



(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 345 604**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)**A61K 39/04** (2006.01)**A61P 31/06** (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)**A61P 33/06** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01965468 .0**(96) Fecha de presentación : **13.09.2001**(97) Número de publicación de la solicitud: **1320379**(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

(54) Título: **Uso del vector virus pox carente de replica para impulsar la respuesta inmune de célula T CD4+ al antígeno.**

(30) Prioridad: **21.09.2000 GB 0023203**

(73) Titular/es: **OXFORD BIOMEDICA (UK) Ltd.
Medawar Center, Robert Robinson Avenue
Oxford Science Park
Oxford OX4 4GA, GB**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2010

(72) Inventor/es: **Hill, Adrian, V. S.;
McShane, Helen;
Gilbert, Sarah;
Reece, William y
Schneider, Joerg**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2010

(74) Agente: **Izquierdo Faces, José**

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

Uso del vector virus pox carente de replica para impulsar la respuesta inmune de célula T CD4+ al antígeno.

5 La presente invención hace referencia a un método para inducir una respuesta de célula T CD4+ contra un antígeno objetivo usando una composición que contiene una fuente de epítopos de célula T CD4+.

Antecedentes

10 Aunque las vacunas con subunidades que provocan fuertes respuestas de anticuerpos llevan en el mercado varios años, ha resultado más difícil diseñar vacunas que estimulen el grupo celular del sistema inmune para producir fuertes respuestas protectoras de linfocito T.

15 Se ha prestado mucha atención a la producción de células T CD8+ que pueden ser citolíticas y han demostrado proteger contra algunas infecciones virales. A diferencia de ellas, las células T CD4+ han sido consideradas hasta hace poco como células T ayudantes que juegan un papel al ayudar a otros inmunecitos a generar protección, por ejemplo, amplificando las respuestas del anticuerpo.

20 Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las células T CD4+ también pueden ser células efectoras que juegan un papel más directo en la protección. Por ejemplo, en el caso de la tuberculosis, malaria y la infección *H. pylori*, existen pruebas del papel protector de T CD4+ ya que segregan la citoquina, interferón gamma.

25 Existe por lo tanto la necesidad de desarrollar vacunas que sean capaces de estimular una respuesta efectiva de la célula T CD4+. Se sabe que los virus pox son buenos inductores de respuestas de célula T CD8 debido a su expresión intracitoplásmica. Sin embargo, se cree que son pobres a la hora de generar células T restringidas CD4 MHC clase II (ver por ejemplo, Haslett *et al.* Journal of Infectious Diseases 181:1264-72 (2000), página 1268).

Tuberculosis

30 Más de cien años después de que Koch descubriera el organismo causante, la tuberculosis continúa siendo un gran problema en la salud pública global. Se estima que hay 8-10 millones de nuevos casos por año y la mortalidad anual es de 3 millones aproximadamente. La variabilidad en la eficacia protectora de la vacuna actualmente disponible, *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin (BCG) [1], y la llegada de cepas resistentes a multifármacos de la tuberculosis indican que existe una necesidad urgente de una vacuna mejor.

35 *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular y la respuesta inmune predominante implica el grupo celular del sistema inmune. Existen sólidas pruebas a partir de estudios con animales y humanos que demuestran que las células T CD4+ no son necesarias para el desarrollo de inmunidad protectora [2,3]. Existen también pruebas sobre el papel que pueden jugar las células T CD8+ [4,5].

40 Las vacunas de ADN provocan respuestas celulares inmunes, provocando tanto células T CD4+ como T CD8+, y por lo tanto representan un prometedor sistema de envío para una vacuna contra la tuberculosis. Una serie de estudios que examinan la eficacia protectora de vacunas de ADN codificadoras de una variedad de antígenos de *M. tuberculosis* han demostrado una protección parcial contra el rival que es equivalente a la protección conferida por BCG [6,7]. Sin embargo, ninguna de las vacunas candidatas testadas hasta el momento ha demostrado ser consistentemente superior a BCG. Aunque las vacunas de ADN son buenas al provocar células T CD4+ y T CD8+, puede que la frecuencia de células con respuesta que producen necesite ser significativamente superior con el fin de conferir protección contra el rival.

50 Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas alternativas y mejoradas capaces de inducir una respuesta celular T CD4+, opcionalmente en conjunto con una respuesta celular T CD8+ para conseguir protección contra enfermedades tales como la tuberculosis.

55 WO 98/56919 describió un método para generar una respuesta inmune de células T CD4+ contra la malaria y otras enfermedades, administrando una composición de preparación que contenía epítopo de célula T CD8+ seguido de una composición de estimulación que contenía vector virus pox no replicante y afectado por la réplica que transportaba al menos un epítopo de célula T CD8+ que fue igual al epítopo de la composición de preparación.

60 Ramshaw & Ramsay (Immunology Today 21(4): 163-165 2000) describieron los regímenes “preparación-estimulación” para generar respuestas inmunes contra virus que incluían VIH y gripe, que consistían en una preparación con vacuna de ADN y una estimulación con un vector viral.

65 Jonson *et al.* (J. Virology 68(5): 3145-3153 1994) describieron la generación de respuestas inmunes de células T CD4+ y T CD8+ contra VIH usando una inmunización primaria con un virus en vacuna recombinante que expresaba gp160 y a continuación una inmunización impulsora con gp160 recombinante, y presentaron la identificación de epítopos CD8+ CTL a partir de regiones conservadas de gp120.

Resumen de la invención

La presente invención ha demostrado ahora que los virus pox defectuosos de réplica son capaces de provocar células T CD4+ efectivas que son protectoras. Usando ensayos ELISPOT para interferón-gamma con la reducción o disminución del subconjunto celular han probado que estas células efectivas T CD4+ se producen de manera adecuada tanto en ratones como en humanos tras la inmunización. El uso de regímenes heterólogos preparación-estimulación con virus pox defectuosos de réplica produce sólidas respuestas de celulares de T CD4.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de:

- (a) una primera composición que contiene una fuente de uno o más epítopos de células T CD4+ de un antígeno de tuberculosis; y
- (b) una segunda composición que contiene una fuente de uno o más epítopos de células T CD4+ del antígeno de tuberculosis, incluyendo al menos un epítopo de célula T CD4+ que es igual al epítopo de célula T CD4+ de la primera composición,

donde la fuente de epítopos de célula T en la primera composición no es un vector virus pox,

donde la fuente de los epítopes CD4+ para la segunda composición es un vector virus pox recombinante no replicante o defectuoso en la réplica,

para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta celular T CD4+ del tipo $T_H 1$ contra un antígeno de tuberculosis, donde las dosis de la primera y la segunda composición pueden administrarse en cualquier orden.

Si el vector también proporciona una fuente de epítopos de células T CD8+ el método de la presente invención puede inducir una respuesta combinada de células T CD4+/CD8+.

Si la fuente de epítopos en (a) es un vector viral, el vector viral en (b) se deriva de un virus diferente.

La primera y segunda composición empleada en el método de la presente invención puede proporcionarse de manera conveniente en forma de un kit.

Además de los regímenes heterólogos preparación-estimulación, la presente invención ha demostrado que los virus pox defectuosos de réplica son capaces de actuar como agentes estimuladores para respuestas celulares T CD4+ pre-existentes. Por lo tanto, la presente invención también proporciona el uso de una fuente de uno o más epítopos de célula T CD4+de un antígeno de tuberculosis, donde la fuente es un vector virus pox recombinante no replicante o con la réplica afectada, en la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmune celular T CD4+ del tipo $T_H 1$ preparada.

La capacidad de los vectores de pox virus recombinantes afectados en la réplica para inducir tales respuestas celulares funcionales T CD4+, tanto cuando se usan solos como en combinaciones preparación-estimulación, y tanto en animales como en el hombre, ha extendido la utilidad de vacunas profilácticas y terapéuticas.

45 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Un gráfico para mostrar la eficacia de varios regímenes de inmunización después de 8 semanas. Los datos representan el error medio y estándar de 7-15 ratones/grupo.

Figura 2: Un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de liberación ^{51}Cr realizado sobre los esplenocitos de ratones en el grupo DDDM

Figura 3: Un gráfico que compara la protección de los regímenes heterólogos y homólogos contra el rival. La media CFU cómputo/órgano se tomó a las 8 semanas. *, p < 0.05; **, p < 0.01 cuando se comparó con el grupo de control sin experiencia previa en tratamiento.

Descripción detallada de la invención

60 Respuestas inmunes CD4+/CD8+

Las células T se clasifican en dos principales grupos que se distinguen por su expresión de moléculas co-receptoras de CD4 o CD8. Las células T que expresan CD8 también son conocidas como células T citotóxicas en virtud de su capacidad para matar células infectadas. Las células T que expresan CD4, por otro lado, han estado implicadas principalmente en respuestas inmunes “ayudando” o “induciendo”.

65 La naturaleza de la respuesta inmune celular T puede caracterizarse en virtud de la expresión de los marcadores superficiales celulares sobre las células. En general, las células T pueden detectarse por la presencia de TCR, CD3, CD2, CD28, CD5 o CD7 (solamente humanas). Las células T CD4+ y células T CD8+ pueden distinguirse por su

ES 2 345 604 T3

expresión co-receptora (por ejemplo, usando anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti-CD8, tal y como se describe en los Ejemplos).

Debido a que las células T CD4+ reconocen antígenos cuando se representan por moléculas MHC clase II, y CD8+ 5 reconocen antígenos cuando se representan por moléculas MHC clase I, las células T CD4+ y CD8+ también pueden distinguirse en base al antígeno que presenta células con las que reaccionarán.

