



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 622**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**C12N 15/31** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05858631 .4**

96 Fecha de presentación : **23.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1827504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54

Título: **Cepas de BCG recombinante con capacidad potenciada para escapar del endosoma.**

30

Prioridad: **01.12.2004 US 631973 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.10.2011**

73

Titular/es: **Aeras Global TB Vaccine Foundation  
7500 Old Georgetown Road, Suite 800  
Bethesda, Maryland 20814, US**

72

Inventor/es: **Sun, Ronggai;  
Hone, David, Michael y  
Sadoff, Jerald, C.**

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 366 622 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

Cepas de bcg recombinante con capacidad potenciada para escapar del endosoma.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

*Campo de la invención*

5 La invención proporciona cepas de *Mycobacterium* que tienen una capacidad  
potenciada para provocar una respuesta inmunitaria. Experimentos *in vivo* han  
demostrado, por ejemplo, una respuesta inmunitaria de células T CD8<sup>+</sup> con  
complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido. En particular,  
10 la invención proporciona cepas de *Mycobacterium* que expresan una proteína  
perfringolisina O (PfoA) que permite el escape del *Mycobacterium* de los  
endosomas, y preparaciones de vacuna que contienen las cepas de  
*Mycobacterium*.

*Antecedentes*

15 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) ha infectado a un tercio de la  
población mundial, provocando enfermedad activa en 8 millones y muriendo  
1,6-2,2 millones de individuos cada año, la mayoría de los cuales viven en  
países en desarrollo. La tuberculosis (TB) es una epidemia de proporciones  
globales que está creciendo y que se ha vuelto incluso más mortal al cruzarse  
20 con la propagación del VIH. TB es la principal causa de muerte de personas  
con SIDA.

El bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa atenuada de *Mycobacterium*  
*bovis* y la vacuna frente a la TB ampliamente usada actualmente, se desarrolló  
hace más de 80 años y cuando se ha sometido a prueba ha tenido tasas  
ampliamente variables de eficacia frente a la tuberculosis pulmonar,  
25 incluyendo falta de eficacia en el último gran ensayo de campo realizado en  
India (Fine *et al.*, *Vaccine*, 16(20):1923-1928; 1998; Anónimo, *Indian J Med*  
*Res.*, Aug; 110:56-69; 1999). No obstante, la Organización Mundial de la Salud  
recomienda actualmente BCG en el nacimiento o primer contacto con los  
servicios sanitarios para todos los niños (excepto aquellos con síntomas de  
30 enfermedad de VIH/ SIDA) en países con TB extendida. Esta política se basa en  
la evidencia de que BCG protege frente a formas infantiles graves de TB  
(Lanckriet *et al.*, *Int J Epidemiol*, 24(5):1042-1049; 1995; Rodrigues *et al.*,  
*J Epidemiol Community Health* 45(1): 78-80; 1991). La protección mediante BCG  
frente a TB más allá de la primera infancia es un objeto controvertido con  
35 datos limitados que dan resultados mixtos. La alta incidencia de TB  
pediátrica y adulta en países en desarrollo donde se practica ampliamente la  
inmunización con BCG en lactantes, indica sin embargo que BCG tal como se  
administra actualmente no es altamente eficaz durante los muchos años en que  
las personas están en riesgo de enfermedad de TB. Por tanto, se considera que  
40 BCG es una herramienta de salud pública inadecuada para la intervención y el  
control de la TB.

Aproximadamente el 70 por ciento de los seres humanos expuestos a  
microorganismos de TB, y que tienen los sistemas inmunitarios normales, no  
llegan a infectarse, y de los que llegan a infectarse sólo aproximadamente el  
45 5 por ciento desarrolla enfermedad en el plazo de los primeros dos años. La  
mayoría de los individuos infectados eliminan la infección, que está asociada  
con el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares fuertes frente a  
antígenos de *M. tb*. Un 5 por ciento adicional se reactiva posteriormente  
cuando la inmunidad disminuye. Tanto la enfermedad primaria como la de  
50 reactivación son mucho más comunes en personas con VIH/SIDA, lo que pone de  
relieve de nuevo el papel de la inmunidad en la prevención y el control de  
infección.

Puesto que la mayoría de los seres humanos pueden controlar la TB, hay  
buenos motivos para esperar que mediante la inducción de la inmunidad de  
55 larga duración de la clase apropiada, debería ser posible desarrollar vacunas

eficaces que previenen la infección inicial tras la exposición, prevenir la evolución temprana de la enfermedad, prevenir la reactivación del estado latente, y prevenir la recidiva tras el tratamiento. Por último, la combinación del uso de vacuna sistemática más la intervención quimioterápica es lo que eliminará finalmente a *M. tb* como patógeno humano.

En vista del papel fundamental que se piensa que desempeña la vacunación de BCG infantil en la prevención de TB aguda, es difícil sustituir el BCG en ensayos para evaluar vacunas candidatas frente a la TB sin superar la evidencia de que la nueva vacuna frente a la TB sea un producto superior. El problema es que *M. tb* es un patógeno específico de seres humanos y los modelos animales sólo imitan partes de la interacción huésped-patógeno. Por tanto, la evidencia definitiva de que una nueva vacuna frente a la TB tiene potencia mejorada sólo puede obtenerse a partir de ensayos de campo controlados en seres humanos. Esta realidad ha llevado a muchos investigadores a concluir que una etapa clave hacia una vacuna frente a la TB mejorada será potenciar la inmunogenicidad de BCG.

Un ejemplo de una estrategia de este tipo es mejorar la capacidad de BCG para inducir o activar células T para potenciar la respuesta inmunitaria. El papel fundamental de las células T CD8<sup>+</sup> con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido en la inmunidad frente a *M. tb* se demuestra por la incapacidad de ratones deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) para controlar la infección por *M. tb* experimental (Flynn *et al.*, PNAS USA, 89(24): 12013-12017; 1992). El papel fundamental de células T CD8<sup>+</sup> con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido se demostró de manera convincente por la incapacidad de ratones deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) para controlar la infección por *M. tuberculosis* experimental (Flynn *et al.*, citado anteriormente, 1992). Debido a que estos ratones mutantes carecen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, no pueden desarrollarse células T CD8<sup>+</sup> funcionales. A diferencia de la infección por *M. tuberculosis*, los ratones deficientes en  $\beta$ 2m pueden controlar determinadas dosis infecciosas de la cepa de vacuna de BCG (Flynn *et al.*, citado anteriormente, 1992; Ladel C. H., *et al.*, Eur J Immunol, 25: 377-384; 1995). Además, la vacunación de BCG de ratones deficientes en  $\beta$ 2m sólo prolonga la supervivencia tras la infección por *M. tuberculosis*, mientras que C57BL/6 inmunizados con BCG resistieron a *M. tuberculosis* (Flynn *et al.*, citado anteriormente, 1992).

Esta dependencia de células T CD8<sup>+</sup> diferencial entre *M. tuberculosis* y BCG puede explicarse tal como sigue: los antígenos de *M. tuberculosis* consiguen mejor acceso al citoplasma que los antígenos de BCG, lo que conduce a presentación en complejo mayor de histocompatibilidad de clase I más pronunciada (Hess y Kaufmann, FEMS Microbiol. Immunol 7:95-103; 1993). Por consiguiente, se genera una respuesta de células T CD8 más eficaz mediante *M. tuberculosis*. Esta idea se apoyó recientemente por el aumento de la presentación en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I de un antígeno irrelevante, ovoalbúmina, mediante la infección simultánea con *M. tuberculosis*, en vez de con BCG, de las células presentadoras de antígenos (APC) (Mazzaccaro *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, Oct 15:93(21):11786-91; 1996).

Por tanto, los antígenos de *M. tb* acceden al citoplasma de la célula huésped mejor que los antígenos de BCG, lo que conduce al aumento de la presentación en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Hess *et al.*, citado anteriormente, 1993) y a una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> elevada frente a *M. tb*. Además, *M. tb* estimula las células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras con complejo mayor de histocompatibilidad de clase II restringido específicas de antígeno así como las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido en ratones y seres humanos (Kaufmann, Annu Rev Immunol 11:129-163; 1993). Por extensión, este hecho indica que las células infectadas por *M. tb* son susceptibles de

reconocimiento por las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido. Dado que el 70 por ciento de los seres humanos inmunocompetentes expuestos a los microorganismos de TB no llegan a infectarse, la inmunidad inducida por la infección de *M. tb* es altamente eficaz en el control de este microorganismo en la inmensa mayoría de los casos. Se cree, por tanto, que la eficacia de la cepa de vacuna de BCG frente a la TB existente mejorará mediante el aumento de la capacidad de BCG para inducir respuestas de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido (Kaufmann, *Fundamental Immunology*, 1997).

Como norma, los antígenos expresados por los patógenos que permanecen unido al fagosoma se presentan principalmente por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a las células T CD4<sup>+</sup> pero son poco reconocidas por las células T CD8<sup>+</sup>, que normalmente reconocen los antígenos presentados en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Kaufmann, citado anteriormente, 1997). Por el contrario, las bacterias intracelulares, tales como *Listeria monocytogenes* (por ejemplo, N.º de ATCC 13932), que escapan del fagosoma y se replican en el citoplasma de las células huésped son eficaces en el acceso a la ruta de presentación de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y en provocar respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> (Berche *et al.*, *J Immunol*, 138:2266-2276; 1987). Esta función de escape del endosoma de *Listeria monocytogenes* se transfirió recientemente a *Salmonella* atenuada, que reside normalmente en el fagosoma, introduciendo las secuencias que codifican para listeriolisina (Llo); se demostró que las cepas resultantes escapaban del endosoma y eran más eficaces en la inducción de respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> (Bielecki *et al.*, *Nature (Londres)*, 354:175-176; 1990; Gentshev *et al.*, *Infect Immun* 63(10):4202-4205; 1995; Hess *et al.*, *Host Response to Intracellular Pathogens*, 75-90; 1997). Más recientemente se aplicó este enfoque a BCG; así se construyeron cepas de BCGr que secretaban Llo para mejorar la capacidad de BCG para inducir respuestas inmunitarias con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido (Hess *et al.*, *PNAS USA*, 95(9):5299-5304; 1998. Aunque la evidencia inicial sugirió que una cepa de BCGr-Llo<sup>+</sup> era más hábil en provocar células T CD8<sup>+</sup>, la cepa demostró no poder escapar del endosoma. Por tanto, una limitación de este enfoque es que la función hemolítica de Llo, que se requiere para el escape del endosoma, sólo es completamente activa a pH 5,5 y casi inactiva a pH 7,0. En el documento US 2002/0177569 Al se describe una vacuna de BCG transformada para expresar listeriolisina. Sin embargo, la listeriolisina no puede escapar del endosoma a pH neutro. Puesto que las micobacterias mantienen el pH del endosoma a un valor de aprox. 7,0, es lógico suponer que Llo en las cepas de BCGr-Llo hasta ahora notificadas son disfuncionales debido a que el entorno en el que se expresan no es óptimo para la magnitud de actividad hemolítica (Geoffrey *et al.*, *Infect Immun* 55(7): 1641-1646; 1987). Por tanto, el beneficio de inmunopotenciación de este enfoque no se logrará hasta que se desarrolle una estrategia que permita que Llo funcione en endosomas manipulados por BCG.

La técnica anterior hasta ahora no ha proporcionado un BCGr con una capacidad mejorada para el escape del endosoma, y en el que pueda aumentarse de ese modo la inducción de, por ejemplo, respuestas de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I restringido.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Un aspecto a modo de ejemplo de la presente invención proporciona cepas de BCG recombinantes (BCGr) que tienen una capacidad potenciada para provocar una respuesta inmunitaria de células T CD8<sup>+</sup> con complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC) restringido. Estas cepas de BCGr novedosas se han modificado mediante ingeniería genética para expresar una proteína endosomalítica funcional que es bioactiva a valores de pH próximos a la neutralidad (por ejemplo, aproximadamente pH 6-8 o aproximadamente de 6,5 a 7,5). La proteína endosomalítica es por tanto activa dentro endosomas que

contienen micobacterias, que normalmente tienen un pH interno próximo a la neutralidad. La actividad de la proteína endosomalítica producida por BCGr da como resultado la ruptura del endosoma, permitiendo que BCGr escape del endosoma y vaya al interior del citoplasma de la célula. Los BCGr se exponen de ese modo en el citoplasma, y provocan una respuesta de células T fuerte, particularmente una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas con MHC-I restringido fuerte. En una realización de la invención, la proteína endosomalítica que se introduce en el BCGr mediante modificación por ingeniería genética es perfringolisina O (PfoA) de *Clostridium perfringens*.

La invención proporciona por tanto un *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética para expresar y secretar una proteína endosomalítica funcional que es activa a pH neutro. En algunas realizaciones, la proteína formadora de poros endosomalítica funcional es PfoA o PfoA mutante codificada por SEQ ID NO: 3 (denominada en el presente documento PfoA<sub>G137Q</sub>). La expresión de la proteína endosomalítica funcional por *Mycobacterium* permite el escape de BCGr de los endosomas. El *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética de ese modo puede ser un *Mycobacterium* atenuado tal como BCG. La invención también proporciona: un *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética para expresar y secretar PfoA; y, un *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética para expresar y secretar una PfoA<sub>G137Q</sub> codificada por SEQ ID NO: 3.

La presente invención proporciona además un método para permitir que un derivado de *Mycobacterium* escape de los endosomas. El método comprende la etapa de modificar mediante ingeniería genética el *Mycobacterium* para contener, expresar y secretar una proteína endosomalítica funcional tal como PfoA o PfoA<sub>G137Q</sub> tal como la codificada por SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* atenuado tal como BCG.

La invención proporciona además una preparación de vacuna, que comprende un *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética para expresar y secretar una proteína endosomalítica funcional que es activa a pH neutro. La proteína endosomalítica funcional puede ser, por ejemplo, PfoA o PfoA<sub>G137Q</sub> tal como la codificada por SEQ ID NO: 3. La expresión de la enzima endosomalítica funcional por *Mycobacterium* permite el escape del *Mycobacterium* recombinante de los endosomas. En algunas realizaciones, el *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* atenuado tal como BCG.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. El mapa para el vector suicida pAF102. La denotación para cada uno de los segmentos de ADN es tal como sigue: flanco L y flanco R: los flancos izquierdo y derecho del gen *ureC* respectivamente; *pfoA* es el gen que codifica para la forma mutante de perfringolisina O (número de registro de GenBank: BA000016) con un cambio de único aminoácido en 137G(Q); LP<sub>pAg85B</sub> es la secuencia de ADN que codifica para el péptido líder del antígeno 85B (es decir Rv1886c); P<sub>Ag85A</sub> es la secuencia promotora del gen 85A de antígeno (es decir Rv3804c); *aph* es el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (número de registro de GenBank: X06402), que confiere resistencia a kanamicina para el plásmido; OriE es el origen de replicación de pUC (número de registro de GenBank: AY234331); *Ble* es el gen (número de registro de GenBank: L36850) que confiere resistencia a zeocina para el plásmido; *SacB* es el gen (número de registro de GenBank: Y489048) que codifica para levansacarasa, que confiere sensibilidad de las bacterias a sacarosa; P<sub>hsp60</sub> es la secuencia promotora del gen de las proteínas de choque térmico (es decir Rv0440); MCS son los sitios de clonación múltiple para las enzimas de restricción indicadas. Obsérvese que el casete entre dos sitios *PacI* puede estar sustituido con otros genes de enzima endosomalítica cuando sea aplicable.

