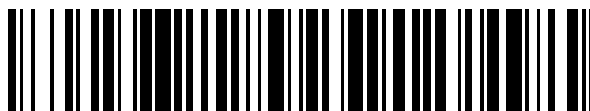


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011** **E 18161921 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3360569**

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

30 Prioridad:

20.09.2010 US 38437510 P

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

25.09.2020

73 Titular/es:

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

**Mellendorfer Str. 9
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

GRODE, LEANDER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 784 451 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

Mycobacterium recombinante como vacuna para uso en seres humanos

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

10 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 TB. Todos corren el riesgo de desarrollar síntomas clínicos de la enfermedad. En la mayoría de las personas, la infección con *Mycobacterium tuberculosis* está contenida inicialmente por las defensas del hospedador, 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
15 (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.

20 BCG (bacilo 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 la TB. 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.

25 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, tales como la *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W⁶.

30 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}.

35 *Mycobacterium tuberculosis* y BCG son fagocitados por los macrófagos del huésped. La localización intrafagosómica 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 de clase I son cruciales en la inmunidad frente a *Mycobacterium tuberculosis*^{8,9}. A diferencia de *Mycobacterium tuberculosis*, el BCG sólo induce una estimulación débil de las células
40 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
45 citoplasma y facilita la presentación cruzada a través del aumento de la apoptosis^{7,9}. Este procedimiento imita la inducción inmunitaria 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 TB.

50 El concepto se ha descrito en los documentos WO 99/10496 y WO 2004/094469, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

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)
55 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.

60 Un objeto de la presente invención es una vacuna para uso en seres humanos que comprende como principio activo una *Mycobacterium* recombinante que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de *Mycobacterium* o un fragmento inmunogénico del mismo y (b) un dominio de escape fagolisosómico.

65 Un objeto adicional de la presente invención es un método para vacunar un sujeto humano, que comprende administrar

una dosis farmacéuticamente eficaz de una *Mycobacterium* recombinante que es deficiente en ureasa y que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un antígeno de *Mycobacterium* o un fragmento inmunogénico del mismo y (b) un dominio de escape fagolisosómico.

- 5 En una realización especialmente preferida, la secuencia ureC se inactiva (Δ Urec), 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.

- 10 La célula es preferiblemente una célula de *M. bovis*, una célula de *M. tuberculosis*, en particular una célula de *M. tuberculosis* atenuada u otras micobacterias, por ejemplo *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* o *M. fortuitum*. Más preferiblemente, la célula es una célula de *M. bovis* recombinante (BCG), en particular una célula de *M. bovis* recombinante de la cepa Danesa del subtipo Praga¹³. Más preferiblemente, la célula es BCG recombinante de la cepa Danesa del subtipo Praga caracterizada como rBCG Δ Urec :: Hly⁺ :: Hyg⁺ (VPM1002).

- 15 La célula de *Mycobacterium* de la invención comprende una molécula de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico en la SEQ ID NO: 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 la SEQ ID NO: 2.

- 25 El dominio capaz de provocar una respuesta inmunitaria se selecciona 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. Son ejemplos específicos de antígenos adecuados Ag85B (p30) de *M. tuberculosis* (Harth *et al.*, 1996), Ag85B (antígeno α) de *M. bovis* BCG (Matsuo *et al.*, 1988), Ag85A de *M. tuberculosis* (Huygen *et al.*, 1996) y ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Sorensen *et al.*, 1996, Harboe *et al.*, 1996 y Andersen *et al.*, 1995). Más preferiblemente, el dominio inmunogénico procede del antígeno Ag85B. Más preferiblemente, el dominio inmunogénico comprende la secuencia desde aa.41 hasta aa.51 en la SEQ ID NO: 2.

- 30 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. Preferiblemente, el dominio de escape fagolisosómico es un dominio de escape fagolisosómico de *Listeria*, que se describe en el documento US 5.733.151, incorporado en el presente documento por referencia.
- 35 Más preferiblemente, el dominio de escape fagolisosómico está codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de: (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende los nucleótidos 211 - 1722 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de (a), y (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de (a) o (b).