Dentro de un antígeno objetivo particular, puede haber más de un epítopo de célula T CD4+ y más de un epítopo de 10 célula T CD8+. Si el epítopo particular ya se ha caracterizado, éste puede usarse para distinguir entre los dos subtipos de célula T, por ejemplo en base a la estimulación específica del subconjunto de célula T que reconoce el epítopo particular.

Las células T CD4+ también pueden subdividirse en base a su perfil de secreción de citoquina. El subconjunto T_{H1} 15 (en algunas ocasiones conocido como “células T CD4 inflamatorias”) de manera característica segregá $IL-2$ y $IFN\gamma$ y media varias funciones asociadas con la citotoxicidad y con las reacciones inflamatorias locales. Las células T_{H1} son capaces de activar macrófagos que llevan a la inmunidad mediada por la célula. El subconjunto T_{H2} (en algunas 20 ocasiones conocido como “células T CD4 ayudantes”) de manera característica segregá $IL-4$, $IL-5$, $IL-6$ y $IL-10$, y se cree que tiene un papel en la estimulación de células B para proliferar y producir anticuerpos (inmunidad humoral).

Las células T_{H1} y T_{H2} también tienen expresión característica de moléculas efectoras. Las células T_{H1} que expresan 25 TNF unido a la membrana y las células T_{H2} que expresan ligando $CD40$ que se enlaza con $CD40$ en la célula B.

La respuesta celular T CD4+ inducida por el método de la presente invención es una respuesta del tipo TH1. Preferiblemente, las células T CD4+ inducidas son capaces de segregar $IFN\gamma$.

La inducción de respuesta inmune de CD4+ o CD8+ provocará un aumento en el número del tipo de célula T relevante. Esto puede detectarse controlando el número de células, o con un cambio en la población celular total para reflejar una proporción creciente de células T CD4+ o CD8+. El número de células de un tipo particular puede controlarse directamente (por ejemplo, mediante tinción usando un anticuerpo anti-CD4/CD8, y a continuación mediante 30 análisis con escaneo celular activado por fluorescencia (escáner FACS) o indirectamente controlando la producción de, por ejemplo, una citoquina característica. En los Ejemplos, la presencia de células T CD4+ se controla en base a su capacidad para segregar $IFN\gamma$, en respuesta a un péptido específico, usando un ensayo ELISPOT. Las respuestas celulares de CD4 y CD8 se distinguen de manera sencilla en ensayos ELISPOT mediante una reducción específica de uno u otro subconjunto de células T usando anticuerpos apropiados. Las respuestas celulares de CD4 y CD8 también 35 se distinguen de manera sencilla mediante análisis FACS (clasificador celular activado por fluorescencia).

Epítopos de células T CD4+/CD8+

Un epítopo celular T es un péptido corto que puede derivarse de un antígeno de proteína. Las células que presentan 40 antígenos pueden internalizar el antígeno y procesarlo en fragmentos cortos que son capaces de enlazarse con moléculas MHC. La especificidad del péptido que se enlaza con MHC depende de las interacciones específicas entre el péptido y de la ranura que se enlaza con el péptido de la molécula MHC particular.

Los péptidos que se enlanzan con moléculas MHC clase I (y que son reconocidos por células T CD8+) tienen 45 normalmente entre 6 y 12, más normalmente entre 8 y 10 aminoácidos en longitud. El grupo amino con terminal en amino del péptido entra en contacto con un punto invariante en un extremo de la ranura del péptido, el grupo carboxilato en el término de carboxi se enlaza con un punto invariante en el otro extremo de la ranura. El péptido se encuentra en una confirmación extendida a lo largo de la ranura con un contacto adicional entre los átomos de la cadena principal y las cadenas laterales de aminoácidos conservados que están en línea en la ranura. Las variaciones 50 en la longitud del péptido se adaptan mediante un giro en el eje del péptido, a menudo en prolina o residuos de glicina.

Los péptidos que se enlanzan con moléculas MHC clase II tienen normalmente 10 aminoácidos, más normalmente 13 aminoácidos en longitud, y pueden ser mucho más largas. Estos péptidos se encuentran en una confirmación extendida a lo largo de la ranura que se enlaza con el péptido MHC II que está abierta en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente por el átomo de la cadena principal que entra en contacto con residuos conservados que se encuentran en línea en la ranura que se enlaza con el péptido.

Para un antígeno en concreto, los epítopos CD4+ y CD8+ pueden caracterizarse por varios métodos conocidos en la técnica. Cuando los péptidos se purifican de células, sus péptidos unidos se purifican con ellas. Por lo tanto, los 60 péptidos pueden eluirse de moléculas MHC por medio de una desnaturización del complejo en ácido, liberando el péptido unido, que puede purificarse (por ejemplo mediante HPLC) y quizás secuenciarse.

El péptido enlazado con muchas moléculas MHC de clase I y II se ha analizado mediante elución de péptidos unidos y mediante cristalografía con rayos X. A partir de la secuencia de antígeno objetivo, es posible predecir, hasta 65 un grado, dónde los péptidos de Clase I y Clase II pueden encontrarse. Esto es particularmente posible para péptidos MHC de clase I, porque los péptidos que se enlanzan con una variante alélica determinada de una molécula MHC de clase I tienen los mismos residuos de aminoácidos o muy similares en dos o tres posiciones específicas a lo largo de la secuencia del péptido, conocidos como residuos ancla.

ES 2 345 604 T3

Así mismo, es posible dilucidar epítopos CD4+/CD8+ usando la superposición de bibliotecas de péptidos que abarcan la longitud el antígeno objetivo. Mediante el análisis de la capacidad de tal biblioteca para estimular células T CD4+/CD8+, es posible determinar qué péptidos son capaces de actuar como epítopos celulares T. en los ejemplos, una biblioteca de péptidos para dos antígenos de *M. tuberculosis* se analizan un ensayo ELISPOT.

5

Fuentes de epítopos de células T

Los epítopos de células T CD4+ y opcionalmente CD8+ presentes en las composiciones o codificados por ellas pueden proporcionarse en varias formas diferentes; como una cinta de uno o dos o más epítopos, o en el contexto del antígeno objetivo nativo, o una combinación de estos dos. Los epítopos de células T CD4+ y CD8+ han sido identificado y pueden encontrarse en la bibliografía para muchas enfermedades diferentes. Es posible designar cadenas de epítopos para generar una respuesta de célula T CD4+ y/o CD8+ contra cualquier antígeno elegido que contenga tales epítopos. De manera ventajosa, los epítopos en una cadena de múltiples epítopos se unen juntos sin la intervención de secuencias de modo que se evita el ácido nucleico innecesario y/o el material de aminoácido. Además de los epítopos de célula T CD4+ procedentes del antígeno objetivo, puede resultar preferible incluir uno o más epítopos adicionales reconocidos por las células ayudantes T, para aumentar la respuesta inmune generada por la cadena de epítopos. De manera particular, los epítopos celulares ayudantes T son aquellos que están activos en individuos de diferentes tipos HLA, por ejemplo epítopos ayudantes T del tétano (contra el que la mayoría de los individuos ya estará preparada).

20

Preferiblemente, la fuente de epítopos de célula T CD4+ (y opcionalmente CD8+) en la primera composición en el método de acuerdo con la invención es un vector no-viral o un vector viral no replicante o con la réplica afectada, a pesar de que los vectores virales replicantes pueden usarse.

25

La fuente de epítopos de células T en la primera composición no es un vector de virus pox, por lo que hay una mínima reactividad cruzada entre la primera y la segunda composición.

30

Alternativas de vectores virales preferentes para uso en la primera composición de acuerdo con la invención incluyen una variedad de virus diferentes, genéticamente discapacitados de modo que son no replicantes o con tienen la réplica afectada. Tales virus incluyen por ejemplo adenovirus no replicantes como los mutantes de eliminación. La discapacitación genética de los virus para producir vectores no replicantes o con la réplica afectada es bien conocida.

35

Otros vectores virales adecuados para usar en la primera composición son los vectores basados en el virus del herpes y el virus de encefalitis equina venezolana (EEV). Vectores bacterianos adecuados para la primera composición incluyen BCG recombinante y *Salmonella* recombinantes y *Salmonella* transformada con ADN plásmido (Darji A *et al* 1997 Cell 91: 765-775).

40

Adecuados vectores no-virales alternativos para uso en la composición de preparación incluyen péptidos con extremo de lípido conocidos como lipopéptidos, péptidos fusionados con proteínas portadoras como KLH bien como proteínas de fusión o mediante unión química, antígenos enteros con adyuvantes, y otros sistemas similares.

45

En una realización preferente de la invención, la fuente de epítopos celulares T en la primera composición es un ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN, en particular un plásmido recombinante de ADN. El ADN o ARN puede estar empaquetado, por ejemplo en un lisosoma, o puede estar en forma libre.

50

En otra realización preferente de la invención, la fuente de epítopos celulares T en la primera composición es un péptido, polipéptido, proteína, poliproteína o partícula formada por dos o más epítopos de célula T CD4+ o, presentes en una cadena recombinante de epítopos de célula T CD4+ o en un antígeno objetivo. Las poliproteínas incluyen dos o más proteínas que pueden ser iguales, o preferiblemente diferentes, unidas. Preferiblemente, los epítopos en o codificados por la primera o segunda composición se facilitan en una secuencia que no ocurre de manera natural como el producto expresado de un gen en el organismo parenteral del cual el antígeno objetivo puede derivarse.