Figuras 2A y B. A, La secuencia génica de *PfoA* de *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 1); B, la secuencia proteica de *PfoA* de *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 2).

Figura 3. La secuencia génica de un mutante preferido, PfoA<sub>G137Q</sub> (SEQ ID NO: 3).

Figura 4. Diagrama de flujo para las etapas principales del intercambio alélico.

5 Figura 5. Digestión con enzima de restricción para el plásmido pAF102 de intercambio alélico.

Carril 1: marcador de tamaño molecular de ADM 1 Kb plus; Carril 2: Plásmido pAF102 digerido por la enzima de restricción EcoRI; Carril 3: plásmido pAF102 no digerido control; Carril 4: plásmido de vector pAF100 sin inserto de casete de PFO digerido por la enzima de restricción EcoRI. Carril 10 5: Plásmido de vector pAF100 sin inserto de casete de PFO no digerido control. A partir de esta figura, el plásmido pAF100 se lineariza para producir una única banda de 4,4 kb en tamaño mediante la enzima de restricción EcoRI según lo esperado. El plásmido pAF102 produjo dos bandas 15 con tamaño de 2,3 kb y 6,0 kb respectivamente mediante la enzima de restricción EcoRI según lo esperado.

Figura 6. Análisis por PCR de las colonias seleccionadas para el genotipo de  $\Delta$ *ureC::pfoA*. La PCR se llevó a cabo tal como se describe en 20 Materiales y métodos. Se analizó el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. El marcador de tamaño molecular de ADN usado fue 1Kb plus convencional adquirido de Invitrogen. Carriles 1-6: PCR para las colonias enumeradas de 105-1 a 105-6 respectivamente; carril 7 y carril 8: PCR para las colonias enumeradas 142-7 y 142-10, respectivamente. Carril 9: PCR para cepa danesa 1331 de BCG.

25 Figura 7. Crecimiento y sensibilidad a kanamicina de AFV102. Se inocularon bacterias de las cepas AFV102, danesa 1331 de BCG y constructo merodiploide de PfoA (Pfo105 MI) en los medios de crecimiento 7H9 y se comparó el crecimiento de cada cepa midiendo la densidad óptica a 600 nm en diferentes momentos. Para la prueba de la sensibilidad a kanamicina, se 30 añadió antibiótico hasta una concentración final de 50 ug/ml y se midió el crecimiento tal como anteriormente. Abreviaturas en la leyenda: Ctrl: medio de control sin ninguna inoculación bacteriana; +Kan o -Kan: con o sin kanamicina en el medio.

Figura 8. Prueba de citotoxicidad para AFV102 en células J774A.1. Se 35 infectaron las células con o bien AFV102 o bien danesa 1331 de BCG. En los momentos indicados tras la infección, se midió la viabilidad celular tal como se describe en Materiales y métodos mediante la comparación con el control no infectado.

Figura 9. Pruebas de AFV102 para determinar su capacidad de 40 supervivencia en macrófagos. Se infectaron células J774A.1 en monocapas con las cepas AFV102 o danesa 1331 de BCG, y en los momentos indicados tras la infección se contaron las bacterias intracelulares tal como se describe en Materiales y métodos.

Figura 10. Prueba de AFV102 para determinar su capacidad para secretar 45 la proteína Pfo con actividad hemolítica independiente del pH. Se preparó el cultivo de AFV102 tal como se describió anteriormente y se sometió a prueba el sobrenadante para determinar su capacidad para lisar glóbulos rojos a pH 7,0 y 5,5. Se midió la actividad de hemolisina tal como se describe en Materiales y métodos.

50 Figuras 11A-D. Ilustración esquemática de los resultados para le ejemplo 3. A, La bacteria (óvalo oscuro) invade un macrófago (óvalo gris) dentro de una célula (hexágono) en la que estimula la formación de endosomas tempranos; B, BCG detiene la maduración del endosoma y BCG se protege dentro del endosoma temprano; C, las bacterias AFV102 que expresan PfoA se encuentran 55 inicialmente en endosomas tempranos tras la invasión; sin embargo, comenzarán

a secretar PfoA y escaparán del endosoma; D, puede observarse que las bacterias AFV102 que expresan PfoA emergen del endosoma o están libres en la célula.

Figura 12. El mapa para el vector pAF105 de sobreexpresión de antígenos. La denotación para cada uno de los segmentos de ADN es tal como sigue: P<sub>Rv3130</sub> es la secuencia promotora del antígeno Rv3130c; P<sub>Ag85B</sub> es la secuencia promotora del antígeno Rv1886c. Los genes en el casete de expresión son Rv0288; Rv1886c y Rv3804c; *aph* es el gen aminoglucósido fosfotransferasa (número de registro de GenBank: X06402), que confiere resistencia a kanamicina; OriE es el origen de replicación de pUC (número de registro de GenBank: AY234331); *leuD* es el gen que codifica para 3-isopropilmalato deshidratasa (es decir Rv2987c); OriM es el origen de replicación en *Mycobacterium* (n.º de registro de Genbank: M23557).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un BCGr que puede escapar de los endosomas y acceder al citoplasma de la célula huésped de las células a las que infecta. Como resultado, se provoca una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> superior frente a BCGr en las células.

El BCGr se modifica mediante ingeniería genética para contener una endosomalisisina funcional que se expresa y secreta por BCGr, y que media el escape endosómico de BCGr. El término endosomalisisina en el presente documento se refiere a una proteína que puede romper la membrana endosómica lo suficiente como para permitir que una célula bacteriana pase del endosoma al interior del citosol. El término endosomalítico en el presente documento se refiere a una proteína que tiene dicha actividad de ruptura. El término endosomalisis en el presente documento se refiere al proceso de ruptura de la membrana endosómica lo suficiente como para permitir que una célula bacteriana pase del endosoma al interior del citosol. La proteína endosomalítica es activa en entornos con valores de pH próximos a la neutralidad, tal como dentro de los endosomas de células infectadas con micobacterias, y por tanto media el escape de las bacterias al interior del citoplasma.

En una realización de la presente invención, la proteína endosomalítica funcional que se introduce en las cepas de BCGr de la presente invención es PfoA de *Clostridium perfringens*, o una variante funcional de la misma. PfoA es una citolisina secretada por *Clostridium perfringens* que está codificada por el gen *pfoA* (n.º de registro de Genbank CPE0163). Las secuencias génica y proteica se muestran en la figura 2 A y B, respectivamente. PfoA media el escape bacteriano de los fagosomas, tanto en *Clostridium* como cuando se expresa por *B. subtilis* (Portnoy *et al.*, Infect Immun. Jul; 60(7): 2710-7; 1992). A diferencia de Llo, PfoA es activa tanto a pH 5,0 como a pH 7,0 y por tanto permanece activa en el citosol y provoca daño a células huésped infectadas (Portnoy *et al.*, citado anteriormente, 1992). Por tanto, cuando se expresó PfoA en *L. monocytogenes* en lugar de Llo, se permitió que la cepa escapara de los fagosomas (Jones y Portnoy, Infect Immun. Dec; 62(12): 5608-13; 1994). Sin embargo, su expresión también provocó daño a las células huésped. Llo presenta propiedades similares a PfoA, excepto que Llo es activa de manera óptima a pH 5,5 y presenta poca actividad a pH 7,0. Por tanto, Llo media el escape del endosoma una vez que el pH del endosoma disminuye hasta pH 5,5 pero no afecta a célula huésped porque el pH del citosol, que está próximo a la neutralidad, impide la actividad de Llo.

Portnoy *et al.* han demostrado además que cuando PfoA se expresa en *L. monocytogenes* en una forma de mutante con un cambio de único aminoácido, la forma de mutante de PfoA ya no es tóxica para las células huésped, aunque todavía puede mediar el escape bacteriano de una vacuola, y llevar a cabo el crecimiento intracelular (Portney *et al.*, citado anteriormente, 1992). La cepa DP-12791 particular, con una mutación que cambia Gly137 a Cln137 en Pfo (es decir PfoA<sub>G137Q</sub>), puede escapar del fagosoma de una manera similar al tipo

natural, pero sin producir un efecto tóxico sobre las células huésped. Además, PfoA<sub>G137Q</sub> es activa tanto a pH 5,6 como a pH 7,4 con una semivida citosólica reducida. La secuencia génica de PfoA<sub>G137Q</sub> se muestra en la figura 3 (SEQ ID NO: 3).

5 La expresión de PfoA permite el escape de los endosomas debido a que la actividad de formación de poros de PfoA conduce al daño de la membrana celular eucariota. PfoA forma poros en membranas que contienen colesterol mediante la inserción espontánea de su dominio en una bicapa. Esto sucede a través de la unión al colesterol, que actúa como receptor. Tras la unión, la  
10 toxina forma entonces una interfaz monómero-monómero (que se requiere para el ensamblaje de oligómero), se oligomeriza y realiza particiones en la membrana cambiando su estructura, que es dependiente de la unión a la membrana. La formación de oligómeros unidos a la membrana conduce al daño de la membrana y a la lisis final (Ramachandran *et al.*, Nature Structure and Molecular  
15 Biology, 11(8), 697-705 (1995). PfoA<sub>G137Q</sub> puede mediar la lisis de la vacuola de esta manera. La PfoA<sub>G137Q</sub> preferible tiene actividad limitada en el citoplasma de la célula huésped infectada, debido a su sensibilidad a las proteasas del huésped.

20 En una realización de la invención, la enzima endosomalítica funcional que se expresa por BCGr es PfoA que se deriva o se aísla de *C. perfringens*. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que también existen otras proteínas endosomalíticas que son activas a o cerca de la neutralidad que podrían ser adecuadas para su uso en la presente invención, concretamente pneumolisina (producida por *Streptococcus pneumoniae*), estreptolisina O  
25 (producida por *Streptococcus pyogenes*), cerolisina (producida por *Bacillus cereus*),  $\alpha$ -hemolisina (producida por *Staphylococcus aureus*), etc., y variantes funcionales de las mismas.

30 Mediante "proteína endosomalítica funcional" o "forma funcional" de una proteína (o el producto génico de un gen que "se expresa funcionalmente"), se quiere decir que la forma de la proteína que se produce por la bacteria BCGr muestra la magnitud de actividad característica que se conoce para la proteína nativa o natural ("tipo natural") en su organismo nativo. La magnitud de actividad de la forma funcional de la proteína producida por BCGr es, en general, al menos aproximadamente el 50 por ciento de la actividad  
35 habitual de la proteína de tipo natural cuando se somete a ensayo en condiciones convencionales tal como reconocen los expertos en la técnica. La magnitud de actividad de la proteína puede determinarse midiendo cualquier característica física observable, tal como unión a un ligando, o producción de un efecto, tal como escape de BCGr de los endosomas. Preferiblemente, la magnitud de actividad es al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,  
40 100%, o más de la magnitud de actividad convencional de la proteína de tipo natural cuando se somete a ensayo en condiciones convencionales tal como reconocen los expertos en la técnica.

45 Mediante "variante funcional" de una proteína, se quiere decir un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos aproximadamente el 70% a la de una proteína "de referencia" de tipo natural, y que conserva la magnitud de actividad funcional (tal como se describió anteriormente) de la proteína de tipo natural. La secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia de tipo natural se usa normalmente como punto de  
50 partida para mutaciones y alteraciones que se llevan a cabo por modificación mediante ingeniería genética.

Preferiblemente, una variante funcional es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que presenta aproximadamente el 75%, 80%, 85%, 90%,  
55 95% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de referencia. Tales variantes funcionales incluyen pero sin limitarse a secuencias de polipéptidos en las que se ha(n) realizado una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se conocen bien los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la

5 substitución de un aminoácido cargado positivamente por otro, de un aminoácido cargado negativamente por otro, de un aminoácido hidrófobo por otro, etc. Los polipéptidos variantes pueden contener una o más de tales substituciones, siempre que el polipéptido variante resultante conserve la magnitud de actividad funcional tal como se ha definido en el presente documento. "Variantes funcionales" también engloba otros cambios en la secuencia primaria del polipéptido de interés. Ejemplos de cambios incluyen pero sin limitarse a deleciones y adiciones de aminoácidos, o la modificación de aminoácidos (por ejemplo modificaciones químicas tales como sulfonación, 10 desamidación, fosforilación, hidroxilación, etc.). Tales cambios pueden ser el resultado de la modificación mediante ingeniería genética de una secuencia de aminoácidos de referencia, o puede ser el resultado de modificaciones tras la traducción de la proteína, o ambos. Además, las variantes funcionales de una enzima pueden ser el resultado de mutaciones naturales tales como las que se producen entre proteínas análogas con las mismas actividades o similares que se aíslan de diferentes cepas de una especie, o de diferentes especies, o de diferentes organismos individuales dentro de una especie. Las proteínas de tales variantes que se producen de manera natural pueden servir también como la proteína de referencia, y la secuencia de aminoácidos de una variante 15 natural de este tipo puede servir como la secuencia de referencia. En cualquier caso, todas las variantes funcionales de este tipo de una proteína de referencia conservan la magnitud de actividad de la proteína, tal como se describe en el presente documento.

25 Las homologías e identidades de secuencia tal como se describe en el presente documento no pretenden incluir secuencias heterólogas de aminoácidos que se derivan de fuentes distintas de la secuencia de referencia y que se unen a o se incluyen en la secuencia de polipéptido de una proteína para otros fines diversos. Ejemplos de tales secuencias heterólogas incluyen pero sin limitarse a secuencias que facilitan el aislamiento del polipéptido (por ejemplo colas de histidina), secuencias que facilitan la secreción o localización del polipéptido dentro de la célula, (por ejemplo diversas 30 secuencias líder o de direccionamiento), y secuencias que codifican para sitios de glicosilación (secuencias de glicosilación), etc.