- 40 Aparte de la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: 1, la presente invención también comprende secuencias de nucleótidos que hibridan con la misma. En la presente invención, el término "hibridación" se usa como se define en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1101-1104). De acuerdo con la presente invención, el término "hibridación" se usa si aún puede observarse una señal de hibridación positiva después de lavar durante una hora con SSC 1X y SDS al 0,1 % a 55 °C, preferiblemente a 62 °C y más preferiblemente a 68 °C, en particular durante 1 hora en SSC 0,2X y SDS al 0,1 % a 55 °C, preferiblemente a 62 °C y más preferiblemente a 68 °C. Una secuencia que hibrida con una secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 en dichas condiciones de lavado es una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de escape fagolisosómico preferida por la invención objeto.

- 50 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.

- 55 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 la SEQ ID NO: 1 de los nucleótidos 1 a 120.

- 60 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 la SEQ ID NO: 1 de los nucleótidos 154 a 210 o una secuencia correspondiente a la misma con respecto a la degradación del código genético.

- 65 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 su uso en residentes en zonas endémicas para infecciones por micobacterias, tales como tuberculosis o para su uso en personas en riesgo en zonas no endémicas. La vacuna puede ser para administrar a sujetos sin exposición previa 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 haya 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 para infecciones por micobacterias, tales como tuberculosis, o personas en riesgo en zonas no endémicas. La vacuna es particularmente adecuada para administrar a sujetos con padres, por ejemplo, madres, VIH positivos. La vacuna se puede administrar a sujetos sin exposición previa 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 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 expuestos 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 10^3 - 10^4 UFC (unidades formadoras de colonias), aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC o aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC.

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 expuestos previamente 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* patógenas antes de la administración de la vacuna de la invención. Como alternativa, 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 su uso frente a las infecciones por *Mycobacteria*, más particularmente para su uso 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

Fig. 3: Cambios medios desde la base de referencia para la respuesta de IFN- γ después de estimulación con Ag 85B en sujetos no expuestos previamente.

A. ELISA de PBMC para IFN- γ ,

B. ELISpot,

C. ELISA de sangre completa para IFN- γ .

Todos los ensayos han sido estimulados con 2 μ g/ml de Ag 85B. El VPM1002 (5×10^5) en barras rojas, grupo BCG en barras azules.

Estimulación: 2 μ g/ml de Ag 85B. VPM1002 aumenta la respuesta de IFN- γ .

Figura 4: Cambios medios desde la base de referencia para la respuesta de IFN- γ después de estimulación

con Ag 85B en sujetos preinmunizados

A. ELISA de PBMC para IFN- γ ,

B. ELISA de sangre completa para IFN- γ .

Todos los ensayos han sido estimulados con 2 μ g/ml de Ag 85B. El VPM1002 (5×10^5) en barras rojas, grupo BCG en barras azules.

Estimulación: 2 μ g/ml de Ag 85B. VPM1002 aumenta la respuesta de IFN- γ .

Figura 5: Cambio desde la base de referencia de las células T CD4⁺ únicas y multifuncionales en sujetos no expuestos previamente

A. La frecuencia de células T CD4⁺ únicas positivas (expresión de IFN- γ) reestimulada con PPD
B. La frecuencia de células T CD4 multifuncionales (expresión de IFN- γ e IL-2) reestimulada con Ag85B.

C. La frecuencia de células T CD4 multifuncionales (que expresan IFN- γ , IL-2 y TNF- α) reestimulada con PPD o

D. Reestimulada con Ag85B, se determinó mediante FACS ICS de PBMC de adultos inmunizados con VPM1002 (rojo) o control con BCG (azul).

SEQ ID NO: 1: muestra la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de Mycobacterium 85B y un dominio de escape fagolisosómico de *Listeria*.

SEQ ID NO: 2: muestra la correspondiente secuencia de aminoácidos de la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

Ejemplo

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

La VPM1002 es una vacuna BCG genéticamente modificada derivada de *Mycobacterium bovis* BCG de la cepa Danesa subtipo Praga, caracterizada como rBCG Δ ureC :: Hly⁺ :: Hyg⁺. La VPM1002 estuvo disponible en forma de una torta liofilizada de *Mycobacterium bovis* BCG Δ ureC :: Hly⁺ :: Hyg⁺ viva. Un vial contenía 5×10^6 UFC (intervalo $2-8 \times 10^6$ UFC) 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 VPM1002 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 modificado genéticamente (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.

