio no tuvieron un efecto estadísticamente significativo en los resultados.

En las variables exploratorias se observó un efecto considerable sobre la inducción de células T CD4+ multifuncionales en ambos estratos.

5 Para concluir, VPM1002 provoca una respuesta inmune Th1 induciendo IFN-γ, no sólo cuantitativamente diferente de BCG sino también cualitativamente diferente con células T multifuncionales. Estos resultados fomentan el desarrollo posterior de la vacuna.

14. Resumen de seguridad:

20

25

30

35

La variable primaria de este estudio de fase I fue la evaluación de seguridad de VPM1002. De hecho, el estudio no reveló ningún problema de seguridad para VPM1002.

En detalle, la vacunación individual con hasta 5x10⁵ CFU de VPM1002 fue bien tolerada. No se produjo ningún evento adverso grave (AE).

En general, el 80,7% de todos los EA se consideraron relacionados con la medicación del estudio (reacciones adversas a medicamentos (ADR): relación evaluada como "cierta", "probable" o "posible") por el investigador.

Las reacciones adversas fueron reportadas por todos los sujetos. Casi todas las reacciones adversas fueron alteraciones del sitio de la inyección (98,0% de todas las reacciones adversas).

El número de ADR aumentó con el aumento de la dosis. Sin embargo, la frecuencia y la intensidad de las reacciones adversas siempre fue médicamente aceptable, incluso a la dosis más alta de VPM1002 (5x10⁵ CFU). También hubo una tendencia a una mayor incidencia de reacciones adversas en sujetos con vacunación previa con BCG en comparación con los grupos de tratamiento respectivos sin preinmunización con BCG (239 frente a 204 reacciones adversas, respectivamente).

Todos los sujetos experimentaron AE. El número de eventos adversos fue similar en los grupos de BCG y 5x10⁵ CFU de VPM1002 en sujetos no inmunizados previamente con vacuna BCG (76 y 82 AE, respectivamente) e inferior en los otros 2 grupos (47 AE después de 5x10³ CFU de VPM1002 y 53 eventos adversos después de 5x10⁴ CFU de VPM1002). En el grupo de sujetos con vacuna BCG previa, el número de EA fue más alto en el grupo 5x10⁵ CFU de VPM1002 (97 EA), comparado con 72 EA en el grupo BCG y 61 EA en los grupos 5x10³ CFU y 5x10⁴ CFU de VPM1002.

Dentro del estrato de sujetos sin tratamiento previo con BCG, las reacciones adversas observadas en los grupos de tratamiento que recibieron BCG y VPM1002 en el mismo intervalo de dosis (5x10⁵ CFU) fueron de incidencia y gravedad comparables (64 frente a 72 después de BCG y de VPM1002, respectivamente). Dentro del estrato de sujetos preinmunizados con BCG, la incidencia de reacciones adversas fue ligeramente mayor en sujetos que recibieron 5x10⁵ CFU de VPM1002 en comparación con 5x10⁵ CFU de BCG (78 reacciones adversas después de VPM1002 frente a 60 reacciones adversas después de BCG). Sin embargo, la intensidad de las reacciones adversas fue comparable entre ambas cohortes y tras una inspección más cercana, el motivo principal de este desequilibrio parece ser una incidencia ligeramente mayor de ulceración en el sitio de inyección después de VPM1002 (4 y 8 eventos después de BCG y de VPM1002, respectivamente, 1 a 8 mm de diámetro) asociado con eventos de seguimiento relacionados como costras, y exfoliación en el sitio de inyección (6 frente a 9 y 4 frente a 7 ADR, respectivamente, después de BCG y de VPM1002), todos con una intensidad leve y es otro indicador de inducción de inmunogenicidad.

La mayoría de los EA fueron de intensidad leve (95,3% de todos los EA), 25 EA (4,6% de todos los EA) fueron de intensidad moderada y 1 EA (0,1% de todos los EA, presentados después de BCG) fue de intensidad severa.