35 En cualquier caso, la variante funcional conservará la magnitud de actividad de la proteína de la que es una variante hasta el grado de que la variante funcional presente al menos aproximadamente el 50 por ciento, y de manera preferible aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más, de la magnitud de actividad de la proteína de la que es una variante, cuando se somete a ensayo en condiciones convencionales tal como reconocen los expertos en la técnica. 40

Además, la presente invención también incluye secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas y variantes funcionales de proteínas utilizadas en la presente invención. Las secuencias de ácido nucleico pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o formas modificadas de 45 cualquiera de ellos, y pueden ser mono o bicatenarias. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención incluyen cualquiera que las enumeradas en el presente documento, y también pretenden abarcar variantes de las mismas. Por ejemplo, puede que las variantes de ácidos nucleicos no sean idénticas a las secuencias enumeradas aunque todavía pueden codificar para una secuencia de aminoácidos idéntica debido a la redundancia del código 50 genético. Alternativamente, pueden realizarse algunos cambios en las secuencias de la presente invención (por ejemplo substituciones, deleciones o adiciones) que dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos codificada, siempre que la secuencia de aminoácidos codificada sea una variante funcional de la secuencia de aminoácidos de referencia tal como se describió anteriormente. Ejemplos incluyen pero sin limitarse a: cambios que provocan sustituciones de aminoácidos conservativas en la enzima; y cambios que dan como resultado substituciones no conservativas, o deleción o 55 adiciones en las secuencias de aminoácidos. Tales cambios pueden introducirse por cualquier motivo, por ejemplo con el fin de alterar las modificaciones 60

tras la traducción de la enzima; para aumentar o reducir la solubilidad; para prevenir o introducir interacciones estéricas en el polipéptido traducido, etc. En general, las variantes de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención mostrarán al menos aproximadamente el 50 por ciento, y de manera preferible aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 100% de homología con las secuencias de referencia, tal como se determina mediante procedimientos comparativos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes también se caracterizan por mostrar la capacidad de unirse a las secuencias utilizadas en la presente invención en condiciones de alta rigurosidad. Los ensayos de unión de alta rigurosidad son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden aplicarse fácilmente a posibles variantes de prueba de las secuencias de la presente invención.

Homologías de secuencia tal como se describe en el presente documento no pretende referirse a secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias de aminoácidos heterólogas que se derivan de fuentes distintas de la secuencia de aminoácidos de referencia, y que se unen a o se incluyen en la secuencia de polipéptidos de una proteína para otros fines diversos. Por ejemplo, tales secuencias de ácido nucleico pueden codificar para secuencias de aminoácidos heterólogas incluyendo pero sin limitarse a: secuencias que facilitan el aislamiento de polipéptidos (por ejemplo colas de histidina), secuencias que facilitan la secreción o localización del polipéptido dentro de la célula, (por ejemplo, diversas secuencias líder o secuencias de direccionamiento), y secuencias que codifican para los sitios de glucosilación (secuencias de glucosilación), etc.

Otras variaciones de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención que la presente invención pretende abarcar son las secuencias que se han alterado por conveniencia o mejora en la modificación mediante ingeniería genética de las secuencias de ácido nucleico, o en la expresión de las secuencias de aminoácidos para las que codifican. En general, tales alteraciones no afectarán a la secuencia del polipéptido que se traduce finalmente a partir de la secuencia de ácido nucleico; o el polipéptido todavía cumplirá los criterios expuestos anteriormente para una variante funcional. Ejemplos de este tipo de alteración incluyen pero sin limitarse a: la inclusión de sitios de endonucleasa de restricción convenientes en una secuencia de ácido nucleico para facilitar la manipulación de la secuencia (por ejemplo para la inserción de una secuencia en un vector); la inclusión, delección, u otro cambio en una secuencia o secuencias implicada(s) en la expresión de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo inclusión de cualquiera de diversas secuencias promotoras y/o potenciadoras, señales de detención, superpromotores, promotores inducibles, y otras secuencias diversas que modifican la expresión de la secuencia de ácido nucleico); la inclusión de las secuencias que facilitan la interacción de un vector con el ácido nucleico de un organismo huésped; etc.

Además, las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden modificarse químicamente o incluir bases no tradicionales por cualquiera de muchos motivos que son bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, para potenciar la estabilidad del ácido nucleico, o para conferir una conformación estérica deseada.

Mediante "activo a pH neutro" y "activo a un pH de aproximadamente 7,0" se quiere decir que la enzima se activa a un valor de pH en el intervalo de desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, y preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.

La presente invención proporciona micobacterias recombinantes. En una realización preferida de la invención, las micobacterias se atenúan, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante BCG. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que existen otras micobacterias atenuadas y no atenuadas que también podrían ser adecuadas para su uso en la presente invención. Ejemplos de tipos adicionales de micobacterias incluyen pero sin limitarse a

la cepa CDC1551 de *M. tuberculosis* (véase, por ejemplo Griffith *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. Aug; 152(2):808; 1995), cepa Beijing de *M. tuberculosis* (Soolingen *et al.*, 1995), cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (N.º de ATCC: 25177), cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (N.º de ATCC: 25618), *M. bovis* (N.º de ATCC: 19211 y 27291), *M. fortuitum* (N.º de ATCC: 15073), *M. smegmatis* (N.º de ATCC: 12051 y 12549), *M. intracellulare* (N.º de ATCC: 35772 y 13209), *M. kansasii* (N.º de ATCC: 21982 y 35775) *M. avium* (N.º de ATCC: 19421 y 25291), *M. gallinarum* (N.º de ATCC: 19711), *M. vaccae* (N.º de ATCC: 15483 y 23024), *M. leprae* (N.º de ATCC:), *M. marinorum* (N.º de ATCC: 11566 y 11567) y *M. microtti* (N.º de ATCC: 11152).

Ejemplos de cepas de *Mycobacterium* atenuadas incluyen pero sin limitarse a cepa auxótrofa para pantotenato de *M. tuberculosis* (Sambandamurthy, Nat. Med. 2002 8(10):1171; 2002), cepa mutante para *rpoV* de *M. tuberculosis* (Collins *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 92(17): 8036; 1995), cepa auxótrofa para leucina de *M. tuberculosis* (Hondalus *et al.*, Infect. Immun. 68(5):2888; 2000), cepa danesa de BCG (N.º de ATCC 35733), cepa japonesa de BCG (N.º de ATCC 35737), cepa de Chicago de BCG (N.º de ATCC 27289), cepa de Copenhague de BCG (N.º de ATCC: 27290), cepa de Pasteur de BCG (N.º de ATCC: 35734), cepa de Glaxo de BCG (N.º de ATCC: 35741), cepa Connaught de BCG (N.º de ATCC 35745), BCG Montreal (N.º de ATCC 35746).

En una realización adicional de esta invención, las cepas de *Mycobacterium* atenuadas se modifican para potenciar la apoptosis, induciendo tales cepas fuertes respuestas inmunitarias celulares. Apoptosis es la muerte celular programada, que difiere espectacularmente de la muerte celular necrótica en lo que se refiere a su inducción y consecuencias. De hecho, el proceso por el que la apoptosis de células que contienen el antígeno da como resultado la inducción de inmunidad celular potente se ha denominado sensibilización cruzada (Heath *et al.*, Immunol Rev 199; 2004; Gallucci *et al.*, Nature Biotechnology. 5:1249; 1999; Albert *et al.*, Nature 392:86; 1998). Existen varios mecanismos para la inducción de apoptosis que conducen a un aumento de la inmunidad mediada por células específica de antígeno. La apoptosis mediada por caspasa 8 conduce a protección inmunitaria celular específica de antígeno (Sheridan *et al.*, Science 277:818; 1997).

Otra realización de la presente invención, por tanto, proporciona cepas de *Mycobacterium* atenuadas que presentan propiedades de pro-apoptosis potenciadas, tales como pero sin limitarse a SodA secretada por *secA1* que carece de un péptido líder de *Salmonella enteritidis* (n.º de registro de GenBank 1068147), *Escherichia coli* (n.º de registro de GenBank 1250070) o *Shigella flexneri* (n.º de registro de GenBank 1079977) o alternativamente una proteína SodA que no se secreta de manera natural tal como la SodA de *Listeria monocytogenes* EGD-e (n.º de registro de GenBank 986791). Tales cepas de *Mycobacterium* atenuadas no producen Sod extracelular y por tanto no suprimen respuestas inmunitarias del huésped, aunque sí expresan Sod intracelular, permitiendo así la supervivencia de dicho *Mycobacterium* (Edwards *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164(12): 2213-9; 2001). Alternativamente, las cepas de *Mycobacterium* atenuadas que presentan propiedades de pro-apoptosis potenciadas portan un gen de Rv3238c inactivado.

Alternativamente, la expresión de *Salmonella SopE* (n.º de registro de GenBank AAD54239, AAB51429 o AAC02071) o caspasa-8 (n.º de registro de GenBank AAD24962 o AAH06737) en el citoplasma de las células huésped por *Mycobacterium* atenuado en la presente invención conferirá un método poderoso para inducir muerte celular programada en el contexto de antígenos expresados por dicho *Mycobacterium* atenuado, produciendo altos niveles de inmunidad celular específica de antígeno.

El receptor de muerte 5 (DR-5) también conocido como TRAIL-R2 (receptor de TRAIL 2) o TNFR-SF-10B (miembro 10B de la superfamilia de factores de necrosis tumoral) también media la apoptosis mediada por la caspasa 8 (Sheridan *et al.*, 1997). La apoptosis inducida por reovirus está mediada por

TRAIL- DR5 que conduce a una eliminación posterior del virus (Clarke *et al.*, J. Virol. 74:8135; 2000). La expresión de DR-5, tal como DR-5 humano (n.º de registro de GenBank BAA33723), herpesvirus-6 (HHV-6) homólogo de DR-5 (n.º de registro de GenBank CAA58423) etc., por *Mycobacterium* atenuado en la presente invención proporciona un efecto adyuvante potente para la inducción de inmunidad celular específica de antígeno frente a antígenos de *M. tb*.

Además, también pueden inducirse que las células presentadoras de antígenos del huésped (tales como macrófagos y células dendríticas) experimenten apoptosis a través del ligamiento con Fas, que es un estímulo fuerte para la inducción de respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno (Chattergoon *et al.*, Nat. Biotechnol. 18:974; 2000). Por tanto, *Mycobacterium* atenuado que expresa Fas o proteína de fusión ectodominio de CD4/dominio citoplásmico de FAS inducirá apoptosis y aumentará las respuesta inmunitarias celulares específicas de antígeno.

En resumen, las cepas de *Mycobacterium* atenuadas que potencian la inducción de apoptosis proporcionan una herramienta potente para la inducción de respuestas celulares que conducen a destrucción celular mediada por el sistema inmunitario de células infectadas por *M. tb*, con eliminación, reducción o prevención posterior de la infección por *M. tb*.

Aún en otra realización de la presente invención, la vacuna frente a la TB de dos componentes pueden incluir cepas de *Mycobacterium* atenuadas que sobreexpresan al menos un antígeno de *Mycobacterium*, incluyendo pero sin limitarse a Rv0125, Rv0203, Rv0287, Rv0288, Rv0603, Rv1196, Rv1223, Rv1271c, Rv1733c, Rv1738 Rv1804c, Rv1886, Rv2031c, Rv2032, Rv2253, Rv2290, Rv2389c, Rv2626c, Rv2627c, Rv2779c, Rv2873, Rv2875, Rv3017c, Rv3407, Rv3804c, Rv3810, o Rv3841. Alternativamente, los antígenos de *Mycobacterium* sobreexpresados pueden estar en forma de una proteína de fusión compuesta por una o más de dichas proteínas de fusión de *Mycobacterium*, tales como Mtb72f (Brandt *et al.*, Infect. Immun., 72:6622-6632; 2004; Skeiky *et al.*, J. Immunol., 172:7618-7628; 2004), Hybrid-1 (Olsen *et al.*, Infect. Immun., 72:6148-6150; 2004; Langermans *et al.*, Vaccine, 23:2740-2750; 2005), Hyvac-4 (Dietrich *et al.*, J. Immunol., 174:6332-6339; 2005), etc.

Esta invención tiene utilidad en el desarrollo de vacunas frente a especies de *Mycobacterium* patógenas y en el desarrollo de vectores de vacuna de administración de antígeno. Un vector de *Mycobacterium* se define en el presente documento como cualquier cepa de *Mycobacterium* modificada por ingeniería genética para expresar al menos una secuencia de nucleótidos pasajera (denominada en el presente documento "PNS") compuesta por ADN o ARN y que codifica para cualquier combinación de antígenos, adyuvantes o factores inmunorreguladores, tal como se expone a continuación. La PNS puede introducirse en el cromosoma o como parte de un vector de expresión usando composiciones y métodos bien conocidas en la técnica (Jacobs *et al.*, Nature 327:532-535; 1987; Barletta *et al.*, Res Microbiol. 141:931-939; 1990; Kawahara *et al.*, Clin Immunol. 105:326-331; 2002; Lim *et al.*, SIDA Res Hum Retroviruses. 13:1573-1581;1997; Chujoh *et al.*, Vaccine, 20:797-804; 2001; Matsumoto *et al.*, Vaccine, 14:54-60; 1996; Haeseleer *et al.*, Mol Biochem Parasitol., 57:117-126; 1993).

En la presente invención, el vector de *Mycobacterium* puede portar un PNS que codifica para un inmunógeno, que puede ser o bien un inmunógeno extraño de patógenos virales, bacterianos y parasitarios, o un inmunógeno endógeno, tal como pero sin limitarse a un antígeno autoinmunitario o un antígeno tumoral. Los inmunógenos pueden ser la proteína nativa de longitud completa, fusiones quiméricas entre el inmunógeno extraño y una proteína endógena o mimética, un fragmento o fragmentos de los mismos de un inmunógeno que se origina a partir de patógenos virales, bacterianos y parasitarios.

Tal como se usa en el presente documento, "inmunógeno extraño" quiere decir una proteína o fragmento de la misma, que no se expresa normalmente en la célula o tejido del animal receptor, tal como, pero sin limitarse a,

proteínas virales, proteínas bacterianas, proteínas parasitarias, citocinas, quimiocinas, agentes inmunorreguladores o agentes terapéuticos.

Un "inmunógeno endógeno" quiere decir una proteína o parte de la misma que está presente de manera natural en la célula o tejido del animal receptor, tal como, pero sin limitarse a, una proteína celular endógena, un agente inmunorregulador, o un agente terapéutico. Alternativa o adicionalmente, el inmunógeno puede estar codificado por un gen sintético y puede construirse usando métodos de ADN recombinante convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

El inmunógeno extraño puede ser cualquier molécula que se expresa mediante cualquier patógeno viral, bacteriano o parasitario antes de o durante la introducción, colonización de, o replicación en su animal huésped; el vector de *Mycobacterium* puede expresar inmunógenos o partes de los mismos que se originan a partir de patógenos virales, bacterianos o parasitarios. Estos patógenos pueden ser infecciosos en huéspedes humanos, de animales domésticos o de animales salvajes.