La VPM1002 se suministró como una torta liofilizada (criodesecada) que se reconstituyó con 1 ml de H₂O (*aqua ad iniectionem*). La concentración después de la reconstitución fue de aproximadamente 5×10^6 UFC. Para la administración de dosis de 5×10^3 y 5×10^4 UFC, la suspensión reconstituida de VPM1002 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

El objetivo principal de este estudio fue investigar la seguridad de dosis únicas de VPM1002.

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 expuestos a bacilo 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.

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

10 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 5×10^5 UFC se consideró segura y bien tolerada. En función de los criterios de valoración secundarios del estudio de inmunogenicidad, se realizó una nueva estimación estadística del tamaño de la muestra. Los resultados de este análisis ($p_1 = 0,0119$) 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.

15 4. Número de sujetos

Se planificó la inclusión de cuarenta (40) sujetos sin exposición previa a 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 vacunación previa con BCG y PPD negativo				Con vacunación previa con BCG o PPD positivo				
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 = 5×10^5 UFC BCG (intervalo 2 - 8×10^5),
 Grupo 1 = 5×10^3 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^3),
 Grupo 2 = 5×10^4 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^4),
 Grupo 3 = 5×10^5 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^5),

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 exposición previa al inicio del estudio.

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

El principio activo de VPM1002 fue *Mycobacterium bovis* rBCGΔureC::Hly⁺::Hyg⁺, liofilizado y normalizado para el número de micobacterias viables (unidades formadoras de colonias (UFC)) por aplicación.

Niveles de dosis: 5×10^3 UFC VPM1002 (intervalo 2- 8×10^3 UFC)
 5×10^4 UFC VPM1002 (intervalo 2- 8×10^4 UFC)
 5×10^5 UFC VPM1002 (intervalo 2- 8×10^5 UFC)

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) equipada 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 dispositivos de punción múltiple.

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 de Dinamarca.

5 Después de la reconstitución, 1 dosis (0,1 ml) contenía:

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

La administración se realizó como se describe para VPM1002.

9. Criterios de evaluación:Parámetros de seguridad:

- incidencia de acontecimientos 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 convencionales (hematología, coagulación, química clínica que incluye 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 del tórax
- 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)- γ por célula
- técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT): número de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que segregan IFN- γ por número total de PBMC
- análisis de sangre completo (WBA): cantidad de IFN- γ por número de linfocitos
- tinción intracelular de citocinas (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. Criterios de valoración del estudio:Criterio de valoración primario:

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.

Criterios de valoración secundarios: 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.

Criterios de valoración exploratorios: 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 ésteres succinimidílicos de diacetato de carboxifluoresceína (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:

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 ($\alpha = 0,05$) 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
- Prueba de X^2 , prueba de t, prueba de U 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 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 media fue de 179,7 cm (entre 177,2 y 181,8 cm), el peso medio fue de 78,8 kg (entre 73,0 y 82,5 kg) y el IMC medio 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.

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 inmunitarias celulares en ambos estratos, los sujetos "sin exposición previa" y "preinmunizados" con BCG.

Todos los datos observados muestran una clara respuesta inmunitaria tipo Th1 provocada por VPM1002. El objetivo inicial del desarrollo de esa cepa de vacuna particular VPM1002 fue aumentar la respuesta inmunitaria mediada por células e inducir respuestas inmunitarias cualitativamente mejores que la BCG. Se pudieron cumplir estos objetivos. Además, también muestra un potencial para vacunación de refuerzo sobre una respuesta inmunitaria preexistente inducida por BCG.

Para la cantidad de IFN- γ y por número de linfocitos (criterios de valoración secundarios 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 medios desde el inicio fueron más altos en el grupo de 5×10^5 UFC VPM1002 y menores en el de 5×10^3 UFC 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 los criterios de valoración secundarios 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 los criterios de valoración exploratorios se observó un efecto considerable sobre la inducción de células T CD4+ multifuncionales en ambos estratos.

Para concluir, VPM1002 provoca una respuesta inmunitaria 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:

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 5×10^5 UFC de VPM1002 fue bien tolerada. No se produjo ningún evento adverso grave (EA).

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.

Todos los sujetos informaron de ADR. Casi todas las reacciones adversas fueron trastornos del sitio de la inyección

(98,0% de todas las ADR).

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 (5×10^5 UFC). También hubo una tendencia a una mayor incidencia de ADR en sujetos con vacunación previa con BCG en comparación con los grupos de tratamiento respectivos sin preinmunización con BCG (239 frente a 204 ADR, respectivamente).