55

Preferiblemente, la fuente de epítopos celulares T en la segunda composición es un vector de virus de vacunas como MVA o NYVAC. Más preferiblemente, es el virus modificado de la cepa de vaccinia Ankara (MVA) o una cepa derivada del mismo (más adelante se proporcionan más detalles de MVA). Las alternativas a los vectores de vaccinia incluyen vectores avipox como los vectores de la viruela aviar y viruela del canario. En particular, la cepa más adecuada como vector avipox es una cepa de la viruela del canario conocida como ALVAC (disponible en el mercado como Kanapox), y cepas derivadas de las mismas.

60

Vectores poxvirus

En la “segunda” composición usada en el método de la presente invención la fuente de epítopos CD4+ (y opcionalmente CD8+) es un vector de virus pox recombinante no replicante o con la réplica afectada.

65

El término “no replicante” o “de réplica afectada” tal y como aquí se emplea significa que no es capaz de replicarse hasta una medida significativa en la mayoría de las células normales de los mamíferos o células normales humanas. Los virus que son no replicantes o que tienen la réplica afectada pueden transformarse en ello de manera natural (es decir, pueden aislarse como tales de la naturaleza) o de manera artificial, por ejemplo, mediante reproducción *in*

ES 2 345 604 T3

vitro o mediante manipulación genética, por ejemplo mediante la eliminación de un gen que es crucial para la réplica. Generalmente, habrá uno o unos pocos tipos de células en lo que los virus pueden crecer, como las células CEF para MVA.

5 La réplica de un virus se mide generalmente de dos maneras: 1) síntesis de ADN y 2) título viral. Con más precisión, el término “no replicante o con la réplica afectada” tal y como aquí se emplea y aplicado a virus pox significa virus que satisfacen uno o ambos de los siguientes criterios:

- 10 1) Muestran una reducción 1 log (10 veces) en la síntesis de ADN en comparación con la cepa de Copenhague del virus vaccinia en células MCR-5 (una línea celular humana);
- 15 2) Muestran una reducción 2 log en el título viral en células HE LA (una línea celular humana) en comparación con la cepa Copenhague del virus vaccinia.

15 Ejemplos de virus pox que cumplen esta definición son MVA, NYVAC y virus avipox, mientras que un virus que no entra dentro de esta definición es la cepa atenuada de vaccinia M7.

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) es una cepa del virus vaccinia que no se replica en la mayoría de las células, incluyendo tejidos humanos normales. MVA se derivó mediante un paso en serie > 500 veces en fibroblastos 20 de embriones de pollitos (CEF) de material derivado de una lesión de viruela en un caballo en Ankara, Turquía (Mayr *et al.*, Infection (1975) 33: 6-14). Se demostró que aunque era defectuoso en la réplica aún era capaz de inducir inmunidad protectora contra infecciones veterinarias de virus de pox. MVA se usó como vacuna en humanos en las fases finales en la campaña de erradicación de viruela, y se administró por vía intravenosa, subcutánea e intramuscular 25 a < 120.000 sujetos en el sur de Alemania. No se registraron importantes efectos secundarios, a pesar de tener como objetivo deliberado la vacunación de grupos de alto riesgo como aquellos con eczema (Mayr *et al.*, Bakteriol B. (1978) 167:375-90).

La seguridad de MVA refleja la avirulencia del virus en modelos animales, incluyendo ratones irradiados y tras la administración intracranal a ratones neonatales. La capacidad de no replicarse de MVA se ha correlacionado con 30 la producción de placas blancas proliferativas en la membrana corioalantoidea de pollitos, la infección de células no aviares y la presencia de seis eliminaciones genómicas que se elevan a un total de 30 kb. La avirulencia de MVA se ha atribuido parcialmente a las eliminaciones o supresiones que afectan a los genes del rango huésped K1 L y C7L, aunque réplicas virales limitadas aún se siguen dando en células humanas TK-143 y en las células CV-1 del Mono Verde Africano. El restablecimiento del gen K1 L solamente restablece parcialmente el rango huésped de MVA. La 35 restricción en el rango huésped parece ocurrir durante la maduración de la partícula viral, y solamente se observan viriones inmaduros en las células humanas HeLa en un microscopio de electrón (Sutter *et al.* 1992). El bloqueo tardío en la réplica viral no evita la expresión eficiente de genes recombinantes en MVA.

Los virus de pox han desarrollado estrategias para la evasión de la respuesta huésped inmune que incluyen la 40 producción de proteínas segregadas que funcionan como receptores solubles para el factor de necrosis tumoral, IL-I p, interferón (IFN)-oc/y IFN-y, que normalmente tienen una secuencia similar al dominio extracelular de receptores celulares de citoquina (como los receptores de quimioquinas).

Estos receptores virales generalmente inhiben o trastocan un respuesta inmune apropiada del huésped, y su presencia se asocia con una mayor patogenicidad. El receptor IL-I pesa una excepción: su presencia disminuye la respuesta febril del huésped y aumenta la supervivencia del huésped frente a una infección. MVA carece de receptores funcionales de citoquina para interferón y, interferón ap, Factor de Necrosis Tumoral y quimioquinas CC, pero posee el 50 potencialmente beneficioso receptor IL-1. MVA es la única cepa conocida de vaccinia que posee este perfil de receptor de citoquina, que teóricamente es más seguro y más inmunogénico que otros virus pox. Otra cepa segura y con la réplica afectada de vaccinia conocida como NYVAC se describe con detalle en Tartaglia *et al.* (Virology 1992, 188: 217-232).

Los genomas de virus pox pueden transportar una gran cantidad de información genética heteróloga. Otros requisitos para los vectores virales en uso en vacunas incluyen una buena inmunogenicidad y seguridad. En una realización, 55 el vector de virus pox puede ser un vector de viruela aviar, un derivado del mismo.

Resultará evidente que las cepas del virus vaccinia derivadas de MVA, o cepas independientemente desarrolladas que tiene las características de MVA que hacen que MVA sea particularmente útil para uso en una vacuna, también resultar adecuadas para su uso en la invención.

60 MVA que contiene una cadena insertada de epítropos se ha descrito previamente en WO 98/56919.

Estrategias de vacunación

65 Los presentes inventores han mostrado que los virus pox con réplica defectuosa son capaces de inducir células T CD4 efectoras (opcionalmente con células T CD8+) cuando se usan en regímenes heterólogos de preparación-estimulación.

ES 2 345 604 T3

De manera sorprendente, se obtuvieron respuestas sólidas usando un régimen heterólogo de inmunización con la primera y segunda composición en cualquier orden. Se observó una respuesta ligeramente más sólida con la segunda composición cuando se administró tras la primera, en lugar de al revés. Al menos, se puede administrar una dosis de la primera composición y a continuación una dosis de la segunda composición.

5 Pueden administrarse varias dosis de la primera composición y a continuación una dosis de la segunda composición.

10 Se ha descubierto un protocolo de inmunización particularmente efectivo cuando se administran tres dosis secuenciales de la primera composición, y a continuación se administra una dosis de la segunda composición.

La frecuencia de las dosis individuales dependerá del individuo (ver "Administración" a continuación) pero comúnmente habrá entre una y seis semanas entre una y otra, normalmente tres semanas.

15 *Antígenos objetivo*

El antígeno objetivo en la presente invención es un antígeno de tuberculosis. Puede ser un antígeno que es reconocido por el sistema inmune tras la infección de la enfermedad. De manera alternativa, el antígeno puede ser normalmente "invisible" para el sistema inmune de modo que el método induce una respuesta celular T no fisiológica. Este hecho 20 puede resultar de ayuda en enfermedades donde la respuesta inmune provocada por la enfermedad no es efectiva (por ejemplo, no tiene éxito en la eliminación de la infección) ya que puede abrir otra línea de ataque.

En una realización preferente de la invención, el antígeno se deriva de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, el antígeno 25 puede ser ESAT6 o MPT63.

25 Las composiciones de la presente invención pueden estar formadas por epítopes de células T procedentes de más de uno antígeno (ver anteriormente en "epítopes"). Por ejemplo, la composición puede estar formada por uno o más epítopes de célula T de dos o más antígenos asociados a la misma enfermedad. Los dos o más antígenos pueden derivarse del mismo organismo patogénico.

30 De manera alternativa, la composición puede estar formada por epítopes de una variedad de fuentes. Por ejemplo, el implante de ME-TRAP descrito en los ejemplos contiene epítopes celulares T de *P. falciparum*, toxoide de tétanos, *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

35 *Enfermedades Objetivo*

La presente invención será útil en la prevención de tuberculosis.

La presente invención es particularmente útil en estrategias de vacunación en la protección contra tuberculosis.

40 Las composiciones aquí descritas pueden emplearse como vacunas terapéuticas o profilácticas.

Kits

45 La primera y la segunda composición usadas en el método de la invención pueden proporcionarse de manera sencilla en forma de una "preparación combinada" o kit. La primera y segunda composición pueden empaquetarse juntas o de manera individual para su venta por separado. La primera y segunda composición pueden usarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente para inducir una respuesta celular T CD4+ contra un antígeno objetivo.

50 El kit puede estar formado por otro componentes para mezclarse con una o con ambas composiciones antes de la administración (como diluyentes, portadores, adyuvantes, etc, ver a continuación).

El kit puede además contener instrucciones escritas que concierne el protocolo de la vacunación.

55 *Composiciones farmacéuticas/Vacunas*

Un medicamento para estimular una respuesta preparada de célula T CD4+ puede tener la forma de una composición farmacéutica.

60 La composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del portador, excipiente o diluyente puede seleccionarse dependiendo de la ruta usada para la administración y la práctica farmacéutica estándar.