Ningún sujeto abandonó el estudio debido a un AE.

Resumen del número total de AE y alteraciones en el sitio de inyección

Clasificación por grupos y sistemas término preferente	Sin vacur	nación previa c	on BCG y PPD) negativo	Con vacunación previa con BCG o PPD positivo				
	BCG	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	BCG	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	
	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	x (y,z%)	
En general	76	47	53	82	72	61	61	97	
	(10,100)	(10, 100)	(10,100)	(10,100)	(10,100)	(10,100)	(10,100)	(10,100)	

Total	63 (10,100)	30 (10,100)	34 (10,100)	68 (10,100)	60 (10,100)	46 (10,100)	51 (10,100)	72 (10,100)
Molestias en el sitio de inyección	-	-	-	-	1 (1, 10,0)	-	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)
Eritema del sitio de inyección	11 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)	10 (10,100)
Exfoliación en el sitio de inyección	3 (3, 30,0)	-	-	7 (7, 70,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	7 (7, 70,0)
Induración en el sitio de inyección	12 (10,100)	13 (10,100)	12 (10,100)	13 (10,100)	15 (10,100)	14 (10,100)	11 (10,100)	14 (10,100)
Dolor en el sitio de inyección	3 (3, 30,0)	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	2 (2, 20,0)	-	4 (4, 40,0)
Prurito en el sitio de inyección	7 (7, 70,0)	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)	7 (7, 70,0)	7 (7, 70,0)	4 (3, 30,0)	6 (5, 50,0)	7 (7, 70,0)
Costra en el sitio de inyección	9 (6, 60,0)	1 (1, 10,0)	2 (2, 20,0)	9 (8, 80,0)	6 (5, 50,0)	5 (4, 40,0)	8 (7, 70,0)	9 (8, 80,0)
Inflamación en el sitio de inyección	11 (8, 80,0)	2 (2, 20,0)	4 (4, 40,0)	13 (8, 80,0)	10 (6, 60,0)	5 (4, 40,0)	8 (6, 60,0)	11 (9, 90,0)
Úlcera en el sitio de inyección	6 (5, 50,0)	1 (1, 10,0)	1 (1, 10,0)	5 (5, 50,0)	4 (4, 40,0)	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)	8 (8, 80,0)
Absceso en el sitio de inyección	-	-	-	-	1 (1, 10,0)	-	2 (2, 20,0)	3 (3, 30,0)
Pústula en el sitio de inyección	1 (1, 10,0)	-	1 (1, 10,0)	3 (3, 30,0)	-	-	-	3 (3, 30,0)

Tratamiento: BCG = 5 x 10E5 CFU BCG (intervalo 2 - 8 x 10E5),

5

10

15

20

Grupo 1 = 5 x 10E3 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E3),

Grupo 2 = 5 x 10E4 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E4),

Grupo 3 = 5 x 10E5 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E5),

En general, el número de sujetos con reacciones locales y la intensidad de la reacción local aumentó con el aumento de la dosis y fueron comparables para los grupos de 5x10⁵ CFU de BCG y VPM1002. Los resultados en sujetos no tratados previamente con BCG y en sujetos preinmunizados con BCG fueron en general similares, no se observó una tendencia clara a una reacción local diferente. Las reacciones locales más prominentes fueron eritema e induración. Se observó eritema en todos los sujetos. El tamaño medio del eritema aumentó con la dosis. El tamaño medio del eritema fue similar después de la vacunación con 5x10⁵ CFU de BCG y de VPM1002. En sujetos que recibieron 5x10⁵ CFU de VPM1002, el tamaño medio del eritema fue consistentemente mayor en sujetos preinmunizados, mientras que en el grupo de BCG el tamaño medio fue mayor en el grupo sujeto sin inmunización previa con BCG.