Todos los sujetos experimentaron EA. El número de EA fue similar en los grupos de BCG y 5×10^5 UFC de VPM1002 en sujetos no inmunizados previamente con vacuna BCG (76 y 82 EA, respectivamente) e inferior en los otros 2 grupos (47 EA después de 5×10^3 UFC de VPM1002 y 53 EA después de 5×10^4 UFC de VPM1002). En el grupo de sujetos con vacuna BCG previa, el número de EA fue más alto en el grupo de 5×10^5 UFC de VPM1002 (97 EA), comparado con 72 EA en el grupo BCG y 61 EA en los grupos de 5×10^3 UFC y 5×10^4 UFC de VPM1002.

Dentro del estrato de sujetos sin exposición previa a BCG, las ADR observadas en los grupos de tratamiento que recibieron BCG y VPM1002 en el mismo intervalo de dosis (5×10^5 UFC) 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 ADR fue ligeramente mayor en sujetos que recibieron 5×10^5 UFC de VPM1002 en comparación con 5×10^5 UFC de BCG (78 ADR después de VPM1002 frente a 60 ADR después de BCG). Sin embargo, la intensidad de las ADR 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 grave.

Ningún sujeto abandonó el estudio debido a un EA.

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

Categoría de órgano o sistema	Sin vacunación previa con 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 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)	n = 10 x (y,z%)
Término preferencial								
En general	76 (10, 100)	47 (10, 100)	53 (10, 100)	82 (10, 100)	72 (10, 100)	61 (10, 100)	61 (10, 100)	97 (10, 100)
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración								
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 UFC BCG (intervalo 2 - 8 x 10E5),
 Grupo 1 = 5 x 10E3 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E3),
 Grupo 2 = 5 x 10E4 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8 x 10E4),
 Grupo 3 = 5 x 10E5 UFC 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 UFC de BCG y VPM1002. Los resultados en sujetos no expuestos previamente a 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 UFC de BCG y de VPM1002. En sujetos que recibieron 5x10⁵ UFC de VPM1002, el tamaño medio del eritema fue uniformemente 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 UFC de BCG o VPM1002. La induración máxima tuvo lugar en los grupos vacunados con 5 x 10⁵ UFC de BCG alrededor del día 3 al 5, que fue más temprano que en los grupos vacunados con 5 x 10⁵ UFC 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 inmunitaria 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 exposición previa con BCG y 6 sujetos con vacuna previa de BCG). El número de sujetos con valores anómalos de ALT después de la vacunación fue mayor en el grupo de sujetos, que no fueron expuestos previamente a BCG y recibieron 5×10^5 UFC 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

Farmacodinámica (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 inmunitaria diferente que BCG.
- VPM1002 tiene un efecto potenciador en un estado inmune ya existente, inducido por BCG.
- Las células T CD4⁺ multifuncionales se regulan positivamente en todas las cohortes de VPM1002 (5×10^5 UFC). Los resultados se muestran en la Figura 5.

Seguridad (objetivo primario del estudio)

- Se cumplió el objetivo primario del estudio: la vacunación única con VPM1002 hasta 5×10^5 UFC fue segura y bien tolerada.
- Los eventos adversos considerados como relacionados con el fármaco fueron casi siempre trastornos del sitio de la inyección. El número de EA aumentó con la dosis y fue similar después de 5×10^5 UFC de VPM1002 y la vacuna de referencia de 5×10^5 UFC 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 BCG. La relación beneficio-riesgo permite continuar el desarrollo clínico de esta vacuna candidata.

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.
- 5 7. Grade L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, Mann P, Goosmann C, Bander mann 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-Guérin mutants that secrete listeriolysin. The Journal of Clinical Investigation 115, 2472-2479.
- 10 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.
- 15 9. 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.
- 20 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.
11. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmensiek V, Russel D, Kaufmann SH. (1998). *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. Proc Natl Acad Sci 95, 5299-5304.
- 25 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
- 30 13. Brosch R, Gordon SV, Garnier 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. 27 mar 2007;104(13):5596-601. Epub 19 mar 2007.