Los patógenos virales, de los que se derivan los antígenos virales, incluyen pero sin limitarse a, ortomixovirus, tales como virus influenza (ID de taxonomía: 59771; retrovirus, tales como RSV, HTLV-1 (ID de taxonomía: 39015), y HTLVII (ID de taxonomía: 11909), herpesvirus tales como EBV (ID de taxonomía: 10295); CMV (ID de taxonomía: 10358) o virus del herpes simple (N.º de ATCC: VR-1487); lentivirus, tales como VIH-1 (ID de taxonomía: 12721) y VIH-2 (ID de taxonomía: 11709); rabdovirus, tales como el virus de la rabia; picornavirus, tales como poliovirus (ID de taxonomía: 12080); poxvirus, tales como vaccinia (ID de taxonomía: 10245); rotavirus (ID de taxonomía: 10912); y parvovirus, tales como el virus adenoasociados 1 (ID de taxonomía: 85106).

Ejemplos de antígenos virales pueden encontrarse en el grupo que incluye pero sin limitarse a los antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana Nef (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository N.º de Cat. 183; n.º de registro de GenBank AF238278), Gag, Env (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository N.º de Cat. 2433; n.º de registro de GenBank U39362), Tat (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository N.º de Cat. 827; n.º de registro de GenBank M13137), derivados mutantes de Tat, tales como Tat- $\Delta$ 31-45 (Agwale *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. En prensa 8 de julio de 2002), Rev (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository N.º de Cat. 2088; n.º de registro de GenBank L14572), y Pol (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository N.º de Cat. 238; n.º de registro de GenBank AJ237568) y epítomos de células B y T de gp120 (Hanke y McMichael, AIDS Immunol Lett., 66:177; 1999); (Hanke, *et al.*, Vaccine, 17:589; 1999); (Palker *et al.*, J. Immunol., 142:3612-3619; 1989) derivados quiméricos de Env y gp120 de VIH-1, tal como pero sin restringirse a fusión entre gp120 y CD4 (Fouts *et al.*, J. Virol., 74:11427-11436; 2000); derivados truncados o modificados de env de VIH-1, tales como pero sin restringirse a gp140 (Stamatos *et al.*, J Viral, 72:9656-9667; 1998) o derivados de Env y/o gp140 de VIH-1 de los mismos (Binley, *et al.*, J Virol, 76:2606-2616; 2002); (Sanders, *et al.*, J Virol, 74:5091-5100; 2000); (Binley, *et al.*, J Virol, 74:627-643; 2000), el antígeno de superficie de la hepatitis B (n.º de registro de GenBank AF043578); (Wu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:4726-4730; 1989); antígenos de rotavirus, tales como VP4 (n.º de registro de GenBank AJ293721; Mackow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:518-522; 1990) y VP7 (n.º de registro de GenBank AY003871;) (Green *et al.*, J. Virol., 62:1819-1823; 1988), antígenos del virus influenza tales como hemaglutinina o (n.º de registro de GenBank AJ404627); (Pertmer y Robinson, Virology, 257:406; 1999); nucleoproteína (n.º de registro de GenBank AJ289872); (Lin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 9654-9658; 2000) antígenos de virus del herpes simple tales como timidina cinasa (n.º de registro de GenBank AB047378); (Whitley *et al.*, New Generation Vaccines, 825-854; 2004).

Los patógenos bacterianos, de los que se derivan los antígenos bacterianos, incluyen pero sin limitarse a, *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Rickettsia spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, y *Borellia burgdorferi*.

Ejemplos de antígenos protectores de patógenos bacterianos incluyen los antígenos somáticos de *E. coli* enterotoxigénica, tal como el antígeno fimbrial CFA/I (Yamamoto et al., Infect. Immun., 50:925-928; 1985) y la subunidad B no tóxica de la toxina termolábil (Klipstein et al., Infect. Immun., 40:888-893; 1983); pertactina de *Bordetella pertussis* (Roberts et al., Vacc., 10:43-48; 1992), adenilato ciclasa-hemolisina de *B. pertussis* (Guiso et al., Micro. Path., 11:423-431; 1991), fragmento C de toxina tetánica de *Clostridium tetani* (Fairweather et al., Infect. Immun., 58:1323-1326; 1990), OspA de *Borellia burgdorferi* (Sikand, et al., Pediatrics, 108:123-128; 2001); (Wallich, et al., Infect Immun, 69:2130-2136; 2001), proteínas de la capa superficial paracrystalina protectora de *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi* (Carl, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 87:8237-8241; 1990), la listeriolisina (también conocida como "Llo" y "Hly") y/o la superóxido dismutasa (también conocida como "SOD" y "p60") de *Listeria monocytogenes* (Hess, et al., Infect. Immun. 65:1286-92; 1997; (Hess, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1458-1463; 1996); (Bouwer, et al., J. Exp. Med. 175:1467-71; 1992), la ureasa de *Helicobacter pylori* (Gomez-Duarte, et al., Vaccine 16, 460-71; 1998); Corthesy-Theulaz, et al., Infección & Immunity 66, 581-6; 1998), y el dominio de unión al receptor de toxina letal y/o el antígeno protector de *Bacillus anthrax* (Price, et al., Infect. Immun. 69, 4509-4515; 2001).

Los patógenos parasitarios, de los que se derivan los antígenos parasitarios, incluyen pero sin limitarse a, *Plasmodium spp.*, tal como *Plasmodium falciparum* (N.º de ATCC: 30145); *Trypanosome spp.*, tal como *Trypanosoma cruzi* (N.º de ATCC: 50797); *Giardia spp.*, tal como *Giardia intestinalis* (N.º de ATCC: 30888D); *Boophilus spp.*, *Babesia spp.*, tal como *Babesia microti* (N.º de ATCC: 30221); *Entamoeba spp.*, tal como *Entamoeba histolytica* (N.º de ATCC: 30015); *Eimeria spp.*, tal como *Eimeria maxima* (N.º de ATCC 40357); *Leishmania spp.* (ID de taxonomía: 38568); *Schistosoma spp.*, *Brugia spp.*, *Fasciola spp.*, *Dirofilaria spp.*, *Wuchereria spp.* y *Onchocerca spp.*

Ejemplos de antígenos protectores de patógenos parasitarios incluyen los antígenos del circumsporozoíto de *Plasmodium spp.* (Sadoff et al., Science 240:336-337; 1988), tal como el antígeno del circumsporozoíto de *P. bergerii* o el antígeno del circumsporozoíto de *P. falciparum*; el antígeno de superficie de merozoíto de *Plasmodium spp.* (Spetzler et al., Int. J. Pept. Prot. Res., 43:351-358; 1994); la lectina específica de galactosa de *Entamoeba histolytica* (Mann et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3248-3252; 1991), gp63 de *Leishmania spp.* (Russell et al., J. Immunol., 140:1274-1278; 1988); (Xu y Liew, Immunol., 84: 173-176; 1995), gp46 de *Leishmania major* (Handman et al., Vaccine, 18: 3011-3017; 2000), paramiosina de *Brugia malayi* (Li et al., Mol. Biochem. Parasitol., 49:315-323; 1991), la triosafosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* (Shoemaker et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:1842-1846; 1992); la proteína de tipo globina secretada de *Trichostrongylus colubriformis* (Frenkel et al., Mol. Biochem. Parasitol., 50:27-36; 1992); la glutatión-S-transferasa de *Fraciola hepatica* (Hillyer et al., Exp. Parasitol., 75:176-186; 1992), *Schistosoma bovis* y *S. japonicum* (Bashir et al., Trop. Geog. Med., 46:255-258; 1994); y KLH de *Schistosoma bovis* y *S. japonicum* (Bashir et al., citado anteriormente, 1994).

Tal como se mencionó anteriormente, el vector de *Mycobacterium* puede portar una PNS que codifica para un inmunógeno endógeno, que puede ser cualquier proteína celular, agente inmunorregulador, o agente terapéutico, o partes de los mismos, que pueden expresarse en la célula receptora, incluyendo pero sin limitarse a inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y

de tumor, o fragmentos y derivados de inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y de tumor de los mismos. Por tanto, en la presente invención, el vector de *Mycobacterium* puede portar una PNS que codifica para los inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y de tumor, o partes o derivados de los mismos. Alternativamente, el vector de *Mycobacterium* puede portar PNS sintéticas (tal como se describió anteriormente), que codifican para los inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y de tumor o partes de los mismos.

Ejemplos de antígenos específicos de tumor incluyen el antígeno específico de próstata (Gattuso *et al.*, Human Pathol., 26: 123-126; 1995), TAG-72 y CEA (Guadagni *et al.*, Int. J. Biol. Markers, 9:53-60; 1994), MAGE-1 y tirosinasa (Coulie *et al.*, J. Immunothera., 14:104-109; 1993). Recientemente, se han demostrado en ratones que la inmunización con células no malignas que expresan un antígeno tumoral proporciona un efecto de vacuna, y también ayuda al animal generar una respuesta inmunitaria para eliminar las células tumorales malignas que presentan el mismo antígeno (Koeppen *et al.*, Anal. N.Y. Acad. Sci., 690:244-255; 1993).

Ejemplos de antígenos de trasplante incluyen la molécula de CD3 en células T (Alegre *et al.*, Digest. Dis. Sci., 40:58-64; 1995). Se ha demostrado que el tratamiento con un anticuerpo frente al receptor de CD3 elimina rápidamente las células T circulantes e revierte el rechazo de trasplantes mediado por célula (Alegre *et al.*, citado anteriormente, 1995).

Ejemplos de antígenos autoinmunitarios incluyen cadena  $\beta$  de IAS (Topham *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 8005-8009; 1994). Se ha demostrado que la vacunación de ratones con un péptido de 18 aminoácidos de la cadena  $\beta$  de IAS proporciona protección y tratamiento a ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (Topham *et al.*, citado anteriormente, 1994).

#### Vectores de *Mycobacterium* que expresan un adyuvante

Es viable construir vectores de *Mycobacterium* que portan PNS que codifican para un inmunógeno y un adyuvante, y son útiles para provocar respuestas del huésped aumentadas frente al vector y el inmunógeno codificado por PNS. Alternativamente, es viable construir vectores de *Mycobacterium* que portan PNS que codifican para un adyuvante, que se administran en mezclas con otros vectores de *Mycobacterium* que portan PNS que codifican para al menos un inmunógeno para aumentar las respuestas del huésped frente a dicho inmunógeno codificado por el vector de *Mycobacterium* asociado.

El adyuvante particular codificado por PNS insertado en dicho vector de *Mycobacterium* no es crítico en la presente invención y puede ser la subunidad A de la toxina colérica (es decir CtxA; n.º de registro de GenBank X04171, AF175708, D30053, D30052,), o partes y/o derivados mutantes de los mismos (por ejemplo el dominio A1 de la subunidad A de Ctx (es decir CtxA1; n.º de registro de GenBank K02679)), de cualquier *Vibrio cholerae* clásico (por ejemplo cepa 395 de *V. cholerae*, N.º de ATCC 39541) o la cepa El Tor de *V. cholerae* (por ejemplo cepa 2125 de *V. cholerae*, N.º de ATCC 39050). Alternativamente, puede usarse cualquier toxina bacteriana que sea miembro de la familia de exotoxinas bacterianas que ribosilan adenosina difosfato (Krueger y Barbier, Clin. Microbiol. Rev., 8:34; 1995), en lugar de CtxA, por ejemplo la subunidad A de la toxina termolábil (denominada en el presente documento EltA) de *Escherichia coli* enterotoxigénica (n.º de registro de GenBank M35581), subunidad S1 de la toxina pertúsica (por ejemplo *ptxS1*, n.º de registro de GenBank AJ007364, AJ007363, AJ006159, AJ006157, etc.); como alternativa adicional, el adyuvante puede ser uno de adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella pertussis* (N.º de ATCC 8467), *Bordetella bronchiseptica* (N.º de ATCC 7773) o *Bordetella parapertussis* (N.º de ATCC 15237), por ejemplo los genes *cyaA* de *B. pertussis* (n.º de registro de GenBank X14199), *B. parapertussis* (n.º de registro de GenBank AJ249835) o *B. bronchiseptica* (n.º de registro de GenBank Z37112).

**Vector de *Mycobacterium* que expresa un agente inmunorregulador**

Aún otro enfoque supone el uso del vector de *Mycobacterium* que porta al menos una PNS que codifica para un inmunógeno y una citocina, que se usan para provocar respuestas de huésped aumentadas frente al vector de *Mycobacterium* con inmunógeno codificado por PNS. Alternativamente, es posible construir un vector de *Mycobacterium* que porta una PNS que codifica para dicha citocina sola, que se usan en mezclas con al menos otro vector de *Mycobacterium* que porta una PNS que codifica para un inmunógeno para aumentar las respuestas del huésped frente a los inmunógenos codificados por PNS expresados por el vector de *Mycobacterium* asociado.

La citocina particular codificada por el vector de *Mycobacterium* no es crítica en la presente invención e incluye, pero sin limitarse a, interleucina-4 (denominada en el presente documento "IL-4"; n.º de registro de GenBank AF352783 (IL-4 murina) o NM 000589 (IL-4 humana)), IL-5 (n.º de registro de GenBank M010558 (IL-5 murina) o NM000879 (IL-5 humana)), IL-6 (n.º de registro de GenBank M20572 (IL-6 murina) o M29150 (IL-6 humana)), IL-10 (n.º de registro de GenBank NM010548 (IL-10 murina) o AF418271 (IL-10 humana)), IL-12<sub>p40</sub> (n.º de registro de GenBank NM008352 (IL-12 p40 murina) o AY008847 (IL-12 p40 humana)), IL-12<sub>p70</sub> (n.º de registro de GenBank NM008351/NM008352 (IL-12 p35/40 murina) o AF093065/AY008847 (IL-12 p35/40 humana)), TGFβ (n.º de registro de GenBank NM011577 (TGFβ1 murino) o M60316 (TGFβ1 humano)), y TNFα n.º de registro de GenBank X02611 (TNFα murino) o M26331 (TNFα humano)).