No se observó una clara relación de dosis para el número de sujetos con induración. El tamaño medio de la induración fue más alto en los grupos de tratamiento, que recibieron 5x10⁵ CFU de BCG o VPM1002. La induración máxima tuvo lugar en los grupos vacunados con 5 x 10⁵ CFU de BCG alrededor del día 3 al 5, que fue más temprano que en los grupos vacunados con 5 x 10⁵ CFU de VPM1002 que mostraron el tamaño máximo en los días 11 a 29. El tamaño de la induración local es una medida de una respuesta inmune celular local. El perfil de tiempo característico en los grupos de VPM1002 difiere del perfil de tiempo en los grupos de BCG, el cual está de acuerdo con los resultados de inmunogenicidad farmacodinámica.

La correlación del tamaño medio de eritema por grupo de tratamiento y día de estudio se muestra en la Figura 1.

La correlación del tamaño medio de induración por grupo de tratamiento y día de estudio se muestra en la Figura 2.

La tolerabilidad global fue evaluada casi siempre como buena (42%) o muy buena (57%) por los sujetos. Sólo 1 sujeto (BCG, sin vacunación previa) calificó la tolerabilidad global como mala en el día 57, pero ya no 6 meses después de la vacunación.

Los resultados de laboratorio no mostraron diferencias clínicamente relevantes relacionadas con el tiempo o la dosis. Algunos sujetos tenían valores por encima del intervalo normal ya en el inicio. El parámetro de la función hepática, especialmente la ALT, aumentó por encima del intervalo normal en algunos sujetos (19 sujetos, 13 sujetos sin tratamiento previo con BCG y 6 sujetos con vacuna previa de BCG). El número de sujetos con valores anormales de ALT después de la vacunación fue mayor en el grupo de sujetos, que no fueron vacunados previamente con BCG y recibieron 5x10⁵ CFU de VPM1002, pero se observaron aumentos más pronunciados en los grupos con dosis inferiores y nunca excedieron el intervalo normal de 6 veces y disminuyeron hasta el final del estudio.

Los signos vitales y los parámetros de ECG no mostraron diferencias relacionadas con el tiempo o la dosis.

No se observaron hallazgos clínicamente relevantes en el examen físico posterior a la vacunación, la ecografía hepática y la radiografía de tórax. Todas las pruebas de oro QuantiFeron fueron negativas.

15. Conclusiones

5

10

30

Farmacodinamia (objetivo secundario del estudio)

- Se cumplió el objetivo secundario del estudio.
- VPM1002 muestra la inmunogenicidad detectada por la estimulación de IFN-γ dependiente de la dosis. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.
 - VPM1002 induce cuantitativa y cualitativamente una respuesta inmune diferente que BCG.
 - VPM1002 tiene un efecto potenciador en un estado inmune ya inducido por BCG.
 - Las células T CD4⁺ multifuncionales se regulan positivamente en todas las cohortes de VPM1002 (5x10⁵ CFU). Los resultados se muestran en la Figura 5.

25 Seguridad (objetivo primario del estudio)

- Se cumplió el objetivo principal del estudio: la vacunación única con VPM1002 hasta 5x10⁵ CFU fue segura y bien tolerada.
- Los eventos adversos considerados como relacionados con el fármaco fueron casi siempre alteraciones del sitio de la inyección. El número de EA aumentó con la dosis y fue similar después de 5x10⁵ CFU de VPM1002 y la vacuna de referencia de 5x10⁵ CFU de BCG.
- El número y la intensidad de las reacciones locales aumentaron con la dosis de VPM1002, a la dosis más alta, la incidencia de reacciones locales fue similar a la observada después de la vacunación con BCG.
- La tolerabilidad global de VPM1002 siempre fue evaluada como buena o muy buena por los sujetos.
- Los resultados de laboratorio, los signos vitales y los resultados de ECG no mostraron diferencias clínicamente relevantes relacionadas con el tiempo o la dosis.

16. En general

El perfil de seguridad de VPM1002 estuvo bien. VPM1002 mostró inmunogenicidad. El perfil inmunogénico de VPM1002 difiere del de la BCG. La relación beneficio-riesgo permite continuar el desarrollo clínico de esta vacuna candidata.