Lista de secuencias

- 35 <110> Vakzine Projekt Management GmbH
- <120> *Mycobacterium* recombinante como vacuna para uso en seres humanos
- <130> 49047P EP-WO-1
- 40 <150> US61/384375
- <151> 20-09-2010
- <160> 2
- 45 <170> BiSSAP 1.0
- <210> 1
- <211> 1881
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> fuente
- 55 <222> 1..1881
- <223> / tipo_mol="ADN"
- /nota="molécula de ácido nucleico recombinante"
- /organismo="Secuencia artificial"
- 60 <220>
- <221> source
- <222> 1..1881
- <223> / tipo_mol="ADN"
- /nota="CDS que comprende un dominio fagolisosómico (211-1722nt) y un codón de parada (1879-1881)"
- 65 /organismo="Secuencia artificial"

ES 2 784 451 T3

<400> 1

```

atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca    60
gcggctgtag tccttccggg cctggtgggg cttgccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg    120
ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcagtctg caaagcaatc cgctgcaaatt    180
aaattgcact cagcaggaca aagcagcaaa 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 tatccagggtg ctctcgtaaa agcgaattcg    540
gaattagtag aaaatcaacc agatgttctc cctgtaaaac gtgattcatt aacactcagc    600
attgatttgc caggtagtac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgccactaaa    660
tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgtcaa    720
gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca    780
caattaattg cgaaatttgg tacagcattt aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaac    840
ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagttttta acaaatttac    900
tataacgtga atgttaatga acctacaaga ccttccagat ttttcggcaa agctgttact    960
aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctctgcata tatctcaagt   1020
gtggcgtagt gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta   1080
aaagctgctt ttgatgtgcg cgtaagcgga aaatctgtct caggtagatgt agaactaaca   1140
aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa   1200
gttcaaatca tcgacggcaa cctcgagacg ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact   1260
tttaatcgag aaacaccagg agttcccatt gcttatataa caaacttcct aaaagacaat   1320
gaattagctg ttattaaaaa caactcagaa tatattgaaa caacttcaaa agcttataca   1380
gatggaaaaa ttaacatcga tcactctgga ggatacgttg ctcaattcaa catttcttgg   1440
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa   1500
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga   1560
aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatgggtg gagaacggta   1620
attgatgacc ggaacttacc acttgtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg   1680
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga   1740
agtcaggggtg atcttaatcc attaatattg gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt   1800
ctttcctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgtaa ggccgcggatc cggaattcga   1860
agcttatcga tgtcgacgta g                                     1881

```

5

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..626

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

5 <400> 2

Met	Thr	Asp	Val	Ser	Arg	Lys	Ile	Arg	Ala	Trp	Gly	Arg	Arg	Leu	Met
1				5					10					15	
Ile	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Ala
			20					25						30	
Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Phe	Ser	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Val
		35					40					45			
Glu	Tyr	Leu	Gln	Ser	Ala	Lys	Gln	Ser	Ala	Ala	Asn	Lys	Leu	His	Ser
	50					55					60				
Ala	Gly	Gln	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Glu	Asn	Ser
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Lys	Thr
				85					90					95	