El método específico usado para introducir un gen que codifica para un gen *Pfo* en el genoma de BCG no es una característica crítica de la invención y puede seleccionarse de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (Parish *et al.*, Microbiology, 145:3497-3503; 1999). Un método preferido supone el direccionamiento del gen *Pfo* al locus de *ureC*, dando como resultado de ese modo la inactivación de este último gen y creando un marcador para la selección de cepas modificadas (Qadri *et al.*, J Clin Micro. 20(6), 1198-1199; 1984). Para realizar esto, puede modificarse un plásmido de intercambio alélico sintético, tal como el plásmido descrito en la sección de ejemplos a continuación, para albergar secuencias de 1 kb que flanquean los extremos 5-prima y 3-prima del gen *ureC* (base de datos de genoma n.º Mb1881). Entonces se inserta el gen *PfoA* (Base de datos del genoma n.º CPE0163) entre las secuencias flanqueantes bajo el control del promotor Ag85B. Para secretar la proteína PfoA, se usa una secuencia de péptido líder Ag85B en lugar de la secuencia señal PfoA nativa para garantizar la secreción eficaz de las cepas de BCG recombinante.

El método mediante el que introducen plásmidos de intercambio alélico en las cepas de BCG diana no es una característica crucial de la presente invención y puede llevarse a cabo mediante protocolos de electroporación convencionales para *Mycobacterium*. De manera similar, el método específico para efectuar el intercambio alélico e introducir el alelo Pfo en el locus de *ureC* no es una característica crucial de la invención y puede seleccionarse de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector suicida tal como el representado en la figura 1 proporciona un método preferido, ya que este plásmido contiene dos marcadores de selección de antibiótico, minimizando así la selección de mutantes resistentes a antibiótico espontáneos. Durante el intercambio alélico, el segmento del gen de PfoA sustituye al gen *ureC* como resultado de la recombinación homóloga de las secuencias flanqueantes izquierda y derecha, dando como resultado de ese modo la integración cromosómica estable y la expresión de PfoA. Una ventaja de este enfoque es que no se requieren antibióticos para mantener el producto final, y no está presente el fenotipo o genotipo resistente a antibióticos en la cepa final. Esta es la realización preferida para los productos para uso humano (están "libres de antibióticos"). Un fenotipo negativo para UreC marcará cepas que han experimentado el intercambio alélico y ha sustituido

*ureC* por Pfo, entendiéndose que el fenotipo positivo para UreC también puede emplearse en determinadas aplicaciones.

5 En la presente invención, la ubicación de *pfoA* en el BCG no se limita a *ureC*. Otras ubicaciones incluyen pero sin limitarse a *pfoA* integrado en un plásmido, y el sitio de *attB* en el cromosoma. Los expertos en la técnica conocerán otras ubicaciones del cromosoma que son posibles sitios para la expresión e integración de *pfoA*.

10 La presente invención también proporciona preparaciones de vacuna para su uso para provocar una respuesta inmunitaria frente a tuberculosis. Las preparaciones de vacuna incluyen al menos una cepa de BCGr tal como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacológicamente adecuado. La preparación de tales composiciones para su uso como vacunas es bien conocida por los expertos en la técnica. Normalmente, tales composiciones se preparan o bien como suspensiones o bien como disoluciones líquidas, sin embargo, también se contemplan formas sólidas tales como comprimidos, 15 píldoras, polvos y similares. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquidos antes de la administración. La preparación también puede emulsionarse. Los principios activos pueden mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con los principios activos. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, rafinosa, glicerol, etanol y similares, o combinaciones de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, y similares. Además, 20 la composición puede contener otros adyuvantes.

Si se desea administrar una forma oral de la composición, pueden añadirse varios espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvante de dispersión o aglutinantes y similares. La composición de la presente invención puede contener cualquier componente adicional de este tipo para proporcionar la composición en una forma adecuada para la administración. La cantidad final de bacterias de BCGr en las formulaciones puede variar. Sin embargo, en general, la cantidad en las formulaciones irá desde aproximadamente el 1-99 por ciento. Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden comprender además un adyuvante, incluyendo los 35 ejemplos adecuados de los mismos, pero sin limitarse a, Seppic, Quil A, Alhydrogel, etc. Además, las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden contener un único tipo de BCGr. Alternativamente, puede utilizarse más de un tipo de BCGr en una vacuna.

40 La presente invención también proporciona métodos que provocan una respuesta inmunitaria frente a tuberculosis y métodos de vacunación de un mamífero frente a tuberculosis. Por provocar una respuesta inmunitaria, se quiere decir que la administración de la preparación de vacuna de la presente invención provoca la síntesis de anticuerpos específicos (en un título en el intervalo de 1 a  $1 \times 10^6$ , preferiblemente  $1 \times 10^3$ , más preferible en el 45 intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$ , y lo más preferiblemente superior a  $1 \times 10^6$ ) y/o proliferación celular, tal como se mide, por ejemplo mediante la incorporación de  $^3\text{H}$  timidina. Los métodos implican administrar una composición que comprende una cepa de BCGr de la presente invención en un vehículo farmacológicamente aceptable a un mamífero. 50 Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden administrarse mediante cualquiera de los muchos medios adecuados que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a mediante inyección, por vía oral, por vía intranasal, mediante ingestión de un producto alimenticio que contiene el BCGr, etc. En realizaciones preferidas, 55 el modo de administración es subcutáneo o intramuscular.

Los siguientes ejemplos son para considerarse a modo de ejemplo de diversos aspectos de la presente invención y no pretenden ser limitativos con respecto a la práctica de la invención. Los expertos habituales en la técnica

apreciarán que pueden variarse los procedimientos, condiciones y materiales alternativos y seguir estando dentro de la capacidad del experto habitual sin apartarse del alcance general de la invención tal como se enseña en la memoria descriptiva.

5

#### EJEMPLOS

Se ha demostrado el papel fundamental de las células T CD8+ con MHC de clase I restringido en la protección inmunitaria frente a TB (Flynn *et al.*, citado anteriormente, 1992). En un esfuerzo para mejorar la respuesta de las células T CD8, se ha modificado mediante ingeniería genética una cepa de BCG recombinante para que exprese listeriolisina de *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, este BCG recombinante (BCGr) no presenta una capacidad aumentada de escape endosómico, y por tanto no produce una inducción aumentada de, por ejemplo, respuestas de células T citotóxicas CD8+ con MHC de clase I restringido. Cuando se examina, la cepa presenta menos de un 1% de escape del endosoma. Esto no es sorprendente porque la actividad de la listeriolisina es altamente sensible al pH, por lo que la enzima probablemente no es activa al pH dentro endosoma. Pese a este inconveniente, la protección y seguridad de esta cepa recombinante mejoraron ambas drásticamente. Basándose en esta observación, se ha construido una nueva cepa de BCGr introduciendo PfoA<sub>G137Q</sub>, derivado de *Clostridium perfringens* en el cromosoma de BCG. PfoA<sub>G137Q</sub> tiene un cambio de aminoácido en la posición 137 desde G hasta Q. Este cambio de único aminoácido da como resultado la pérdida de toxicidad de PfoA de tipo natural en células de mamífero, aunque la enzima conserva su función endosomolítica. Se ha demostrado que la cepa resultante es segura e inmunogénica en un modelo de ratón.

#### Materiales y métodos: General

Para cada experimento descrito en las secciones siguientes, se usaron endonucleasas de restricción (en el presente documento "ER"); New England Biolabs Beverly, MA), ADN ligasa de T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) y Taq polimerasa (Life Technologies, Gaithersburg, MD) según los protocolos de los fabricantes; se preparó ADN de plásmido usando kits de purificación de ADN de plásmidos a pequeña escala (kit Miniprep<sup>®</sup> de Qiagen, Santa Clarita, CA) o a gran escala (kit Maxiprep<sup>®</sup> de Qiagen, Santa Clarita, CA) según los protocolos del fabricante (Qiagen, Santa Clarita, CA); se adquirieron agua mili-Q de calidad para biología molecular libre de nucleasa, Tris-HCl (pH 7,5), EDTA pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 1 M, etanol al 100% (v/v), agarosa ultrapura, y tampón de electroforesis en gel de agarosa de Life Technologies, Gaithersburg, MD. Se realizaron digestiones con ER, PCR, reacciones de ligación de ADN y electroforesis en gel de agarosa según procedimientos bien conocidos (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1, 2, 3; 1989); (Straus, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. Mar; 87(5): 1889-93; 1990). Se llevó a cabo la secuenciación de nucleótidos para verificar la secuencia de ADN de cada plásmido recombinante descrito en las secciones siguientes mediante técnicas de secuenciación de ADN automatizadas convencionales usando un secuenciador automático de Applied Biosystems, modelo 373A.

Se adquirieron cebadores de PCR de vendedores comerciales tales como Sigma (St. Louis, MO) o se sintetizaron usando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems (modelo 373A). Se usaron cebadores de PCR a una concentración de 150-250  $\mu$ M y se determinaron las temperaturas de hibridación para las reacciones de PCR usando el software Clone manager versión 4.1 (Scientific and Educational Software Inc., Durham, NC). Se realizaron las PCR en un dispositivo Strategene Robocycler, modelo 400880 (Strategene, La Jolla, CA). Los cebadores de PCR para las amplificaciones se diseñaron usando el software Clone Manager<sup>®</sup> versión 4.1 (Scientific and Educational Software Inc., Durham NC). Este software permite el diseño de los cebadores de PCR e identifica los sitios de ER que son compatibles con los fragmentos de ADN específicos que se están manipulando. Se realizaron PCR en un dispositivo termociclador, tal como el dispositivo Strategene Robocycler, modelo 400880

(Strategene), y se establecieron los tiempos de hibridación, elongación y desnaturalización del cebador en los PCR según procedimientos convencionales (Straus *et al.*, citado anteriormente 1990). Las digestiones por ER y los PCR se analizaron posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa usando procedimientos convencionales (Straus *et al.*, citado anteriormente 1990; y Sambrook *et al.*, citado anteriormente 1989). Un clon positivo se define como uno que presenta el patrón de ER y/o el patrón de PCR apropiados. Los plásmidos identificados a través de este procedimiento se evaluaron adicionalmente usando procedimientos de secuenciación de ADN convencionales, tal como se describió anteriormente.

Se adquirieron cepas de *Escherichia coli*, tales como DH5 $\alpha$  y Sable2<sup>R</sup>, de Life Technologies (Bethesda, MD) y sirvieron como huésped inicial de los plásmidos recombinantes. Los plásmidos recombinantes se introdujeron en las cepas de *E. coli* mediante electroporación usando un dispositivo de electropulsación de alto voltaje, tal como el Gen Pulser (BioRad Laboratories, Hercules, CA), fijado a 100-200  $\Omega$ , 15-25  $\mu$ F y 1,0-2,5 kV, tal como se describe (Straus *et al.*, citado anteriormente 1990). Se identificaron las condiciones de electroporación óptimas determinando los parámetros que daban como resultado tasas de transformación máximas por mcg de ADN por bacteria.

Normalmente las cepas bacterianas se hacen crecer en agar de tripticasa y soja (Difco, Detroit, MI) o en caldo de tripticasa y soja (Difco, Detroit, MI), que se realizó según las indicaciones del fabricante. A menos que se establezca lo contrario, las bacterias se hicieron crecer a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) con agitación suave. Cuando fue apropiado, los medios se complementaron con antibióticos (Sigma, St. Louis, MO). Las cepas bacterianas se almacenaron normalmente a -80°C suspendidas en (Difco) que contenía glicerol al 30% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) a aproximadamente 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (denominadas en el presente documento "ufc") por ml.

**Intercambio alélico en BCG.** La técnica anterior enseña métodos para introducir alelos alterados en cepas de *Mycobacterium* y los expertos en la técnica podrán interpretar y ejecutar los métodos (Parish *et al.*, Microbiology, 146:1969-1975; 2000). Un método novedoso para generar un plásmido de intercambio alélico supone el uso de ADN sintético. La ventaja de este enfoque es que el producto de plásmido tendrá una historia altamente definida y cumplirá con las normativas federales, mientras que los métodos usados anteriormente, aunque eficaces, tenían registros de cultivos de laboratorio escasamente documentados y por tanto, es poco probable que cumplieran con las normativas federales. El cumplimiento de estas normativas es esencial si va a aprobarse un producto para su uso en seres humanos por las autoridades normativas de Estados Unidos y Europa.

Un vector suicida para intercambio alélico en *Mycobacterium* es un plásmido que tiene capacidad de replicarse en cepas de *E. coli* pero que no puede replicarse en *Mycobacterium spp.*, tal como *M. tb* y BCG. El vector suicida específico para su uso en procedimientos de intercambio alélico en la presente invención no es importante y puede seleccionarse de los disponibles de fuentes académicas (Parish *et al.*, citado anteriormente, 2000) y comerciales. En la figura 1 se muestra un diseño preferido de un plásmido suicida para el intercambio alélico. El plásmido está compuesto por los siguientes segmentos de ADN: una secuencia de oriE para que el plásmido se replique en *E. coli* (N.º de registro de Genebank L09137), una secuencia resistente a kanamicina para la selección tanto en *E. coli* como en *Mycobacterium* (N.º de registro de Genebank AAM97345), y un marcador de selección de antibióticos adicional, por ejemplo el gen de resistencia a zeocina (N.º de registro de Genebank AAU06610), que está bajo el control de un promotor de *Mycobacterium* (por ejemplo el promotor *hsp60*). El segundo marcador de selección de antibióticos no es esencial pero puede incluirse para permitir una selección doble para evitar el crecimiento en exceso de

aislados espontáneos resistentes a kanamicina durante el proceso de intercambio alélico.

5 La construcción de tales vectores suicidas puede llevarse a cabo usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Sin embargo, los criterios normativos actuales (por ejemplo, las normas federales) han aumentado la amenaza de introducir partículas de priones adquiridas de productos expuestos a productos bovinos que contienen material infectado por BSE. Por tanto, para evitar introducir materiales (por ejemplo, secuencias de ADN) en la cepa diana de origen desconocido, es preferible que todos los ADN en el vector  
10 suicida se obtengan de manera sintética de fuentes comerciales (por ejemplo Picoscript, Inc.). Por consiguiente, un método preferido para construir vectores suicidas es preparar una planificación de las secuencias de ADN usando software de ADN (por ejemplo, Clone Manager), y luego sintetizar el ADN según se necesite por cualquier proveedor comercial que ofrezca un  
15 servicio de este tipo (por ejemplo, Picoscript Inc.). Este procedimiento se usó para diseñar y obtener el vector suicida utilizado en la sección de ejemplos a continuación.

20 El vector suicida de configuración descrito anteriormente (figura 1) tiene ventajas, puesto que este plásmido contiene dos marcadores de selección de antibióticos, minimizando así la selección de mutantes espontáneos que presentan resistencia a un antibiótico, lo que se produce en aproximadamente  $1/10^8$  por generación. La resistencia espontánea a dos antibióticos es extremadamente rara y sólo se produce en aproximadamente  $1/10^{16}$  por generación. Por tanto, hay menos de una probabilidad de  $1/10^6$  de que surjan cepas resistentes dobles en los cultivos usados para ejecutar el proceso de  
25 intercambio alélico.