65 En particular, una composición que contiene un vector de plásmido ADN puede estar formada por un factor estimulador de colonia macrófaga de granulocito (GM-CSF), o un plásmido codificador de éste, para actuar como un adyuvante; los efectos beneficiosos se ven usando GM-CSF en forma de polipéptido. Los adyuvantes tales como QS21 o SBAS2 (Stoute J A et al 1997 N Engl J Medicine 226: 86-91) pueden usarse con proteínas, péptidos o ácidos nucleicos para incrementar la inducción de respuestas celulares T.

ES 2 345 604 T3

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, la composición también puede mezclarse con cualquier aglutinante, lubricante, agentes suspensor, agente protector, o agente solubilizante adecuado.

La composición farmacéutica puede ser para uso veterinario (es decir, animal) o para uso humano.

5

Administración

En general, una dosis oral o intravenosa terapéuticamente efectiva de las composiciones de la presente invención se encuentra posiblemente en el rango de 0.01 a 50 mg/kg de peso corporal del sujeto a ser tratado, preferiblemente entre 0.1 y 20 mg/kg. Las composiciones de la presente invención pueden también administrarse mediante infusión intravenosa, en una dosis que oscila en el rango 0.001-10 mg/kg/hora.

Las pastillas o cápsulas de los agentes pueden administrarse por separado o dos o más a la vez, como sea apropiado. También es posible administrar las composiciones de la presente invención en formulaciones de liberación sostenida.

Normalmente, el médico determinará la dosis precisa que será más adecuada para un paciente individual y que variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis anteriormente mencionadas son ejemplos del caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales donde se administran dosis inferiores o superiores, y tales se encuentran en el campo o alcance de esta invención.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en forma de un suppositorio o pesario, típicamente en forma de una loción, solución, crema, pomada o en polvos sueltos, mediante el uso de un parche en la piel, oralmente en forma de pastillas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos bien solos o con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intracavicular, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden usarse de manera más adecuada en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Para algunas aplicaciones, las composiciones se administran preferiblemente oralmente en forma de pastillas que contienen excipientes tales como el almidón o lactosa, o en cápsulas y óvulos bien solos o junto con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes y colorantes.

Para administración parenteral, las composiciones se usan de manera más adecuada en forma de soluciones acuosas estériles que pueden contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre.

40

Para administración bucal o sublingual las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de una manera convencional.

Para administración oral, parenteral, bucal y sublingual a sujetos (como los pacientes) el nivel diario de dosis de los agentes de la presente invención puede ser normalmente de 10 a 500 mg (en una dosis única o en dosis divididas). Por lo tanto, y a modo de ejemplo, los comprimidos o cápsulas pueden contener entre 5 y 100 mg del agente activo para administración de manera individual o dos o más a la vez. Tal y como se indica a continuación, el médico determinará la dosis real que será más adecuada para un paciente en concreto y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Hay que anotar que mientras que las dosis arriba mencionadas son ejemplos del caso medio, se da por supuesto que puede haber casos individuales donde se precisen dosis superiores o inferiores y que tales dosis se encuentran dentro del alcance de esta invención.

En algunas aplicaciones, generalmente en humanos, la administración oral de los agentes de la presente invención es la vía preferida, siendo la más convencional y en algunos casos puede evitar desventajas asociadas con otras vías de administración, como las asociadas con la administración intracavicular (i.c.). En circunstancias en las que el recipiente sufre problemas para tragar o problemas en la absorción de fármacos tras administración oral, el fármaco puede administrarse parenteralmente, por ejemplo, por vía sublingual o bucal.

Para uso veterinario, la composición de la presente invención normalmente se administra como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica normal veterinaria y el doctor veterinario determinará el régimen de dosis y la vía de administración que resultará más adecuada para un animal particular. Sin embargo, al igual que con el tratamiento en humanos, puede ser posible administrar la composición sola para tratamientos veterinarios.

65

Ejemplos**Ejemplo 1****5 Inmunogenicidad y eficacia protectora contra tuberculosis****Ejemplo 1A****Antígenos ESAT6 y MPT63**

10 Debido a que se cree que los antígenos segregados que las micobacterias vivas liberan son importantes en la generación de inmunidad protectora, los presentes inventores seleccionaron dos antígenos segregados por *M. tuberculosis* para su inclusión en las vacunas. El primero, ESAT6 (objetivo 6 antigénico previamente segregado), es relativamente específico de *M. tuberculosis*, y de manera importante, no se encuentra presente en *M. bovis* BCG [10]. ESAT6 es un
 15 objetivo antigénico temprano y clave en infecciones en ratones [11] y es un objetivo CTL humano [5]. El segundo antígeno, MPT63 (proteína micobacteriana de tuberculosis 63), está presente en algunas cepas de *M. bovis* BCG [12].

Se generaron una construcción poliproteica de ADN y un virus MVA recombinante que contenía ambos antígenos y analizamos la inmunogenicidad de estas construcciones, de manera individual y en combinación. Las combinaciones
 20 de vacunas más inmunogénicas se analizaron a continuación en experimentos con ratones con *M. tuberculosis*.

Construcción de ADN plásmido y vacunas de tuberculosis MVA recombinante

25 Se construyó una sola secuencia codificadora que contenía la secuencia líder TPA, genes ESAT6 y MPT63 y el epítopo de anticuerpo Pk (TEMPk) y se ligó en el vector plásmido pSG2, creando la vacuna de ADN pSG2.TEMPk. La expresión de la proteína de fusión se mostró en el citoplasma.

El MVA recombinante se purificó de una transfección de MVA tipo salvaje y de un vector que servía de lanzadera
 30 de vaccinia que contenía la secuencia TEMPk.

Vacunas ADN y MVA que inducen IFN γ específico de péptidos que producen células T CD4+

35 Los ratones C57B1/6 fueron inmunizados con ADN (i.m), MVA (i.d) o una combinación de los dos. Usando péptidos superpuestos que abarcan la longitud de ambos antígenos y un ensayo ELISPOT IFN- γ , identificamos respuestas a varios péptidos en los esplenocitos de los ratones inmunizados. Las respuestas se observaron en dos péptidos dentro de ESAT 6 (E1 y E2) y en cuatro péptidos en MPT63 (M3, 15, 27 y 28) (Tabla 1). Para analizar el fenotipo de las células que respondieron a estos péptidos, las células CD4+ y CD8+ se drenaron usando gotas magnéticas. Las
 40 respuestas a los seis péptidos se derogaron completamente cuando las células T CD4+ se drenaron y no estuvieron afectadas cuando las células T CD8+ se drenaron (Tabla 1). Los ensayos se llevaron a cabo tanto *ex-vivo* (péptidos E1 y E2) como tras cultivar las células con péptido durante 5-7 días (todos los péptidos, ver métodos).

TABLA 1

Péptidos que muestran epítopos de células T identificados en ESAT 6 y MPT63

Antígeno	Péptido	Secuencia	CD4	CD8
ESAT 6	1	MTEQQWNFAGIEAAA	+	-
	2	WNFAGIEAAA SAIQG	+	-
MPT63	3	VAVVA MAAIA TFAAP	+	-
	15	VAGQV WEATA TVNAI	+	-
	27	GKIYF DVTGP SPTIN	+	-
	28	DVTGP SPTIV AMNGM	+	-

Estimulación homóloga de respuestas inducidas por ADN y MVA

La mayor frecuencia de células T que segregan IFN- γ (SFC) fue para el primer péptido ESAT6, E1 (Tabla 2). Una única dosis de ADN falló a la hora de generar respuestas detectables, pero cuando se repitió dos veces, o tres veces en dos intervalos semanales, se observaron consistentes respuestas. Tras tres inmunizaciones, el número de SFC fue más del doble que el observado tras dos inmunizaciones; la respuesta media tras dos dosis fue 30 SFC por 10^6 esplenocitos, y después de tres dosis fue 75 SFC. Una única inmunización con MVA generó respuestas con una frecuencia media

ES 2 345 604 T3

de células formadoras de gotas para E1 de 20 por millón, que modestamente mejoraron tras una segunda dosis de MVA (frecuencia media de SFC para E1 = 30). Por lo tanto, las respuestas celulares T CD4 que segregan gamma-interferón son inducidas para un epítopo de célula T CD4 codificado mediante inmunización con este virus pox con réplica afectada.

5

TABLA 2

Resumen de respuestas de células T específicas de péptidos para las dos construcciones

10

Condición	SFC a los péptidos individuales					
	E1	E2	M3	M15	M27	M28
DNA X 1	-	-	-	-	-	-
DNA X 2	30	5	-	5	5	5
DNA X 3	75	50	-	15	40	45
MVA X 1	20	10	5	-	5	5
MVA X 2	30	10	5	-	10	10
DNA/MVA	130	26	12	17	5	10
MVA/DNA	130	70	10	10	10	5
DNAX3/MVA	360	250	25	100	30	50

15

a) Los números representan la media de 3-10 ratones por 10^6 esplenocitos. El error estándar es <20%.

20

Regímenes heterólogos preparación-estimulación aumentaron la magnitud de las respuestas observadas de linfocitos T CD4

25

Habiendo detectado estas repuestas usando las vacunas de manera individual, se analizó el papel de los regímenes heterólogos de preparación-estimulación, es decir, usando la construcción ADN o MVA para preparar la respuesta y la segunda construcción para estimular dos semanas después. La estimulación heteróloga, bien DM o MD, produjo respuestas más fuertes que la estimulación homóloga de DD o MM (Tabla 2). La respuesta media para péptido E1 aumentó más de 4 veces para 130 SFC y, sorprendentemente, a la vista del hallazgo en respuestas inducidas de células T CD8 [8], esto ocurrió independientemente del orden que se dio a las dos vacunas. La respuesta al péptido E2 fue ligeramente más sólida cuando MVA estuvo seguido de ADN que en el orden inverso. Las respuestas a los péptidos M3 y M15 fueron más fuertes con una estimulación heteróloga, con independencia del orden en el que se dieron las vacunas, mientras que las respuestas a los péptidos M27 y M28 fueron débiles y no se estimularon. La respuesta más fuerte se observó cuando ADN se dio tres veces y a continuación se estimuló con MVA una vez (DDDM). En este caso, la respuesta media para E1 aumentó casi 5 veces desde 75SFC a 360SFC. Las respuestas a otros péptidos también fueron más altas tras DDM en comparación con DM.