ES 2 784 451 T3

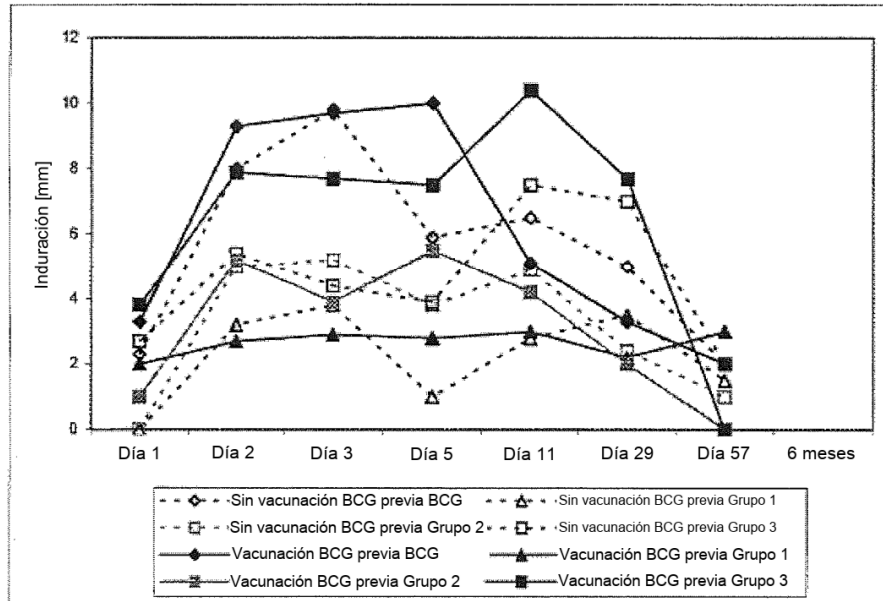
Pro	Ile	Glu	Lys	Lys	His	Ala	Asp	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Gln	Gly	
			100					105					110			
Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Leu	Val	Tyr	His	Gly	Asp	Ala	Val	
		115					120					125				
Thr	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asn	Glu	Tyr	Ile	
		130					135				140					
Val	Val	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn	Ala	Asp	Ile	
		145				150				155					160	
Gln	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Leu	Val	
			165						170					175		
Lys	Ala	Asn	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Pro	Val	
			180					185					190			
Lys	Arg	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Thr	Asn	
		195					200					205				
Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn	Val	Asn	
		210					215				220					
Asn	Ala	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Trp	Asn	Glu	Lys	Tyr	Ala	Gln	
		225			230					235					240	
Ala	Tyr	Pro	Asn	Val	Ser	Ala	Lys	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Glu	Met	Ala	
			245						250					255		
Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Ile	Ala	Lys	Phe	Gly	Thr	Ala	Phe	Lys	Ala	
			260					265						270		
Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Met	Gln	Glu	Glu	Val	Ile	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Val	Asn	
		290				295					300					
Val	Asn	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Lys	Ala	Val	Thr	
		305			310					315					320	
Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Asn	Pro	Pro	Ala	
			325						330					335		
Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	
			340					345					350			
Thr	Asn	Ser	His	Ser	Thr	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Val	
		355					360					365				
Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Ile	Lys	
		370				375					380					
Asn	Ser	Ser	Phe	Lys	Ala	Val	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ala	Lys	Asp	Glu	
		385			390					395					400	
Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Gly	Asn	Leu	Gly	Asp	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Lys	
			405						410					415		
Lys	Gly	Ala	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Thr	Pro	Gly	Val	Pro	Ile	Ala	Tyr	
			420					425					430			
Thr	Thr	Asn	Phe	Leu	Lys	Asp	Asn	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	Lys	Asn	Asn	
		435					440					445				
Ser	Glu	Tyr	Ile	Glu	Thr	Thr	Ser	Lys	Ala	Tyr	Thr	Asp	Gly	Lys	Ile	
		450				455					460					
Asn	Ile	Asp	His	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Gln	Phe	Asn	Ile	Ser	Trp	
		465			470					475					480	
Asp	Glu	Val	Asn	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gly	Asn	Glu	Ile	Val	Gln	His	Lys	
			485						490					495		
Asn	Trp	Ser	Glu	Asn	Asn	Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	His	Phe	Thr	Ser	Ser	
			500					505					510			
Ile	Tyr	Leu	Pro	Gly	Asn	Ala	Arg	Asn	Ile	Asn	Val	Tyr	Ala	Lys	Glu	
		515					520					525				
Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Trp	Glu	Trp	Trp	Arg	Thr	Val	Ile	Asp	Asp	Arg	
		530				535					540					
Asn	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Asn	Arg	Asn	Ile	Ser	Ile	Trp	Gly	Thr	Thr	
		545			550					555					560	
Leu	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asn	Lys	Val	Asp	Asn	Pro	Ile	Glu	Tyr	Ala	
			565						570					575		
Leu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Gln	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro	Leu	Ile	Asn	Glu	Ile	
			580					585					590			
Ser	Lys	Ile	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															
	625															

REIVINDICACIONES

1. 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 que codifica un polipéptido de fusión como se representa en la SEQ ID NO: 1 que comprende:
5
 (a) un antígeno de *Mycobacterium* que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 121-153 de la SEQ ID NO: 1 y
 (b) un dominio de escape fagolisosómico que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los
10 nucleótidos 211-1722 de la SEQ ID NO: 1.
2. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de 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.
- 15 3. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de la reivindicación 1, en donde la célula de *Mycobacterium bovis* recombinante no porta un gen de resistencia a antibióticos.
4. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de la reivindicación 1 o 2, que se caracteriza como rBCG ΔUrec :: Hly+ :: Hyg+.
- 20 5. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso como una vacuna en sujetos humanos.
6. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante para su uso según la reivindicación 5, en donde el sujeto es un sujeto sin exposición previa a *Mycobacterium*, por ejemplo, un recién nacido.
- 25 7. La célula de *Mycobacterium bovis* recombinante para su uso según la reivindicación 5, en donde el sujeto humano es un sujeto preexposto a *Mycobacterium*.