40 Lista de referencias

- 1. World Health Organization (WHO) (2009). WHO Report 2009 Global tuberculosis control-epidemiology, strategy, financing. WHO, Ginebra.
- 2. Andersen P. (2007). Tuberculosis vaccines an update. Nat. Rev. Microbiol. 5, 484-487.
- 3. Mittrucker HW, Steinhoff U, Kohler A, Krause M, Lazar D, Mex P, Miekley D, Kaufmann SH. (2007). Poor correlation between BCG vaccination- induced T cell responses and protection against tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 12434-12439.

- 4. Young D, Dye C. (2006). The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell. 124, 683-687.
- 5. Kaufmann SH. (2007). The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. Nat. Rev. Microbiol. 5, 491-504.
- 6. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. (2005). Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2869-2873.
 - 7. Grade L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D, Bancroft GJ, Reyrat JM, van Soolongen D, Raupach B, Kaufmann SH. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. The Journal of Clinical Investigation 115, 2472-2479.
 - 8. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, Flynn JL, Barnes PF, Southwood S, Celis E, Bloom BR, Modlin RL, Sette A. (2000). Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 12210-12215.
- Winau F, Weber S, Sad S, deDiego J, Locatelli Hoops S, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SHE,
 Schaible UE. (2006). Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. Immunity. 24, 105-117.
 - 10. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. Nat. Med. 9, 1039-1046.
- 20 11. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmensiek V, Russel D, Kaufmann SH. (1998). Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. Proc Natl Acad Sci 95, 5299-5304.
 - 12. Reyrat JM, Berthet FX, Gicquel B., (1995) The urease locus of Mycobacterium tuberculosis and its utilization for the demonstration of allelic exchange in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci USA.92(19):8768-72
- 25 13. 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 U S A. 2007 Mar 27;104(13):5596-601. Epub 2007 Mar 19.
 - 14. Grode et al. (2005) Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. J. Clin. Invest 115: 2472-2479.
- 30 15. Kaufmann S. (2010) Learning from natural infection for rational tuberculosis vaccine design Human vaccines 6(8): 614-618.

Lista de secuencias

- <110> Vakzine Projekt Management GmbH
- <120> Mycobacterium recombinante como vacuna para uso en seres humanos
- 35 <130> 49047P WO
 - <150> US61/384375
 - <151> 2010-09-20
 - <160> 2
 - <170> BISSAP 1.0
- 40 <210> 1

10

- <211> 1881
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <221> fuente

<222> 1..1881

<223> / tipo mol="DNA" /nota="molécula de ácido nucleico recombinante" /organismo="Secuencia artificial"

<220>

<221> source

5 <222> 1..1881

<223> / tipo_mol="DNA" /nota="CDS que comprende un dominio fagolisosomal (211-1722nt) y un codón de parada (1879-1881)" /organismo="Secuencia artificial"

840

<400> 1 60 gcggctgtag tccttccggg cctggtgggg cttgccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg 120 ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcagtctg caaagcaatc cgctgcaaat 180 aaattgcact cagcaggaca aagcacgaaa gatgcatctg cattcaataa agaaaattca 240 atttcatcca tggcaccacc agcatctccg cctgcaagtc ctaagacgcc aatcgaaaag 300 aaacacgcgg atgaaatcga taagtatata caaggattgg attacaataa aaacaatgta 360 ttagtatacc acggagatgc agtgacaaat gtgccgccaa gaaaaggtta caaagatgga 420 aatgaatata ttgttgtgga gaaaaagaag aaatccatca atcaaaataa tgcagacatt 480 caagttgtga atgcaatttc gagcctaacc tatccaggtg ctctcgtaaa agcgaattcg 540 gaattagtag aaaatcaacc agatgttctc cctgtaaaac gtgattcatt aacactcagc 600 attgatttgc caggtatgac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgccactaaa 660 tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgctcaa 720 gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca 780