30

35

40

45

50

En estudios adicionales que usaron ADNs plásmidos que expresaban antígeno *M. tuberculosis*, AG85b y un MVA recombinante que expresaba el mismo antígeno en la inducción de células T CD4 a un epítopo de célula T CD4 se observó en ratones Balb/c. Los estudios de depleción usando gotas cubiertas con anticuerpo confirmaron que la respuesta al péptido P15 en este antígeno fue dependiente de CD4. En el mismo experimento, las células T CD8+ también fueron inducidas al epítopo P15 CTL en Ag85 por inmunización ADN y por inmunización MVA recombinante. Se observaron respuestas más fuertes para epítopo CD4 y CD8 tras la inmunización preparación-estimulación, realizando la preparación con ADN y la estimulación con MVA. Por consiguiente, la inmunización MVA recombinante y la inmunización heteróloga preparación-estimulación pueden generar respuestas en células T CD4 y CD8 que segregan gamma-interferón para epítopes en el mismo antígeno.

55

Experimentos de desafío

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

ES 2 345 604 T3

Para evaluar la eficacia de los regímenes de inmunización a las 8 semanas, se extrajeron los órganos de todos los ratones que quedaban a las 8 semanas, y se determinaron los totales de CFU. En los dos experimentos de desafío, tal y como se esperaba, los totales de CFU en el grupo BCG fueron significativamente inferiores a los del grupo que no se había sometido al tratamiento en los tres órganos ($p < 0.05$, Figura 1). En el primer experimento de desafío, 5 los totales de CFU en los tres órganos en el grupo DMM fueron significativamente inferiores que los del grupo que no se había sometido al tratamiento ($p < 0.05$). Los totales de CFU en el grupo MDM en los tres órganos no fueron muy diferentes de los del grupo que no se había sometido al tratamiento. Sin embargo, en el segundo experimento, el pulmón fue el único órgano en el que los totales de CFU en el grupo DDDM fueron significativamente inferiores que los del grupo que no se había sometido al tratamiento ($p < 0.05$). Los totales observados en el hígado y bazo no fueron 10 muy diferentes entre estos dos grupos. Los totales CFU del grupo DMM/MDM/DDDM no fueron muy diferentes del grupo BCG en ninguno de los órganos en cualquiera de los experimentos.

Estos resultados demuestran la inmunogenicidad y la eficacia protectora frente a *M. tuberculosis* de vectores de vacuna MVA y ADN que inducen respuestas de linfocitos T CD4 que segregan gamma-interferón y también de los 15 regímenes de inmunización heterólogos de preparación-estimulación que usan estas vacunas. La vacunación de ADN es conocida por provocar una respuesta inmune del tipo T_H1, y por lo tanto elegimos la cuantificación de una citoquina T_H1, IFN- γ en un ensayo ELISPOT como nuestra medida con resultado funcional. Este ensayo es un método muy sensible para cuantificar la función de célula T [13]. Los ensayos de proliferación son una medida alternativa de respuesta de célula T CD4+, pero esto no es una lectura de una respuesta efectora y, de manera importante, la secreción de 20 gamma-interferón y las respuestas de proliferación a menudo se correlacionan de manera negativa (Troye-Blomberg *et al.*, Flanagan *et al* 2000). Hay dos razones por las que la producción de IFN- γ medidor es una medida con consecuencias más relevante en un modelo desafío de *M. tuberculosis*. IFN- γ es un componente esencial de la respuesta 25 inmune protectora para la tuberculosis, ya que los ratones knockout son mucho más susceptibles de estimularse con *T. tuberculosis* que con sus homólogos de tipo salvaje [14]. Además, una mutación en el gen receptor humano de IFN- γ confiere susceptibilidad a una infección micobacteriana atípica [15].

El MVA recombinante y la vacuna de ADN generaron de manera individual células T CD4+ que segregaban IFN- γ específico a los mismos péptidos. No se observaron respuestas a la célula T CD8+ que segregaba IFN- γ a estas construcciones, presumiblemente como resultado de la ausencia de un péptido con elevada afinidad de enlace para 30 las moléculas relevantes MHC clase I en esta variedad de ratones (C57/BL6). Como los péptidos usados para evaluar las respuestas abarcaron la longitud de ambos antígenos, esto efectivamente excluye la presencia de un epítopo de CD8 para esta raza de ratón. Por lo tanto, estas construcciones nos permiten evaluar el efecto de cada una de las vacunas y de los regímenes preparación-estimulación en las respuestas de células T CD4+. Aunque cada tipo de vacuna 35 claramente provocó respuestas de célula T CD4+, los regímenes heterólogos de preparación-estimulación con las dos vacunas generaron respuestas más sólidas de células T CD4+ que la estimulación heteróloga. De manera interesante, el orden en el que se administraron las dos vacunas no indicó ninguna diferencia en la fuerza de las respuestas inmunes generadas. La preparación con ADN y la estimulación con MVA, o la preparación con MVA la estimulación con ADN produjeron por igual un aumento de 3-4 veces en el número de células T CD4+ que segregan IFN- γ específicas para 40 el primer péptido ESAT 6. Este hecho contrasta con trabajos publicados sobre respuestas de células T CD8+ donde la preparación con ADN seguida de la estimulación con MVA es el único orden en el que se observan altos niveles de inmunogenicidad y protección [8].

A las ocho semanas, los niveles de protección con los regímenes ADN/MVA fueron equivalentes a los obtenidos con BCG y la protección en el grupo inmunizado BCG está en el mismo orden que el publicado previamente [6].

En el primer experimento desafío, el grupo inmunizado con ADN/MVA mostró niveles de protección equivalentes a BCG en los tres órganos. En el segundo experimento, la protección en el grupo inmunizado de ADN/MVA solamente 45 se observó en los pulmones a las ocho semanas. Autores anteriores han observado efectos protectores variantes en diferentes órganos dependiendo del tiempo desde la prueba de desafío hasta la extracción. Zhu *et al.* Informó sobre la protección tras la inmunización de ADN en los pulmones cuatro semanas después de la prueba de desafío, pero solamente se observó protección en los pulmones y bazo 12 semanas después de la prueba de desafío [16]. Como la vía principal de infección en humanos es la vía pulmonar, el pulmón es el órgano más relevante en el que se identifica la protección. Se han desarrollado modelos de aerosol más relevantes de pruebas de desafío con *M. tuberculosis*, y será importante ver si las vacunas que confieren protección contra una vía sistémica de prueba de desafío siguen siendo protectoras contra una prueba de desafío con aerosol, y si la protección en los pulmones se mantiene.

La preparación de ADN pareció ser necesaria para que se diera la protección en los experimentos con pruebas de desafío, y al igual que en el primer experimento con prueba de desafío, la protección se observó en el grupo DMM pero no en el grupo MDM. Hay que mencionar que la falta de protección en el grupo MDM a las 24 horas y a las 8 semanas 50 descarta de manera efectiva un efecto protector no específico de las vacunas con subunidades administradas hasta las dos semanas antes de la prueba de desafío. Resulta incierto el hecho de por qué la protección se consiguió en el grupo DMM pero no en el grupo MDM cuando el orden de inmunización (Tabla 2) no pareció afectar la inmunogenicidad. Sin embargo, las diferencia puede estar relacionada con el ritmo de la segunda estimulación de MVA, a que las dos 55 dosis de MVA se dieron con un mes de diferencia en el grupo M/D/M. Puede ser que en este intervalo de tiempo una respuesta del anticuerpo a MVA abrogó el efecto de estimulación.

El mecanismo por el cual la respuesta a una vacunación con preparación de ADN puede estimularse por una posterior inmunización con un virus recombinante que codifica el mismo antígeno no se ha aclarado completamente-

ES 2 345 604 T3

te. A pesar del deseo de basarse en una teoría, los presentes inventores predicen que puede estar relacionado con la inducción por parte de ADN de células T con memoria con un epítopo inmunodominante que se expande rápidamente al exponerse a un virus recombinante que transporta el mismo epítopo [18]. Es posible que los mecanismos implicados en la estimulación de células T CD8+ sean diferentes a los implicados en la estimulación de células T CD4+. 5

Ejemplo 1B

10 Antígeno 85A

Se usaron las construcciones de ADN y MVA que expresan antígeno 85A para inmunizar dos variedades de ratones: BALB/c y C57BL/6. Se detectaron varias respuestas de péptidos en los esplenocitos de ratones inmunizados usando el ensayo Elispot IFN- γ y los péptidos superpuestos abarcaron la longitud del antígeno 85A. Los ratones se inmunizaron con ADN y/o AMV, solos o en combinación, con el fin de determinar los regímenes óptimos de inmunización. 15

Todas las respuestas sólidas identificadas se encontraron en ratones BALB/c. Todos los trabajos adicionales con estas construcciones se limitaron a esta variedad de ratón. Las construcciones de ADN y AMV provocaron respuestas a los mismos péptidos. Las respuestas a cuatro de los péptidos superpuestos se identificaron usando los esplenocitos de ratones inmunizados; p11, p15, p24 y p27. Las respuestas más sólidas fueron para los péptidos p11 y p15. 20