30 Para la selección negativa durante el proceso de intercambio alélico, puede incluirse un gen *sacB* (N.º de registro de Genbank NT01BS4354), que confiere un fenotipo sensible a sacarosa, para enriquecer los cultivos con cepas que han experimentado la etapa de recombinación de ADN final y han completado el intercambio alélico.

**Cultivo de *Mycobacterium*.** Se hacen crecer en cultivo cepas de BCG seleccionadas en medios líquidos, tales como medio sintético Saulton o Middlebrook 7H9, preferiblemente a 37°C. Las cepas pueden mantenerse como  
35 cultivos estáticos o agitados. Además, la tasa de crecimiento de BCG puede mejorarse mediante la adición de ácido oleico (0,06% v/v; Research Diagnostics Cat. N.º 01257) y detergentes tales como Tyloxapol (0,05% v/v; Research Diagnostics N.º de Cat. 70400). La pureza de los cultivos de BCG puede evaluarse extendiendo uniformemente alícuotas de 100 µl del cultivo de BCG diluido en serie (por ejemplo etapas de 10 veces a partir de Neat -  $10^{-8}$ )  
40 en solución salina tamponada con fosfato (denominada en el presente documento PBS) en placas de 3,5 pulgadas que contenían 25-30 ml de medios sólidos, tales como Middlebrook 7H10. Además, la pureza del cultivo puede evaluarse adicionalmente usando medio disponible comercialmente tal como medio de tioglicolato (Science Lab, número de catálogo 1891) y medio de soja-caseína  
45 (BD, número de catálogo 211768).

Se almacenan lotes de BCG sembrados a -80°C a una densidad de  $0,1-2 \times 10^7$  ufc/ml. Normalmente, los cultivos líquidos se recogen a una densidad óptica (600 nm) de 0,2 - 4,0 con respecto a un control estéril; los cultivos  
50 se colocan en tubos de centrifuga de un tamaño apropiado y los microorganismos se someten a centrifugación a 8.000 x g durante 5-10 min. El sobrenadante se desecha y los microorganismos se resuspenden en disolución de almacenaje que está compuesta por Middlebrook 7H9 que contiene glicerol al 10-30% (v/v) a una densidad de  $0,1-2 \times 10^7$  ufc/ml. Estas suspensiones se  
55 dispensan en viales de congelación estériles de 1,5 ml de silicato de boro en alícuotas de 1 ml y luego se colocan a -80°C.

**EJEMPLO 1. Construcción de cepas de BCGr-PfoA que pueden escapar del endosoma**

Se llevó a cabo la construcción de cepas de BCGr-PfoA que pueden escapar del endosoma mediante intercambio alélico de las regiones flanqueantes del gen ureC. Como resultado, el segmento del gen de PfoA sustituyó al gen ureC, lo que permite la expresión cromosómica estable de PfoA. A continuación se describen los detalles específicos.

**Construcción del plásmido de intercambio alélico:**

El plásmido de intercambio alélico está compuesto por los siguientes segmentos de ADN: una secuencia de oriE para que el plásmido se replique en *E. coli*, una secuencia de gen resistente a kanamicina para la selección tanto en *E. coli* como en *Mycobacterium*, y un marcador de selección de antibióticos adicional (gen resistente a zeocina), que se expresa por el promotor Hsp60. El segundo marcador se usó para marcar una selección doble, evitando así la resistencia espontánea a kanamicina durante el proceso. Para la selección negativa durante el proceso de intercambio alélico, se usó un gen sensible a sacarosa. Finalmente, se incluyeron las secuencias flanqueantes de 1 kb izquierda y derecha del gen ureC para la cepa Danesa 1331 diana de BCG con el gen de PfoA entre ellas. El gen de PfoA se expresa bajo el control del promotor Ag85B. Se usó la secuencia de péptido líder Ag85B en lugar de la secuencia de señal de secreción original de PfoA para la secreción de PfoA. Finalmente, Picoscript Inc (Houston, TX) sintetizó y unió todos estos componentes. El plásmido resultante es un vector suicida micobacteriano y se obtuvo el mapa para el plásmido tal como se muestra en la figura 1. El constructo de plásmido resultante se confirmó tal como se muestra en la figura 5.

**Introducción del plásmido de intercambio alélico en la cepa Danesa 1331 de BCG de *Mycobacterium bovis***

El proceso de intercambio de alelo se ilustra esquemáticamente en la figura 4, que explica resumidamente las principales etapas del procedimiento. Estas etapas se describen en detalle a continuación.

Se hizo crecer en cultivo la cepa Danesa 1331 de BCG en medio 7H9 con aporte complementario del 10% de OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) (BD Gibco) y el 0,05% (v/v) de Tyloxapol (Research and Diagnostic Lab). Cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica, se recogieron las bacterias y se prepararon tal como se describió anteriormente (Sun *et al.*, 2004) para electroporación. Se introdujeron cinco microgramos del plásmido de intercambio alélico en células electrocompetentes preparadas recientemente usando metodologías convencionales.

El plásmido de intercambio alélico construido anteriormente se introdujo en la cepa Danesa 1331 de BCG de *M. bovis* mediante el protocolo de electroporación de micobacterias convencional para *Mycobacterium*. Tras la electroporación, se cultivaron las células durante la noche en medio 7H9 con aporte complementario del 10% (v/v) de OADC y el 0,05% (v/v) de Tyloxapol. Entonces se sembraron en placas las células en placas 7H10 que contenían 50 ug/ml tanto de kanamicina como de zeocina. Las colonias resultantes se recogieron y se cultivaron en medio 7H9 que contenía un 10% (v/v) de sacarosa. El cultivo obtenido se sembró en placa en placas 7H10 para clonación para obtener colonias individuales, que se identificaron para determinar la presencia del gen de PfoA en lugar de ureC. En la figura 4 se facilita un diagrama de flujo que explica resumidamente las principales etapas de este procedimiento y la tabla 1 describe el vector suicida, pAF 102, que también se representa en la figura 1.

Tabla 1. Vector suicida usado en la invención

Nombre	Estructura principal	Alelo específico para el intercambio alélico
pAF102	pAF 100	Gen de PfoA flanqueado por flancos de 1 kb del gen ureC

El ejemplo 1 muestra que la cepa de BCG de *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar una proteína endosomalítica seleccionada que es activa a pH neutro, lo que permite el escape del *Mycobacterium* de los endosomas al interior del citoplasma de la célula.

## EJEMPLO 2. Validación de la cepa de BCGr-PfoA

### Materiales y métodos para el ejemplo 2.

**Cultivo de *Mycobacterium*:** Para los experimentos siguientes, se cultivaron cepas de BCG a 37°C en medios Middlebrook 7H9 (BD biosciences) con aporte complementario del 10% de OADC. Se usó Tyloxapol (0,05% v/v, Research Diagnostics N.º de Cat. 70400) para dispersar las bacterias. En experimentos en los que se comparó el crecimiento entre diferentes cepas, se midió la densidad óptica (600 nm) a diferentes tiempos tras la inoculación. Para someter a prueba la sensibilidad a kanamicina, se preparó el cultivo y se midió el crecimiento como anteriormente excepto que se añadió la kanamicina hasta una concentración final de 50 ug/ml. Cuando se usó medio sólido para cultivar las bacterias, se usó agar Middlebrook 7H10 (BD biosciences). Cuando fue apropiado, se añadió la kanamicina hasta una concentración final de 50 ug/ml, y se añadió sacarosa hasta una concentración final del 3%.

**Prueba de la actividad ureasa:** Las colonias resultantes de las placas de sacarosa descritas en el ejemplo 1 se examinaron en primer lugar para determinar una falta de actividad ureasa usando el kit de prueba de ureasa (BD Difico) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se resuspendió un asa llena de bacterias en el tampón de prueba suministrado por el fabricante en un tubo transparente. Se usó la cepa Danesa 1331 de BCG como control positivo de ureasa. Se usó tampón solo como control negativo. Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y se juzgó el resultado basándose en las instrucciones del fabricante.

**Análisis del genotipo de cepas de BCGr que portan  $\Delta$ ureC:pfoA.** Se realizaron PCR con cebador directo [acggctaccgtctggacat] (SEQ ID NO: 4) y cebador inverso [cgatggcttcttcgatgc] (SEQ ID NO: 5) para amplificar la secuencia de ADN del alelo de inserción específico de Pfo y las secuencias genómicas de BCG del ADN que flanquea el gen ureC. Los parámetros de la PCR fueron los siguientes: Etapa 1: 95°C 4 minutos un ciclo; Etapa 2: 95°C un minuto, 60°C 1 minuto, y luego 72°C un minuto durante un total de 30 ciclos; Etapa 3: 72°C 10 minutos con un ciclo. Etapa 4: almacenamiento a 4°C. Los productos resultantes de las PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se secuenció mediante técnicas de secuenciación automáticas de didesoxinucleótidos, y se confirmó la presencia de un gen de longitud completa de PfoA en lugar del gen ureC (es decir  $\Delta$ ureC::PfoA).

**Crecimiento de AFV102 en macrófagos:** Se sometió a prueba el crecimiento de la cepa AFV102 de BCG *in situ* en células de tipo macrófago J774A.1 determinando las unidades formadoras de colonias (UFC) de micobacterias en los macrófagos infectados. Se determinó la eficacia de la fagocitosis de micobacterias sometiendo a prueba las UFC intracelulares tres horas tras la infección de las células J774A.1. Posteriormente se realizó un estudio de la supervivencia intracelular a largo plazo mediante la lisis de las células para liberar las bacterias intracelulares para contar las UFC tras lavar con PBS cinco veces, tal como se describió anteriormente (Sun et al., 2004).

**Análisis de la actividad hemolítica de la Pfo expresada por AFV102:** Para evaluar la secreción de PfoA por AFV102, se hizo crecer la cepa hasta fase semilogarítmica, tal como se describió anteriormente. Luego se recogieron los sobrenadantes de cultivo y las bacterias. Se resuspendió el sedimento bacteriano de AFV102 en 100  $\mu$ l de PBS (pH 7,0) que contenía un 0,1% de BSA en una placa de 96 pocillos con fondo en V. Para someter a prueba si la proteína PfoA se secretaba en el sobrenadante del cultivo, se centrifugó el cultivo líquido y se usó el sobrenadante para la prueba. Para someter a prueba la PfoA expresada para determinar su actividad de hemólisis independiente del pH, se prepararon las muestras como anteriormente, excepto que se usó tampón PBS con diferentes valores de pH como el tampón de reacción. Se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de eritrocitos de oveja lavados al 1%. Se mezcló suavemente la reacción y se incubó a 37°C durante 1 h con agitación. Se usó la bacteria de la cepa Danesa 1331 de BCG como control negativo de hemólisis. Se usó  $\alpha$ -hemolisina (Sigma) con unidades conocidas de actividad de hemolisina en dilución en serie como control positivo de hemólisis. Al final de la incubación, se sedimentó la reacción mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos, y luego se transfirió el sobrenadante de la placa de fondo en V a ubicaciones equivalentes en una placa de fondo plano de 96 pocillos y se midió la densidad óptica (absorbancia a 450 nm menos la absorbancia a 540 nm). Se cuantificó la actividad hemolítica de la molécula de PfoA midiendo la densidad óptica del cambio de color tras la hemólisis. La intensidad del color medida es proporcional a la cantidad de hemólisis, que entonces es proporcional a la cantidad de hemolisina. Entonces se leen los valores de la muestra sobre una curva patrón a través del uso de patrones conocidos. Las unidades hemolíticas se definieron como la dilución de la muestra a la que se lisó el 50% de los glóbulos rojos de oveja.

**Citotoxicidad de AFV102 para macrófagos:** Se determinó la citotoxicidad de la cepa recombinante en macrófagos J774A.1 (N.º de ATCC A TIB-67) midiendo la lactato deshidrogenada (LDH) liberada de las células infectadas usando un kit de "ensayo de proliferación celular en disolución acuosa Cell Titer 96" (Promega, N.º de Cat. G3580) según la instrucción del fabricante. En resumen, se infectaron las células con bacterias AFV102 a la multiplicidad de infección de 10. En diferentes momentos tras la infección, se midió el sobrenadante para determinar la cantidad de LDH liberada de las células, que luego se comparó con la de la cepa Danesa 1331 de BCG. Se usaron células normales no infectadas como control negativo. Se calculó el porcentaje de células viables basándose en la cantidad de LDH liberada de las células infectadas con respecto a la de las células de control negativo (100% de viabilidad celular).

## Resultados para el ejemplo 2.

**Construcción de AFV102:** Durante la construcción de AFV102, las bacterias merodiploides seleccionadas, que albergan el plásmido deficiente entero en su cromosoma a través del intercambio alélico de su segmento de ADN homólogo con el del plásmido deficiente, se cultivaron en placas de Middlebrook 7H10 que contenían sacarosa para el intercambio alélico final para sustituir el gen *ureC* por el casete de expresión de PfoA. De las colonias producidas en las placas de sacarosa, se encontró que una colonia Pfo-105-5 (con el nuevo nombre de AFV102) era negativa para ureasa, lo que sugiere que el gen *ureC* se había sustituido por el casete de expresión de PfoA. Esta colonia bacteriana se sometió adicionalmente a análisis del genotipo mediante PCR para determinar el genotipo de  $\Delta ureC::\Omega pfoA$ . Se analizó la reacción de PCR resultante mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1,2% y los resultados se presentan en la figura 6. Como puede observarse, la PCR que usa esta bacteria como molde produjo un producto de PCR del tamaño esperado, que es mayor que el de la cepa Danesa 1331 de BCG parental. El tamaño esperado de la banda de ADN para el genotipo de  $\Delta ureC::\Omega pfoA$  es 2180 pb, mientras que para la cepa Danesa 1331 de BCG parental el tamaño es de 1967 pb. Se purificó en gel adicionalmente el producto de PCR para la colonia 105-5 y se secuenció

en la instalación de secuenciación comercial de la Universidad Johns Hopkins (Baltimás, MD). El resultado de la secuenciación mostró que esta colonia tenía el genotipo esperado de  $\Delta ureC::\Omega pfoA$ . Además, la PCR dirigida a amplificar el gen de kanamicina y el gen *sacB* de la cepa AFV102 no produjo ningún producto de PCR (datos no mostrados). Estos hallazgos sugieren que AFV102 ha experimentado la etapa de intercambio alélico final y tiene el genotipo deseado de  $\Delta ureC::\Omega pfoA$ .