caattaattg cgaaatttgg tacagcattt aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaac

```
ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagttttaa acaaatttac
                                                                      900
tataacgtga atgttaatga acctacaaga ccttccagat ttttcggcaa agctgttact
                                                                       960
aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctcctgcata tatctcaagt
                                                                     1020
gtggcgtatg gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta
                                                                     1080
aaagctgctt ttgatgctgc cgtaagcgga aaatctgtct caggtgatgt agaactaaca
                                                                     1140
                                                                     1200
aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa
gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact
                                                                     1260
tttaatcgag aaacaccagg agttcccatt gcttatacaa caaacttcct aaaagacaat
                                                                     1320
gaattagctg ttattaaaaa caactcagaa tatattgaaa caacttcaaa agcttataca
                                                                     1380
                                                                      1440
gatggaaaaa ttaacatcga tcactctgga ggatacgttg ctcaattcaa catttcttgg
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa
                                                                     1500
                                                                     1560
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga
aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatggtg gagaacggta
                                                                     1620
attgatgacc ggaacttacc acttgtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg
                                                                     1680
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga
                                                                     1740
                                                                     1800
agtcagggtg atcttaatcc attaattaat gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt
ctttcctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgtta ggcgcggatc cggaattcga
                                                                     1860
agcttatcga tgtcgacgta g
                                                                     1881
```

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..626

10 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS CORRESPONDIENTE CON Nº ID SEC: 1" /organismo="Secuencia artificial"

```
<400> 2
```

```
Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly
            100
                                   105
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
                       135
Val Val Glu Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile
145 150 155 16
Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val
                                    170
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
                     230
                                          235
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
Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys
      275
                     280
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
                     310
                                         315
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
                            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 40
                   390
Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys
405 410 415
                405
                                      410
                                                           415
Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr
                                                      430
           420
                               425
Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn 435 440 445
       435
                           440
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 48
                     470
                                       475
Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
485 490 495
                485
                                     490
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 56
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
Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
  610
                           615
                                                 620
Ser Thr
```

REIVINDICACIONES

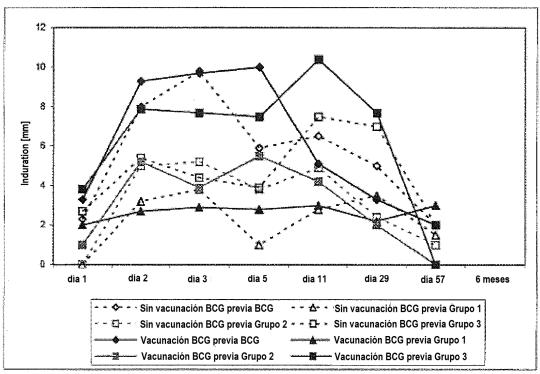
- 1. Una vacuna frente a la tuberculosis para uso en seres humanos que comprende como ingrediente activo una célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante como se representa en el n.º ID SEC 1 que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de Mycobacterium que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 121-153 de n.º ID SEC 1 y (b) un dominio de escape fagolisosómico que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 211-1722 de n.º ID SEC 1.
- 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula de *Mycobacterium bovis* recombinante porta un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo, un gen de resistencia a la higromicina.
- 10 3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula de *Mycobacterium bovis* recombinante no porta un gen de resistencia a antibióticos.
 - 4. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la célula de $Mycobacterium\ bovis$ recombinante se caracteriza como rBCG Δ Urec :: hly+ :: hyg+.
- 5. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es para la administración a un sujeto sin vacunación previa frente a Mycobacterium, por ejemplo, un recién nacido.
 - 6. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es para administración a un sujeto preexpuesto a Mycobacterium.
 - 7. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un liofilizado opcionalmente junto con un fluido de reconstitución.
- 20 8. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende una dosis de aproximadamente 10³-10⁴ CFU, de aproximadamente 10⁴-10⁵ CFU o de aproximadamente 10⁵-10⁶ CFU.
 - 9. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para administración intradérmica.
 - 10. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para administración en una sola dosis o varias dosis.
- 25 11. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para la regulación positiva de células T CD4+ multifuncionales.
 - 12. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para usar en el tratamiento de un sujeto humano frente a la tuberculosis, en donde se administra una dosis farmacéuticamente eficaz de una célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de la cepa Danesa subtipo Praga que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante como se representa en el n.º ID SEC 1 que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de Mycobacterium que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 121-153 de n.º ID SEC 1 y (b) un dominio de escape fagolisosómico que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 211-1722 de n.º ID SEC 1.