25 Estudios de Deplección

Para evaluar el fenotipo de las respuestas de células T a estos péptidos, las células CD4+ y CD8+ se redujeron usando gotas magnéticas. La respuesta a p11 se abrogó casi completamente por la depleción celular de T CD8+. La respuesta a p15 se abrogó casi completamente por la depleción celular de T CD4+. Las respuestas más débiles a los péptidos 30 24 y p27 fueron abrogadas por la depleción celular de T CD4+. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

En resumen, la inmunización con construcciones de ADN y MVA que expresan el antígeno 85A provocaron una epítopo CD8+ inmunodominante (p11), un epítopo CD4+ inmunodominante (p15) y 2 epítopos CD4+ más débiles (p24 y p27). 35

TABLA 3

40 Estudios de depleción sobre respuestas identificadas en el antígeno 85A

Péptido	Secuencia	Respuesta sin depleción (SFC)	CD4+ Depleción (SFC)	CD8+ Depleción (SFC)
P11	EWYDQSGLSV/MPVGGQSSF	250	200	10
P15	TFLTSELPGWLQANRHVKPT	300	0	250
P24	QRNDPLLNVGKLIANNTRVW	30	0	20
P27	LGGNNLPAKFLEGVRTSNI	30	0	25

55

Las respuestas generadas por una única inmunización con cualquiera de las construcciones fueron débiles y solamente aumentaron ligeramente por la estimulación homóloga con la misma construcción. La estimulación heteróloga de ADN con MVA produjo frecuencias significativamente superiores de células T tanto CD4+ (p15) como CD8+ (p11). La estimulación heteróloga de MVA con ADN impulsó la frecuencia de células T CD4+ (p15) pero no incrementó la respuesta de células T CD8+ (p11). Tres inmunizaciones de ADN seguidas de una única estimulación de MVA (DDDM) generaron la frecuencia más alta de células T que segregan IFN- γ . Esto es consistente con los resultados que usan las construcciones que expresan ESAT6/MPT63, donde el régimen más inmunogénico fue DDDMM. 60 65

ES 2 345 604 T3

Estos resultados se resumen en la Tabla 4.

TABLA 4

Resumen de respuestas de célula T de péptido a las construcciones de antígeno 85A

Régimen de inmunización	SFC por 10^6 esplenocitos a los péptidos individuales ^a	número de péptido	11	15	24	27
DNA x 1	29		24	32	19	
DNA x 2	11		14	10	16	
DNA x 3	70		31	15	16	
MVA x 2	9		12	10	6	
DNA/MVA	80		77	9	32	
MVA/DNA	8		103	9	10	
DNA x 3/MVA	312		325	14	141	

^aLos números representan las medias de SPF por 10^6 esplenocitos para 3-10 ratones por grupo. El error estándar es de < 20%.

Experimentos con Pruebas de Desafío

Una vez que se habían determinado los regímenes óptimos de inmunización con las construcciones de antígeno 85A, la eficacia protectora de estos regímenes se evaluó en estudios de pruebas de desafío con *M.tb*. Inicialmente, se usó 1×10^6 cfu *M.tb* como dosis en la prueba de desafío, medio logaritmo menos que la dosis de desafío usada para los ratones C57BL/6. Esto se debió porque la literatura sugiere que los ratones BALB/c son ligeramente más susceptibles a la prueba de desafío con *M. tb* que los ratones C57BL/6. Se optó por ocho semanas como punto en el tiempo para la extracción, para permitir comparaciones con los resultados de la prueba de desafío usando las construcciones ESAT6/MPT63. Autores anteriores han demostrado un efecto protector en ratones BALB/c a las seis semanas después de una prueba de desafío i.p con *M.tb*.

Comparación entre regímenes de preparación-estimulación heterólogos y homólogos

Se preparó un experimento con prueba de desafío para comparar la eficacia protectora de regímenes de preparación-estimulación heterólogos y homólogos usando el antígeno 85A que expresan construcciones. Los resultados de inmunogenicidad usando estas construcciones habían confirmado que la estimulación heteróloga produjo niveles más altos de células T específicas CD4+ y CD8+ que la estimulación homóloga. Un grupo de control de ratones que recibió 3 dosis de antígeno 85A ADN seguida de una dosis de MVA no recombinante se incluyó para evaluar la especificidad del efecto de estimulación de MA.

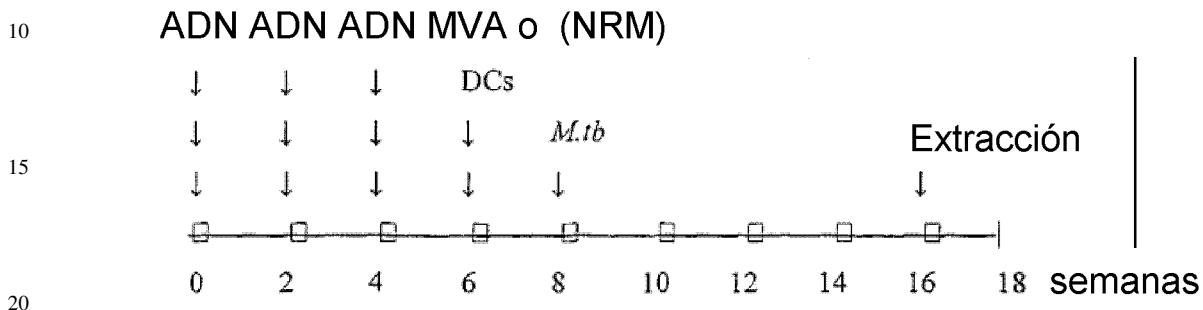
Hubo 5 grupos en este experimento:

- Grupo que no se había sometido al tratamiento previamente
- BCG
- DDD
- DDDM
- DDD (MVA no recombinante [NRM]).

Hubo 10 ratones en cada grupo excepto en el grupo DDDM, que tuvo 7 ratones. De dos a tres ratones fueron extraídos de cada grupo para inmunogenicidad en el momento de la prueba de desafío. En el mismo momento, se dio BCG como primera inmunización de ADN. Los ratones fueron sometidos a la prueba de desafío con 10^6 cfu *M. tb* i.p., 2 semanas después de la inmunización, y fueron extraídos 8 semanas después de la prueba de desafío.

5

BCG



Los resultados de Elispot para el grupo DDDM mostraron altos niveles de respuestas de célula T consistentes con los resultados previos de inmunogenicidad para este régimen. Los resultados para los grupos DDD y DDD(NRM) mostraron respuestas de bajo nivel. No se observó ningún efecto estimulante con MVA no recombinante. Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

30 TABLA 5
Prueba de Desafío 4: SFC medio por 10⁶ esplenocitos para regímenes de inmunización heterólogos y homólogos

	P11	P15	P24	P27
DDD	9	0	0	0
DDD (NRM)	0	8	0	7
DDDM	217	245	0	217

40 El ensayo de liberación A⁵¹ Cr se llevó a cabo sobre esplenocitos de ratones en el grupo DDM. Los resultados de este experimento mostraron que en uno de los dos ratones cosechados en el grupo DDDM, los elevados niveles de lisis específica (60-70%) podían demostrarse. En el otro ratón, el nivel de lisis fue mucho menor (20-30%). Estos resultados se resumen en la Figura 2.

45 El régimen heterólogo de preparación-estimulación (DDDM) confiere protección en los pulmones equivalente a BCG en comparación con el grupo de control que no se había sometido al tratamiento ($p=0.010$). No se observa protección en el bazo en el grupo DDDM. El régimen heterólogo, DDD, bien solo o impulsado con MVA no recombinante, DDD (NRM), no confirió protección significativa contra el desafío. Tal y como se esperaba, hay un efecto protector significativo de BCG tanto en los pulmones como en el bazo, cuando este grupo se compara con el grupo de control que no se había sometido al tratamiento (pulmones: $p=0.009$; bazo: $p<0.001$). Estos resultados se resumen en la Figura 3.

Discusión

55 La vacuna de ADN y MVA recombinante que expresa el antígeno 85A generó células T CD4+ y CD8+ que segregan IFN- γ a los mismos cuatro péptidos. Los regímenes heterólogos de preparación-estimulación con las dos vacunas generaron altas frecuencias de respuestas de célula T en comparación con el régimen homólogo. Las respuestas de célula T CD4+ aumentaron con independencia del orden de inmunización. Esto es consistente con los resultados obtenidos con las construcciones que expresan ESAT6/MPT63 (Ejemplo 1A). La respuesta de célula T CD8+ inducida por el antígeno 85A que expresa construcciones solamente se impulsó con régimen de inmunización de preparación de ADN-estimulación de MVA y no cuando las construcciones se dieron en el orden inverso. Esto es consistente con los trabajos anteriormente publicados sobre respuestas estimulantes de célula T CD8+.

60 Las rutas del proceso para la inducción de respuestas de célula T CD8+ restringidas a la clase I y respuestas de célula T CD4+ restringidas a la clase II son diferentes. Esto puede explicar por qué la inmunización de ADN estimula las respuestas de células CD4+, pero no de células CD8+. La vacunación con ADN es conocida por ser buena en la preparación de células T CD8+ restringidas a la clase I, ya que el antígeno producido de manera endógena puede acceder a la ruta de la clase I. Puede ser que la inmunización con MVA provoque diferentes citoquinas para

ES 2 345 604 T3

la inmunización con ADN. Una citoquina posible es IL4. El efecto estimulador de MVA puede abrogarse por la co-administración de anticuerpos IL4 con el MVA (Sheu, comunicación personal). IL4 puede ser necesario para estimular una respuesta CD8+ de memoria pero no una respuesta CD4+.