Figura 1

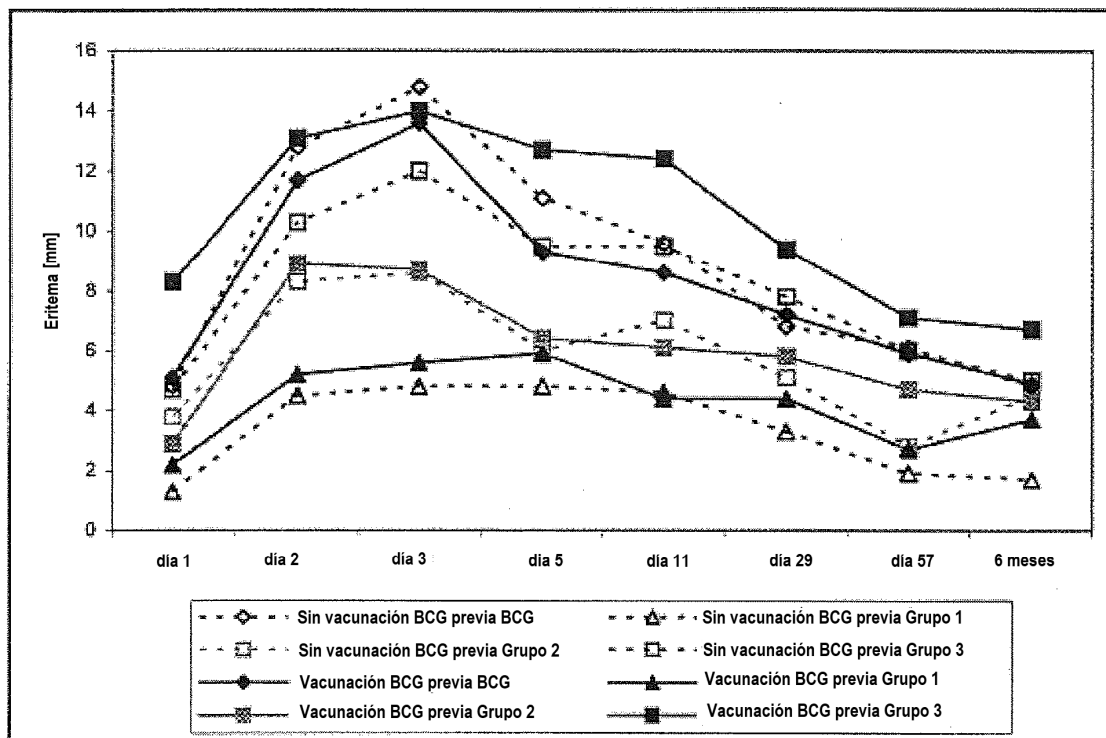
Tamaño medio de eritema por grupo de tratamiento y día de estudio



Tratamiento: BCG = 5×10^5 UFC BCG (intervalo 2 - 8×10^5)
 Grupo 1 = 5×10^3 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^3),
 Grupo 2 = 5×10^4 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^4),
 Grupo 3 = 5×10^5 UFC VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^5).

Figura 2

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



Tratamiento: BCG = 5×10^5 CFU BCG (intervalo 2 - 8×10^5),
 Grupo 1 = 5×10^3 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^3)
 Grupo 2 = 5×10^4 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^4),
 Grupo 3 = 5×10^5 CFU VPM1002 (intervalo 2 - 8×10^5)