**Prueba de sensibilidad a kanamicina y caracterización del crecimiento para AFV102:** Basándose en la prueba de la actividad ureasa y en los resultados del genotipado, el clon 105-5 (con el nuevo nombre de AFV102) mostró el fenotipo esperado y el genotipo deseado  $\Delta ureC::\Omega pfoA$ . Entonces se sometió a prueba adicionalmente AFV102 para determinar su capacidad para crecer en medio de crecimiento 7H9 en comparación con la de la cepa Danesa 1331 de BCG parental. El resultado se muestra en la figura 7. Como puede observarse, el constructo de AFV102 tiene una curva de proliferación muy similar en medio de crecimiento 7H9 a la de la cepa parental. Además, en presencia de kanamicina, el crecimiento de AFV102 disminuyó hasta un grado similar al de la cepa Danesa 1331 de BCG parental, lo que sugiere que, tal como se esperaba, tiene una sensibilidad a kanamicina similar.

**Citotoxicidad de AFV102:** Se ha notificado que el cambio de un único aminoácido en la proteína PfoA (mutación de sustitución en el codón 137 de gga, que codifica para Gly, a cag, que codifica para Gln) da como resultado la pérdida de toxicidad para células de mamífero. Sin embargo, la proteína conserva la capacidad de mediar el escape bacteriano de una vacuola (Portnoy citado anteriormente, 1996). Se evaluó la toxicidad de la proteína expresada a partir de AFV102 infectando células J7741A con bacterias AFV102. Cuando se comparó con la célula normal no infectada control en diferentes puntos de tiempo tras la infección, AFV102 ya no produjo muerte celular más significativa que la cepa de vacuna Danesa 1331 de BCG usada actualmente (figura 8).

**Supervivencia en una línea celular de macrófagos alveolares:** Para investigar si el constructo puede sobrevivir sin macrófagos, se usaron cultivos en fase semilogarítmica para infectar macrófagos alveolares J774A.1. Se infectaron las células con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1. Se monitorizó la supervivencia intracelular de *Mycobacterium* mediante recuento en placa de la bacteria a diversos intervalos de tiempo tras la infección. Como puede observarse en la figura 9, el constructo de AFV102 mostró un fenotipo de persistencia similar al de la cepa parental, lo que sugiere ausencia de defecto en la supervivencia intracelular para este constructo en células J774A.1.

**Secreción de la proteína PfoA por AFV102:** Se sometió a prueba la secreción de la proteína PfoA por bacterias que contienen el constructo AFV102 midiendo el sobrenadante del cultivo bacteriano para determinar la actividad hemolítica potenciada en comparación con la de la cepa Danesa 1331 de BCG. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo tanto para AFV102 como para la cepa Danesa 1331 de BCG a la misma densidad óptica y se compararon para determinar la capacidad para lisar glóbulos rojos. Los resultados se muestran en la figura 10. De acuerdo con el informe anterior, el sobrenadante del cultivo de BCG mostró un nivel inicial de actividad hemolítica como resultado de los metabolitos que liberan las bacterias durante el crecimiento, lo que puede dar como resultado la hemólisis (Grode et al., Journal of Clinical Investigation, 115:2472-2479; 2005). En cambio, el sobrenadante del cultivo de AFV102 tuvo un nivel superior significativo de actividad hemolítica en comparación con la de la cepa Danesa 1331 de BCG, lo que está de acuerdo con la secreción de moléculas de PfoA en el sobrenadante del cultivo. Además, se sometió a prueba adicionalmente la actividad hemolítica independiente del pH de PfoA y se comparó a los pH de 5,5 y 7,0, y los resultados se muestran en la figura 10. Como puede observarse, el sobrenadante de AFV102 tuvo una capacidad hemolítica similar tanto a pH 5,5

como a 7,0, lo que sugiere que la actividad hemolítica secretada por la proteína PfoA es independiente del pH, tal como se esperaba.

El ejemplo 2 muestra que la cepa construida tiene las actividades biológicas previstas y que Pfo fabricada por la cepa se secreta y tiene actividad independiente del pH.

### **Ejemplo 3. Prueba de inmunogenicidad en animales y escape endosómico de rBCGr-PfoA**

Un paradigma fundamental de la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis* es la detención de la maduración fagosómica. Armstrong y Hart (1971) establecieron que los fagosomas de *M. tuberculosis* no se mezclan con lisosomas marcados con ferritina, lo que se denomina la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma. También se encontró que la cepa de vacuna *M. bovis* (BCG) reside en el compartimento fagosómico, aislado de los organelos endocíticos terminales (Clemens y Horwitz, 1995; Hasan *et al.*, 1997; Via *et al.*, 1997). Clemens y Howitz (1995) encontraron que los fagosomas de micobacterias se tiñen de manera persistente para el receptor de transferrina (TfR) a densidades similares a las de la membrana plasmática. El receptor de transferían normalmente se elimina rápidamente ( $t_{1/2}$  en minutos) de los endosomas y se transporta de nuevo a la membrana plasmática; sin embargo, en los fagosomas de micobacterias este proceso se detiene y los fagosomas contendrán el receptor de transferían. Este fenómeno es el que permitió visualizar los fagosomas que contenían las micobacterias. Los fagosomas se marcaron con anticuerpos frente al receptor de transferrina. Al mismo tiempo, se tiñeron las micobacterias con un colorante fluorescente que permite la monitorización visual del destino de las bacterias una vez dentro del fagosoma. Los resultados mostraron que el constructo de BCGr-Pfo podía escapar del endosoma tras infectar las células.

**Materiales y método para la prueba de escape endosómico:** Bacterias y células: Se hicieron crecer la cepa Danesa 1331 de BCG y  $\Delta$ *ureC::*  $\Omega$ *pfoA*<sub>G137Q</sub> BCGr-(AFV102) en medio 7H9 con aporte complementario del 10% (v/v) de OADC y el 0,05% (v/v) de Tyloxapol (del medio de crecimiento) a una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8-1,0. Antes de la infección, las células bacterianas se marcaron con succinimidil éster Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS a temperatura ambiente durante 1-1,5 horas según las instrucciones del fabricante. Este colorante forma enlaces de amida muy estables con las aminas primarias ubicadas en las proteínas en la superficie bacteriana. En resumen, se sedimentaron 10 ml del cultivo bacteriano y se resuspendieron en 25 ml de 0,625 ug/ml de Alexa Fluor 568 en PBS (pH 7,2) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1-1,5 horas para marcar las bacterias. Entonces se lavaron las células bacterianas marcadas tres veces con PBS y se resuspendieron en medio de crecimiento 7H9 y se almacenaron en la nevera durante la noche. Se cultivaron células J774A.1 en medio DMEM tal como se describió anteriormente (Sun *et al.*, 2004) en placas de cultivo celular de 6 pocillos en portaobjetos recubiertos con fibronectina humana. Se sembraron en placa las células a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/pocillo y se cultivaron durante 2 días en un incubador a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y humedad. Durante la infección, se sedimentaron las bacterias marcadas y se resuspendieron en DMEM + el 10% de medio FBS y se añadieron directamente a las células J774A.1 con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 por cada célula. Tras 20 min., 8 horas y 24 horas, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) a temperatura ambiente (TA). Entonces se fijaron las células durante 20 minutos a TA con paraformaldehído al 2% en PBS (pH 7,2). Entonces se permeabilizaron las células fijadas con Triton X-10 al 0,1% en PBS (pH 7,2) durante 10 minutos a TA seguido por lavado dos veces con PBS (pH 7,2). Se realizó el bloqueo durante al menos 2 horas a TA o durante la noche a 4°C con albúmina sérica bovina (BSA) al 3%, suero de cabra normal (NGS) al 5% y azida sódica al 0,5% en PBS (pH 7,2). Se eliminó el tampón de bloqueo y luego se añadió anticuerpo de rata anti-receptor de transferencia de ratón-FITC (US Biological, Swampscott, MA) a una dilución de 1:50 en PBS (pH 7,2)

que contenía BSA al 1%, NGS al 3% y azida sódica al 0,5% seguido por incubación a TA durante al menos 1 hora. Entonces se lavaron las células 2-3 veces con PBS y se montaron con medios de montaje Vectsheild en portaobjetos de vidrio. Se realizó el análisis a 1500 aumentos usando un microscopio invertido Nikon TE2000 equipado con una cámara digital con filtro IR, refrigerada de 12 bit Retiga EXI Mono para la obtención de imágenes.

**Resultado:** Cuando se examinan bajo el microscopio, se encontró que las células huésped habían internalizado tanto las bacterias BCG como BCGr-PfoA quince minutos tras la infección. Sin embargo, a las 8 horas tras la infección, se encontraron bacterias BCGr-PfoA fuera del endosoma, a diferencia de las bacterias BCG, que se encontraron ubicadas principalmente dentro del fagosoma del huésped. Estos resultados se ilustran esquemáticamente en la figuras 11A-D, que ilustra la invasión bacteriana de un macrófago (figura 11A), la persistencia de BCG dentro del endosoma (figura 11B), la bacteria AFV102 dentro de un endosoma temprano (figura 11C) y las bacterias AFV102 que escapan del endosoma al interior del citoplasma de la célula (figura 11D) debido a la secreción de PfoA recombinante. El recuento de las bacterias demostró que 100 AVF102 de las 138 habían escapado del endosoma (72%) después de 8 horas tras la infección, mientras que sólo 29 BCG de 100 (26%) habían escapado del fagosoma. El examen de las bacterias en la muestra 24 horas tras la infección dio un resultado similar. Este hallazgo muestra que la expresión de PfoA aumenta la liberación de AVF102 de los fagosomas.

Se llevó a cabo la confirmación adicional de este resultado usando un sistema diferente en el que se usó un colorante sensible al pH para marcar endosomas y lisosomas (Lysotracker-Red, Molecular probes, número de catálogo L-7528) con un procedimiento y parámetros experimentales similares a los anteriores. Las bacterias se visualizaron a emisiones de longitud de onda de 568, mientras que los fagosomas se visualizaron a emisiones de longitud de onda de 488. El resultado concordó con las observaciones anteriores.

El ejemplo 3 muestra que la cepa AVF102 recombinante podía escapar del endosoma mientras que la cepa de BCG era mucho menos eficaz escapando del endosoma. Por tanto, es mucho más probable que la cepa AVF102 provoque una respuesta inmunitaria del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I que BCG, y sería útil en aplicaciones de vacunas.

#### Referencias para el ejemplo 3.

Armstrong J, Hart PD. 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. J Exp Med. 134:713-40.

*Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. Infect Immun. 68(9):5154-66. Hasan Z, Schlax C, Kuhn L, Lefkovits I, Young D, Thole J, Pieters J. 1997. Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. Mol Microbiol 25(2):427

Via LE, Deretic D; Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. J Biol Chem. 1997. 272(20):13326-31.

Sun R, Converse PJ, Ko C, Tyagi S, Morrison NE, Bishai WR. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gen set. Mol Microbiol. 52(1): 25-38

#### EJEMPLO 4. Estrategias de formulación y vacunación.

La estrategia para la formulación de vacunas se basa en estudios para determinar la viabilidad y estabilidad máximas a lo largo de todo el proceso

de fabricación. Esto incluye la determinación de la viabilidad máxima del microorganismo (vivos con respecto a muertos) durante el cultivo utilizando una variedad de medios usados comúnmente para el cultivo de micobacterias incluyendo la adición de glicerol, azúcares, aminoácidos y detergentes o sales. Tras el cultivo, se recogen las células mediante centrifugación o filtración de flujo tangencial y se resuspenden en un medio de estabilización que permite la protección de las células durante la congelación o liofilización. Los agentes de estabilización usados comúnmente incluyen glutamato de sodio, aminoácidos o derivados de aminoácidos, glicerol, azúcares y sales usadas comúnmente. La formulación final proporcionará suficientes microorganismos viables para administrarse mediante administración oral, perfusión, inyección percutánea o intradérmica con estabilidad suficiente para mantener una semivida adecuada para la distribución y el uso.

## 15 Evaluación preclínica de las vacunas de TB

**Prueba de seguridad general.** Se infectan ratones BALB/c en grupos de 6 por vía intraperitoneal con  $2 \times 10^6$  UFC de la(s) cepa(s) de BCGr de interés y las cepas parentales análogas. Se monitorizan los animales para comprobar la salud general y el peso corporal durante 14 días tras la infección. Los animales que reciben las cepas de BCG y de BCGr se mantienen sanas, y ni pierden peso ni presentan señales manifiestas de enfermedad durante el periodo de observación.

### **Virulencia de las cepas de BCGr novedosas en ratones inmunocompetentes.**

Se infectan grupos de 15 ratones BALB/c inmunocompetentes por vía intravenosa con  $2 \times 10^6$  cepas de BCGr y BCG parentales, respectivamente. En el día 1 tras la infección, se sacrifican tres ratones en cada grupo y se analizan las UFC en bazo, pulmón e hígado para garantizar que cada animal tenía una dosis igual de infección. En las semanas 4, 8, 12 y 16 tras la infección, se sacrifican tres ratones en cada grupo y se obtienen las UFC en bazo, hígado y pulmón para evaluar el crecimiento *in vivo* de las cepas de BCGr en comparación con la cepa de BCG parental.

**Prueba de seguridad rigurosa en ratones inmunocomprometidos.** Se infectan ratones inmunocomprometidos que poseen el fenotipo SCID (inmunodeficiencia combinada grave) en grupos de 10 por vía intravenosa con  $2 \times 10^6$  ufc de BCGr y la cepa de BCG parental. En el día 1 tras la infección, se sacrifican tres ratones en cada grupo y se evalúan las ufc en bazo, hígado y pulmón para verificar la dosis de inoculación. Se monitorizan los siete ratones restantes en cada grupo para comprobar la salud general el peso corporal. Se realiza un seguimiento de la supervivencia de estos ratones y se compara la supervivencia de los ratones infectados por BCGr con la de los animales infectados con la cepa parental durante todo el periodo de observación.

**Prueba de seguridad en cobayas.** También se evalúa la seguridad de las cepas de BCGr en el modelo de cobaya en comparación con la vacuna de BCG parental, que tiene un perfil de seguridad bien establecido en seres humanos. En primer lugar, se examina el efecto de la vacuna sobre el estado de salud general de los animales, incluyendo el aumento de peso. Se inmunizan las cobayas por vía intramuscular con  $10^7$  (100x de dosis de vacunación) UFC de las cepas recombinante y parental, y se monitoriza a los animales para comprobar la salud general y el peso corporal durante seis semanas. Se realiza el examen post mortem para los animales que mueren antes del periodo de seis semanas. Se sacrifican todos los animales al final de las seis semanas tras la infección y se realiza anatomía patológica macroscópica. Para la confirmación según esta prueba, no se observó ni pérdida de peso corporal ni comportamiento anómalo, y todos los órganos parecen normales en la autopsia a las seis semanas, y/o no se observan efectos adversos en la salud para la vacuna de BCGr-PfoA, y los animales vacunados con BCGr-PfoA aumentan de peso a la tasa normal en comparación con los animales inoculados con la cepa parental.