- 5 En el experimento de desafío, las mayores respuestas de células T CD4+ y CD8+ con los regímenes heterólogos de preparación-estimulación confirieron protección en los pulmones equivalente a, pero no mayor que, BCG.

Materiales y Métodos

- 10 *Reservas de M. tuberculosis.* *M. tuberculosis* (H37Rv) creció en el medio de cultivo de Dubos y se incubó a 37°C durante 21-28 días. La solución se centrifugó, se volvió a suspender en TBS/glicerol y se almacenó a -70°C tras la titulación. Las soluciones de la reserva se sometieron a ultrasonido antes de su uso.

- 15 *Construcciones de plásmido ADN.* *M. tuberculosis* (H37Rv) se inactivó con calor y se extrajo el ADN (QIAamp, Qiagen, Hilden, Alemania). Los cebadores de oligonucleótido (Genosys Biotechnologies Ltd, Pampisford, Cambs) se usaron para amplificar el gen ESAT6 y MPT63. Los productos PCR se extrajeron de gel de agarosa y se purificaron (kit QIAquick, Qiagen). La secuencia líder del activador de plasminógeno en el tejido (TGP) también se amplificó. Los tres productos PCR se secuenciaron, a continuación se ligaron para formar una única secuencia codificadora con el epítopo anticuerpo Pk en el extremo 3' (TEMPk). El fragmento TEMPk se ligó en el vector plásmido pSG2, creando 20 pSG2. TEMPk. Este plásmido tiene el promotor CMV con intrón A, la secuencia poli A de la hormona bovina del crecimiento, y el gen de resistencia a la kanamicina como un marcador seleccionable. La expresión de la proteína de fusión TEMPk en células COS-1 fue detectada mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos con la etiqueta Pk (Serotech, UK) y le siguió un isómero isotiocianato fluorescente (FITC) que etiquetó anticuerpos secundarios (Sigma). El esfuerzo nuclear mostró que la proteína esa un citoplasma. El ADN plásmido para inyección se purificó 25 usando cromatografía de intercambio de anión (Qiagen) y se diluyó en salina con búfer de fosfato libre de endotoxina (Sigma).

- 30 *Construcción de Vaccinia Ankara Recombinante Modificada (MVA).* La secuencia TEMPk de ADN se clonó en el vector lanzadera de *Vaccinia* pSC11. Las células BHK se infectaron con MVA de tipo salvaje (A Mayr, Universidad de Veterinaria, Universidad de Munich, Alemania) en una multiplicidad de infección de 0.05, para trasfектarse a continuación con el vector lanzadera recombinante. El virus recombinante fue seleccionado con bromodeoxiuridina y a continuación la placa se purificó sobre células CEF.

- 35 *Animales e Inmunización* Ratones hembra C57/BL6 de edad comprendida entre 4 y 6 semanas (Harlan Orlac, Shaws Farm, Balckthorn, UK) fueron inyectados con ADN plásmido (25 µg/músculo) en ambos músculos tibiales con anestesia. MVA recombinante (10^6 pfu) se inyectó a través de vía intradérmica. Los ratones fueron inmunizados en intervalos de dos semanas y se extrajeron en busca de inmunogenicidad dos semanas después de la última inmunización. Para los experimentos de desafío los ratones se infectaron dos semanas después de la última inmunización. Un grupo de control BCG fue inmunizado con 4×10^5 cfu *M. bovis* BCG (Glaxo) por vía intradérmica en el momento de 40 la primera inmunización ADN/MVA.

- 45 *Preparación de esplenocitos* Los ratones fueron sacrificados y los bazos se retiraron usando técnicas asépticas. Los bazos se aplastaron y la suspensión sencilla de célula resultante se filtró a través de un filtro o colador (Falcon, 70 µm, Becton Dickinson, New Jersey). Las células se transformaron en pellets y las células sanguíneas rojas se lisaron usando búfer de lisis hipotónico. A continuación, las células se lavaron y se contaron. Los esplenocitos se volvieron a suspender en un medio alfa-MEM con 10% FCS, 2mM glutamina, 50U/ml penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 50 µM 2-mercaptopetanol y 10 mM Hepes pH 7.2 (todo de Gibco).

- 50 *Péptidos* Los péptidos superpuestos que abarcan la longitud de ambos antígenos se compraron en Research Genetics (Huntsville, AL, USA). Los péptidos tenían 15 aminoácidos de longitud y se sobrepusieron por 10 aminoácidos (Tabla 1).

- 55 *Ensayos ELISPOT* El número de células T específicas de péptido que segregan IFN-γ se determinó usando los péptidos que coinciden en un ensayo ELISPOT [8]. En resumen, placas con 96 pozos de nitrocelulosa (Milliscreen MAHA, Millipore, Bedford, MA) se cubrieron con 15 µg/ml del anticuerpo R4-6A2 monoclonal anti-ratón IFN-γ (hibridoma comprado en la Colección Europea de Cultivos de Células de Animales). Tras la incubación a 4°C durante la noche, los pozos se lavaron con PBS y se bloquearon con 100µl RPMI: 10% FCS durante una hora a temperatura ambiente. Los esplenocitos se añadieron a los pozos (106 células/pozo) con péptido (concentración final 2µg/ml). Se usó concanavalina A (Sigma-Aldrich co Ltd, Poole, UK) como control positivo para el ensayo. Los pozos de control 60 no tenían péptido. Tras incubar la placa durante la noche a 37°C con 5% CO₂ en aire, se desarrolló como se ha descrito previamente [8]. Las manchas se contaron usando un microscopio de disección. Los números hacen referencia a las células que forman mancha por millón de células efectoras (SFC).

- 65 *Depleción Celular* Las deplecciones de células CD4+ y CD8+ se realizaron usando anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti CD8 conjugados con gotas ferrosas (Dynal, Oslo). Los esplenocitos de ratones inmunizados se volvieron a estimular en placas de cultivo de tejidos con seis pozos con 1 µg/ml del péptido relevante, y el día 3 del cultivo se añadieron 10U/ml de IL2 humano (Lymphocult-T, Biotest, Dreieich, Alemania). En los días 5-7 los esplenocitos estimulados se lavaron dos veces y se incubaron en hielo durante 30 minutos con uno de los dos anticuerpos (gota:célula

ES 2 345 604 T3

= 5:1). A continuación, se realizó un ensayo ELISPOT como anteriormente se ha explicado, usando las poblaciones reducidas de célula. Los ensayos para péptidos E1 y E2 se realizaron también *ex-vivo*. Los estudios de depleción para cada respuesta de péptido se realizaron dos veces.

5 *Experimentos con pruebas de desafío* Los ratones se infectaron con 5 x 106 cfu *M. tuberculosis* (H37Rv) a través de inyección intraperitoneal, en una unidad aisladora de Categoría III. Para evaluar el nivel de la línea base de la infección, el hígado, los pulmones y el bazo de 2-5 ratones de cada grupo fueron extraídos y se pesaron veinticuatro horas después de la infección. Los órganos de los 7-10 ratones restantes en cada grupo fueron extraídos ocho semanas después de la prueba de desafío. Los órganos se homogenizaron mediante un vórtice con gotas de cristal de 5 mm en 10 1 ml de PBS estéril y las diluciones en serie se colocaron en placas Middlebrook. Las placas se incubaron durante 21 días a 37°C y el total de colonias/tejido en gramos se calculó a continuación. La prueba U de Mann-Whitney usó para comparar los totales de CFU entre grupos.

15 *Preparación Celular* Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se prepararon a partir de sangre periférica mediante la separación Ficoll. Los ensayos se realizaron con sangre fresca o congelada en 10% DMSO/90% FCS antes de analizarse, tal y como se detalla en el texto. Todo el medio de cultivo se complementó con 10% suero AB humano, 2 nM Glutamina y 100 U ml-1 Penicilina/Estreptomicina. Las células se drenaron usando el sistema Dynal Dynabead en 5-10 gotas/célula.

20 *Ensayo ELISPOT *ex vivo*.* El medio de cultivo fue RPMI 1640. Los ensayos ELISPOT se llevaron a cabo en placas Millipore MAIP S45 con anticuerpos MabTech de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 4 x 105 PBMC se incubaron durante 18-20 horas en las placas ELISPOT en presencia de péptidos, estando cada uno en 25 µg ml-1. Las placas se lavaron a continuación en Salina con Búfer de Fosfato (PBS) que contenía 0.5% Tween-20 (PBST), y se añadió un anticuerpo biotinilado anti-IFN γ diluido en PBS, y se incubó durante 2-24 horas, las placas se lavaron 25 posteriormente en PBST, y se añadió fosfatasa alcalina estreptavidina diluida en PBS 1:1000. Después de 1-2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron y desarrollaron usando el kit de sustrato de precipitación BioRad. Los resultados se expresan como unidades que forman gotas (SFU) por millón de células añadidas al pozo y se calculan como la diferencia entre la prueba y la respuesta al medio solo.