Figura 3

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

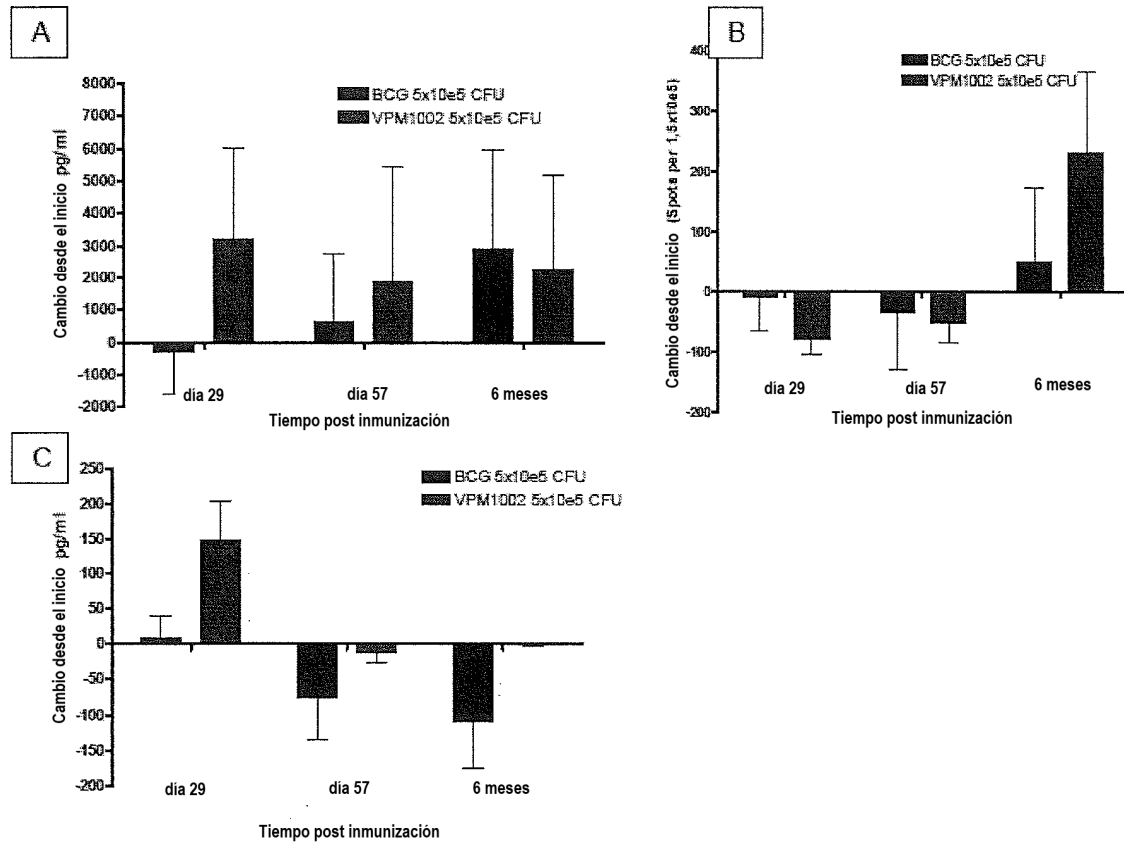


Figura 4

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

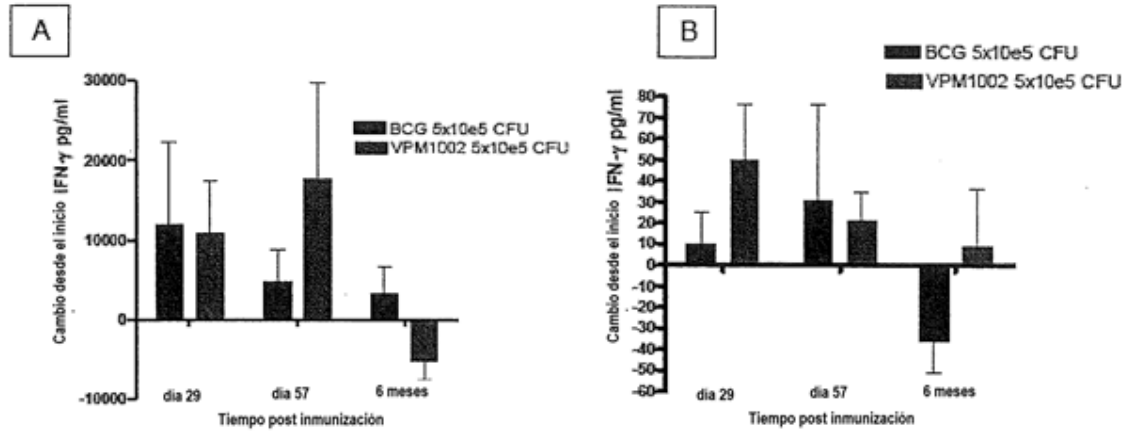


Figura 5

Cambios desde el inicio de células T CD4⁺ multifuncionales en sujetos sin exposición previa