35

30

Figura 1

Tamaño medio de eritema por tratamiento en grupo y día de estudio



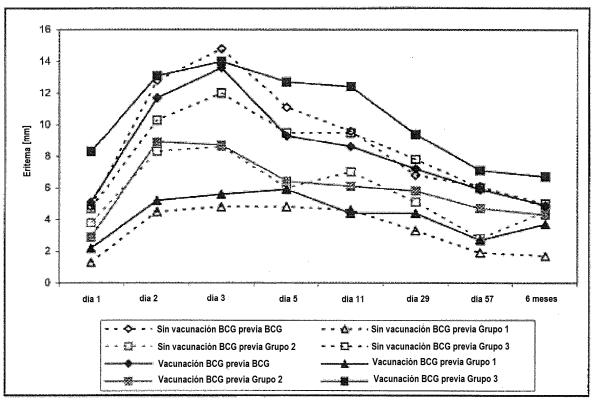
Tratamiento:

BCG = 5 x 10E5 CFU BCG (intervalo 2 - 8 x 10E5),

Grupo 1 = 5 x 10E3 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E3) Grupo 2 = 5 x 10E4 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E4), Grupo 3 = 5 x 10E5 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E5)

Figura 2

Tamaño medio de induración por grupo de tratamiento y día de estudio



Tratamiento:

BCG = 5 x 10E5 CFU BCG (intervalo 2 - 8 x 10E5),

Grupo 1 = 5 x 10E3 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E3) Grupo 2 = 5 x 10E4 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E4),

Grupo 3 = 5 x 10E5 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E5)

Figura 3

Cambios medios desde el inicio para la respuesta de IFN-γ- tras estimulación con Ag85B en sujetos sin vacunación previa

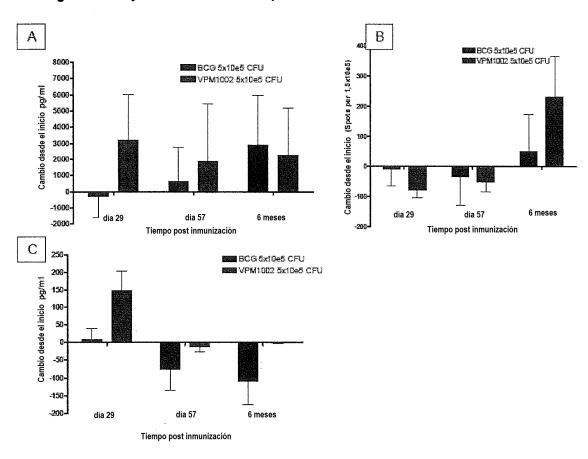


Figura 4

Cambios medios desde el inicio para la respuesta de IFN-γ- tras estimulación con Ag85B en sujetos pre-inmunizados

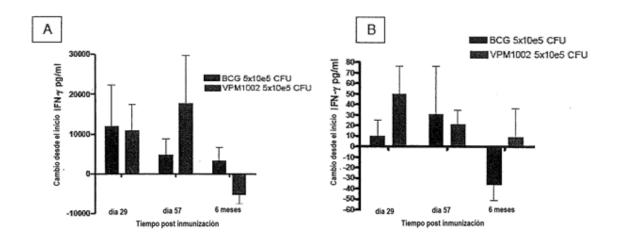


Figura 5

Cambio desde el inicio de células T CD4⁺ multifuncionales en sujetos sin tratamiento previo