30 Referencias

1. Fine, P.E. y Rodrigues, L.C., *Lancet* 1990. 335: 1016-1020.
2. Orme, I.M., *J. Immunol.* 1987. 138: 293-298.
3. Barnes, P.F., Bloch, A.B., Davidson, P.T. y Snider, D.E., Jr., *N. Engl. J. Med.* 1991. 324: 1644-1650.
4. Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B. y Bloom, B.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. 89: 12013-12017.
5. Alvani, A., Brookes, R., Wilkinson, R.J., Malin, A.S., Pathan, A.A., Yersen, P., Dockrell, H., Pasvol, G. y Hill, A.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95: 270-275.
6. Tascon, R.E., Colston, M.J., Rago, S., Stavropoulos, E., Gregory, D. y Lowrie, D.B., *Nat. Med.* 1996. 2: 888-892.
7. Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., et al, *Nat. Med.* 1996. 2: 893-898.
8. Schneider, J., Gilbert, S.C., Blanchard, T.J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., et al, *Nat. Med.* 1998. 4: 397-402.
9. Sedegah, M., Jones, T.R., Kaur, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Tine, J.A. y Hoffman, S.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95: 7648-7653.
10. Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H.G., Rosenkrys, I. y Yersen, P., *Infect. Immun.* 1996. 64: 16-22.
11. Bryt, L., Oettinger, T., Holm, A., Yersen, A.B. y Yersen, P., *J. Immunol.* 1996. 157: 3527-3533.
12. Manca, C., Lyashchenko, K., Wiker, H.G., Usai, D., Colangeli, R. y Gennaro, M.L., *Infect. Immun.* 1997. 65: 16-23.
13. Alvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V. y McMichael, A.J., *J. Exp. Med.* 1997. 186:859-865.
14. Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G. y Orme, I.M., *J. Exp. Med.* 1993. 178:2243-2247.

ES 2 345 604 T3

15. **Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R. y Levin, M.**, *N. Engl. J. Med.* 1996: 335:1941-1949.
- 5 16. **Zhu, X., Venkataprasad, N., Thangaraj, H.S., Hill, M., Singh, M., Ivanyi, J. y Vordermeier, H.M.**, *J. Immunol.* 1997. 158: 5921-5926.
17. **Tighe, H., Corr, M., Roman, M. y Raz, E.**, *Immunol. Today* 1998. 19: 89-97.
- 10 18. **Schneider, J., Gilbert, S.C., Hannan, C.M., Degano, P., Prieur, E., Sheu, E.G., Plebanski, M. y Hill, A.V.S.**, *Immunological Reviews* 1999. 170: 29-38.
- 15 19. **Blanchard, T.J., Alcami, A., Yrea, P. y Smith, G.L.**, *J. Gen. Virol.* 1998. 79: 1159-1167.
- 20 20. **Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A. y Walker, B.D.**, *Science* 1997. 278: 1447-1450.
21. **Stoute, J.A., Slaoui, M., Heppner, D.G., Momin, P., Kester, K.E., Desmons, P., Wellde, B.T. et al**, *N. Engl. J. Med.* 1997. 336: 86-91.
- 25 22. **Lalvani, A., Moris, P., Voss, G., Pathan, A.A., Kester, K.E., Brookes, R., Lee, E., et al**, *J. Infect. Dis.* 1999. 180:1656-1664.
23. **Gilbert SC, Plebanski M, Harris SJ, Allsopp CE, Thomas R, Layton GT, Hill AV**. *Nat Biotechnol.* 1997 Nov; 15 (12):1280-4.
- 25 24. **Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, Harris TJ, Marsh K, Newbold CI, Tate VE, Weatherall DJ**. *Nature*. 1988 Sep 1;335:79-82.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de

- 5 (a) una primera composición que contiene una fuente de uno o más epítopos de célula T CD4+ de un antígeno de tuberculosis; y
10 (b) una segunda composición que contiene una fuente de uno o más epítopos de célula T CD4+ del antígeno de tuberculosis, que incluye al menos un epítopo de célula T CD4+ que es el mismo que un epítopo de célula T CD4+ de la primera composición,

donde la fuente de epítopos de célula T en la primera composición no es un vector de virus pox,

15 donde la fuente de epítopos de CD4+ para la segunda composición es un vector de virus pox recombinante no replicante o con la réplica afectada;

para la fabricación de un medicamento que provoca una respuesta de célula T CD4+ del tipo TH₁ contra el antígeno de tuberculosis, donde la primera y segunda composición se administran en cualquier orden.

20 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el vector es el de la cepa de virus vaccinia Ankara modificado o un derivado del mismo.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el vector es un vector de viruela aviar o un derivado del mismo.

25 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los epítopos en o codificados por la primera o segunda composición se proporcionan en una secuencia que no se da de manera natural como el producto expresado de un gen en *M. tuberculosis*.

30 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una dosis de una composición es para administración a través de vía intradérmica.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para administración de al menos una dosis de la primera composición seguida de al menos una dosis de la segunda composición.

35 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, para administración de un conjunto de dosis secuenciales de la primera composición seguidas de al menos una dosis de la segunda composición.

40 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, para administración de tres dosis secuenciales de la primera composición seguidas de al menos una dosis de la segunda composición.

9. Uso de una fuente de uno o más epítopos de célula T CD4+ de un antígeno de tuberculosis, donde la fuente de epítopos CD4+ es un vector de virus pox recombinante no replicante o con la réplica afectada, para la fabricación de un medicamento que estimule una respuesta preparada de célula T CD4+ del tipo TH₁ contra el antígeno de tuberculosis.

45 10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 9, donde el antígeno de tuberculosis es ESAT6, MPT63 u 85A.

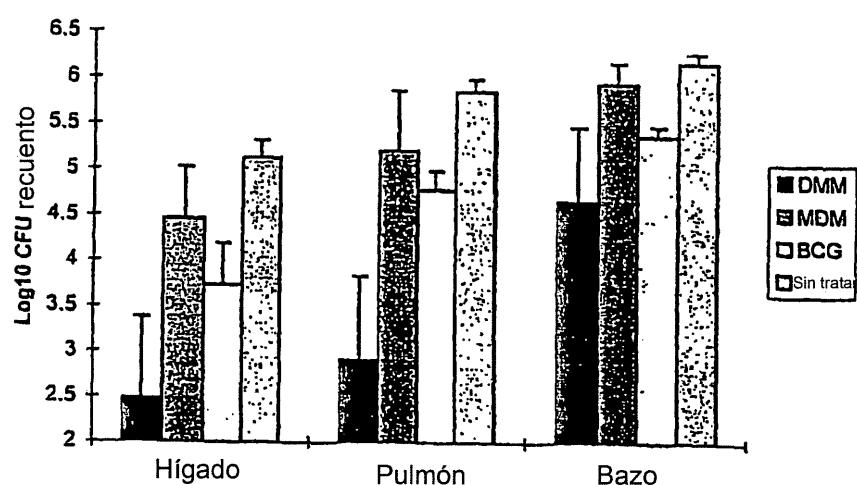
50

55

60

65

Figura 1



a) Prueba 1

a) Prueba 2

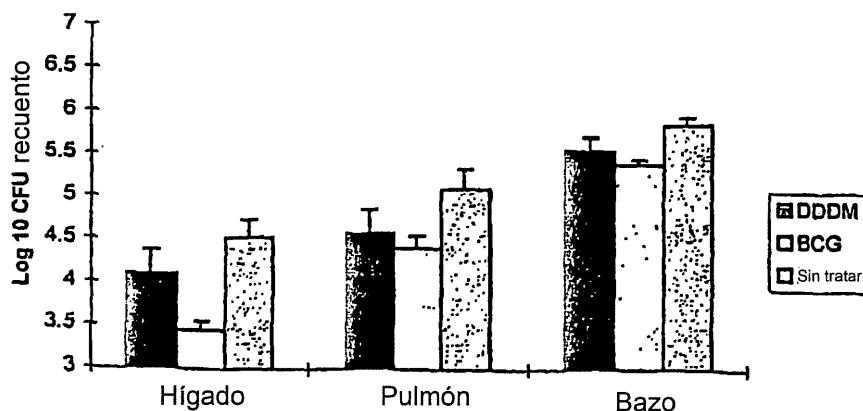


Figura 2

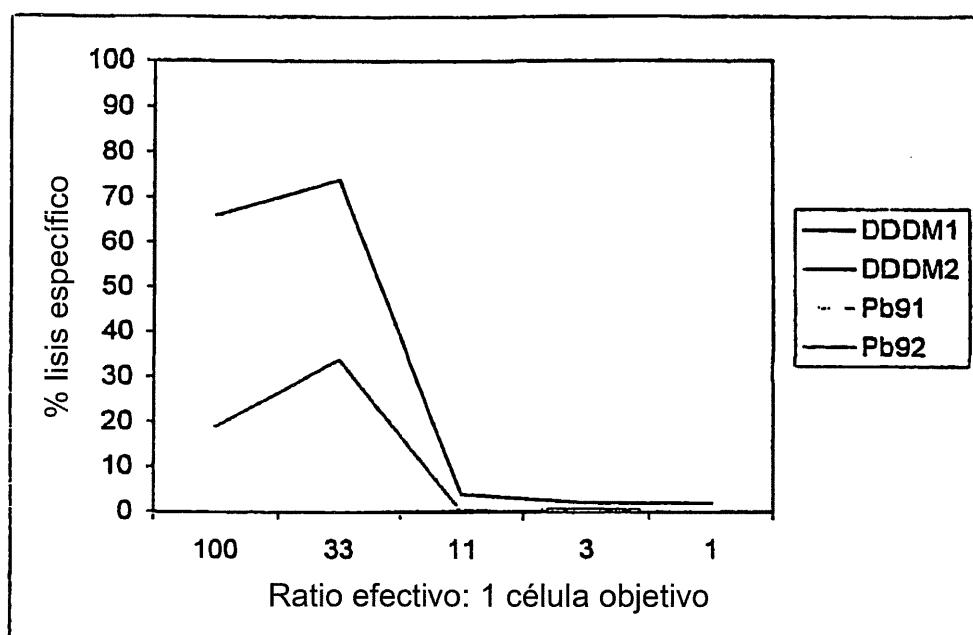


Figura 3