Al mismo tiempo, se monitorizan los niveles bacterianos en los órganos de los animales. Se sacrifican las cobayas inmunizadas con vacuna o bien parental o bien recombinante a diversos intervalos tras la inoculación, tras lo que se someten a ensayo los pulmones, bazos y ganglios linfáticos regionales (inguinales) para determinar las UFC de BCG o BCGr.

**Prueba de toxicidad.** Para evaluar la toxicidad de las cepas de BCGr, se vacunan cobayas (12 en cada grupo) por vía intradérmica con 1 dosis, cuatro veces superior a la dosis individual o cuatro veces inferior a la dosis individual de cepas de BCGr, cepa de BCG parental o solución salina para uso en seres humanos. En el día 3 tras la vacunación, se sacrifican seis animales para determinar los efectos agudos de la vacuna en estos animales. En el día 28 tras la vacunación, se sacrifican los seis animales restantes para evaluar los efectos crónicos en los animales. En ambos puntos de tiempo, se obtiene el peso corporal de cada animal y se realiza anatomía patológica macroscópica y se examina el aspecto de los sitios de inyección. Se extrae sangre para la bioquímica sanguínea y se realiza la histopatología de los órganos internos y los sitios de inyección.

**Estudio de protección murina.** Se inmunizan ratones C57Bl/6 (hembras, 5-6 semanas de edad) en grupos de 13 por vía subcutánea con  $10^6$  UFC de BCGr, BCG parental o solución salina. Se usa otro grupo de ratones como controles sanos. Ocho semanas tras la inmunización, se expone a los ratones a la cepa Erdman de *M. tb* (o a la cepa H37Rv resistente a kanamicina) mediante un aerosol generado a partir de una suspensión celular individual de 10 ml que contiene un total de  $10^7$  UFC de la cepa a la que se ha expuesto, una dosis que administra ~100 bacterias vivas a los pulmones de cada animal, tal como se describió anteriormente (Brodin *et al.*, J Infect Dis., 190(1):115-122; 2004). Se monitorizan a los animales inoculados para determinar la supervivencia junto con los animales no expuestos. Tras la exposición, se monitorizan a los animales para comprobar la pérdida de peso y la salud general. En el día 1 tras la exposición, se sacrifican tres ratones en cada grupo para determinar las UFC de pulmón para confirmar la dosis de exposición y se sacrifica un animal para determinar la histopatología de bazo y pulmón. Cinco semanas tras la exposición, se sacrifican nueve animales en cada grupo y se realizan análisis de histopatología y microbiología de los animales. Se evalúan tejidos de pulmón y bazo de seis ratones para los recuentos de UFC (se usan placas con aportes complementarios de selección para distinguir la cepa de vacuna de la cepa de exposición). Si se exponen a la cepa H37Rv resistente a kanamicina, se usa Kan o TCH (hidrazida de ácido tiofeno-2-carboxílico) para distinguir la cepa de exposición de la cepa de vacuna. Si se usa la cepa Erdman de *M. tb* para la exposición, se usa TCH para distinguir la cepa de vacuna de la cepa de exposición (BCG es sensible, pero *M. tb* es resistente de manera natural).

**Inducción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) cutánea.** Se inmunizan cobayas libres de patógeno (SPF) específicas por vía intradérmica con  $10^3$  cepas de BCGr o BCG parentales. Nueve semanas tras la inmunización, se afeita el lomo de los animales y se les inyecta por vía intradérmica 10 µg de PPD (derivado de proteína purificado) en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato. Tras 24 horas, se medirá el diámetro de la induración dura (DTH). Las cepas de BCGr inducen DTH igual a o superior al inducido por las cepas de BCG parentales.

**Estudio de exposición en cobayas.** Para determinar la eficacia de las vacunas de BCGr frente a la exposición con *M. tb*, se inmunizan cobayas (machos adultos jóvenes SPF Hartley, de 250-300 gramos) en grupos de 12, cada una con cepa de BCGr, de BCG parental o solución salina. Las vacunas y los controles se administran por vía intradérmica con  $10^6$  ufc. A las 10 semanas tras la inmunización, se exponen los animales inmunizados con BCGr, BCG y con inmunización simulada a *M. tb* mediante aerosol generado a partir de una suspensión celular individual de 10 ml que contiene un total de  $10^7$  ufc de *M. tb*; este procedimiento administra ~100 bacterias vivas a los pulmones de cada

animal, tal como se describió anteriormente (Brodin *et al.*, 2004). Tras la exposición, se monitorizan a los animales para determinar la supervivencia, el peso corporal y la salud general junto con un grupo sano de animales no vacunados no expuestos. Se sacrifican seis animales en cada grupo a las 10 semanas tras la exposición y los seis restantes en cada grupo a las 70 semanas tras la exposición para la evaluación a largo plazo. En ambos puntos de tiempo, se realizan análisis de histopatología y microbiología de los animales. Se evalúan los tejidos de pulmón y bazo para la histopatología y el recuento de UFC (se usan placas con aportes complementarios de selección para distinguir la cepa de vacuna de la cepa de exposición). Si se exponen a la cepa H37Rv resistente a kanamicina, entonces se usa Kan o TCH para distinguir la cepa de exposición de la cepa de vacuna. Si se usa la cepa Erdman de *M tb* para la exposición, se usa entonces TCH para distinguir la cepa de vacuna de la cepa de exposición (BCG es sensible pero *M. tb* es resistente de manera natural). Durante un estudio de exposición satisfactorio, los animales con inmunización simulada mueren lo más rápidamente tras la exposición, y los animales inmunizados con BCGr sobreviven más tiempo que los animales inmunizados con la cepa de BCG parental.

**Estudio de exposición y seguridad en primates.** Más recientemente, se han usado primates no humanos para la evaluación de vacunas contra *M. tb*. La relación evolutiva entre seres humanos y primates no humanos y las manifestaciones clínicas y patológicas de la tuberculosis en estas especies ha convertido al modelo de primates no humanos en atractivo para estudios experimentales de la enfermedad de TB y la eficacia de vacunas.

Este modelo, caracterizado por el desarrollo de cavitación pulmonar, parece ser aplicable a la TB humana. Se realiza un seguimiento del transcurso de la infección y la enfermedad mediante radiografía y la pérdida de peso, así como por una variedad de pruebas hematológicas, incluyendo la velocidad de sedimentación eritrocitaria (ESR), la proliferación y producción de citosina en células mononucleares en sangre periférica (PBMC), la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las respuestas de anticuerpos. Tras la infección, el mono *Cynomolgus* desarrolla patología de pulmón con lesiones características y, dependiendo de las dosis de exposición, se produce muerte por infección respiratoria aguda en el plazo de cuatro a seis meses tras la infección. Dosis de infección inferiores pueden conducir a infecciones crónicas sin enfermedad, muy similar a los seres humanos.

El estudio compara directamente diversas dosis de la cepa de BCG parental frente a BCG recombinante administradas o bien solas o seguidas por dos dosis de refuerzo posteriores con la vacuna que comprende secuencias que están sobreexpresadas en constructos de BCGr. Esta última se administra mediante cualquiera de varios medios conocidos, incluyendo pero sin limitarse a: como proteína recombinante basada en una formulación adyuvante adecuada, como ADN o como un constructo de Ad35.

El primer estudio evalúa la eficacia protectora de los constructos BCG parenteral frente a BCGr sin una dosis de refuerzo. Este estudio comprende tres grupos con 10 animales en cada grupo: comprendiendo cada grupo BCG, BCGr y solución salina. Se somete a prueba la piel de dos animales de cada grupo con los antígenos sobreexpresados en los constructos de BCGr así como con PPD y solución salina convencionales como controles. Una induración positiva y mayor en el grupo de BCGr en comparación con el de BCG es indicativa de administración de vacuna *in vivo* y de que se provoca una respuesta inmunitaria. Los ocho animales restantes de cada grupo se exponen mediante aerosol a una dosis baja de la cepa Erdman de *M tb* y se mide la protección mediante la reducción de la carga bacteriana a las 16 semanas tras la exposición con la supervivencia como criterio de valoración.

El protocolo de sensibilización a BCG de seguimiento es esencialmente igual al anterior, excepto que los animales se vacunan en primer lugar con

BCG, BCGr y solución salina seguido por dos dosis de refuerzo con los antígenos sobreexpresados.

5 El estudio de inmunogenicidad y protección en el modelo de primates no humanos investiga los aspectos inmunobiológicos e inmunopatológicos de la tuberculosis en macacos para estudios de eficacia en constructos de BCGr. Los animales son de crías a adultos jóvenes criados en cautividad con un peso promedio de 2 a 3 kg que se han acondicionado completamente antes del comienzo del experimento. Los estudios de pre-inoculación incluyen análisis de sangre iniciales que incluyen estudios hematológicos de rutina y 10 velocidades de sedimentación de eritrocitos, así como ensayos de proliferación de linfocitos. Se realizan pruebas cutáneas con PPD para garantizar la falta de sensibilidad a tuberculina y se obtienen radiografías de tórax como parte del perfil previo a la infección. El periodo de inmunización dura 21 semanas en total, lo que cubre la vacunación primaria con BCG o BCGr en la semana = 0, y los refuerzos de antígeno en las semanas 15 12 y 16. Se evalúa la inmunidad específica de antígeno midiendo la proliferación y la secreción de interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) en pruebas de estimulación de linfocitos. Se determina la frecuencia de linfocitos que producen IFN  $\gamma$  mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISPOT) o el clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Para 20 este fin, se extraen muestras de sangre en las semanas 0, 4, 8, 12, 16 y 20 con respecto a la vacunación primaria.

25 Cuatro a seis semanas tras la última inmunización, se exponen los animales mediante instilación intratraqueal de 3 ml (1.000 ufc) de la cepa Erdman de *M. tuberculosis* en el mismo día y con la misma preparación. Se evalúa el transcurso de la infección para determinar la pérdida de peso, fiebre, velocidad de sedimentación eritrocitaria (ESR) elevada, DTH a PPD, respuesta proliferativa *in vitro* de PBMC estimulados con PPD y sobreexpresión de antígeno en BCGr seguido por mediciones de los niveles de producción de 30 IFN- $\gamma$ . Se realizan radiografías de tórax para detectar anomalías que concuerden con TB pulmonar, y finalmente, se realiza la autopsia a las 12-16 semanas tras la exposición.

#### **Evaluación clínica de vacunas y vectores frente a la TB**

35 Se realizan estudios de seguridad y toxicidad preclínicos tal como obligan las normativas federales según los estudios de toxicología y seguridad preclínicos tal como se describió anteriormente. Tras estos estudios, se realizan estudios de seguridad en seres humanos. Estos estudios se realizan inicialmente en adultos sanos negativos para Quantiferon, seguido por disminución de la edad a niños y neonatos.

40 **Estudios de inmunogenicidad:** Los estudios de inmunogenicidad en ratones y primates utilizan, pero no se limitan a, métodos convencionales de evaluación de la inmunidad celular tales como INF $\gamma$ , ELISPOT, citometría de flujo con estimulación de péptido o antígeno a corto y largo plazo, etc. Se utilizan metodologías similares para la evaluación de respuestas humanas. Se 45 emplean estudios de tetrámeros para la evaluación de las respuestas de CD4 y CD8 tras la vacunación de seres humanos.

**Optimización de estrategias de refuerzo de sensibilización:** BCGr funciona bien como una vacuna independiente frente a la TB u otras enfermedades para las que se ha modificado mediante ingeniería genética para 50 que expresen antígenos relevantes. BCGr, tal como se describe en el presente documento como vacuna para la TB o que expresa antígenos para proteger frente a otras enfermedades, también funciona extremadamente bien para sensibilizar el sistema inmunitario para una inmunización de refuerzo con proteínas recombinantes mezcladas con adyuvantes, o antígenos con vectores virales o 55 bacterianos. Tanto en estudios preclínicos con animales como en estudios con seres humanos, las sensibilizaciones con BCG seguidas por refuerzos de vector o proteína recombinante/adyuvante están optimizadas en lo que se refiere a

los regímenes y las dosis. Estas estrategias de refuerzo de sensibilización constituyen el medio más potente para inducir inmunidad en seres humanos debido a la potencia de la sensibilización con BCG obtenida en la presente invención, seguido por centrarse en y potenciar la respuesta a la dosis de refuerzo del sistema inmunitario mediante vector o proteína recombinante.

**Estudios de vacunas terapéuticas tras la exposición en animales:** Se usarán ratones C57BL/6 pero sin limitarse a este animal para establecer infección latente; se administrarán vacunas terapéuticas a los ratones en el momento en que sólo se haya inducido una inmunidad específica insignificante frente a *M tb* mediante infección de dosis baja y un punto de tiempo posterior en el que la inmunidad específica frente a *M. tb* ha disminuido y en ella predominan las células T de memoria. Entonces, se evaluará el beneficio terapéutico de las vacunas en ratones 2 y 5 meses tras la última administración de vacuna terapéutica mediante el recuento de las ufc en pulmones y bazo en ratones individuales. Se analizarán los recuentos de ufc mediante métodos estadísticos convencionales en los grupos de ratones y se usarán los resultados para determinar si la vacunación terapéutica reduce significativamente la infección latente por *M tb* en ratones. Se utilizan metodologías similares para la evaluación de respuestas de otros animales cuando sea necesario.

**Evaluación clínica de vectores de BCG: administración oral de vacunas de BCGr.** La vacunación oral del animal diana con el BCGr de la presente invención se logra usando métodos descritos previamente (Miller *et al.*, Can Med Assoc J. 121(1):45-54; 1979). La cantidad de BCGr de la presente invención administrado por vía oral variará dependiendo de la especie del sujeto, así como de la enfermedad o estado que se está tratando. Generalmente, la dosificación empleada es de aproximadamente de  $10^3$  a  $10^{11}$  microorganismos viables, y preferiblemente de aproximadamente  $10^5$  a  $10^9$  microorganismos viables.

El BCGr se administra generalmente junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable particular empleado no es crítico para la presente invención. Ejemplos de diluyentes incluyen solución salina tamponada con fosfato, tampón para tamponar frente al ácido gástrico en el estómago, tal como tampón citrato (pH 7,0) que contiene sacarosa, tampón bicarbonato (pH 7,0) solo (Levine *et al.*, J. Clin. Invest, 79:888-902; 1987; y Black *et al.*, J. Infect. Dis., 155:1260-1265; 1987), o tampón bicarbonato (pH 7,0) que contiene ácido ascórbico, lactosa y opcionalmente aspartamo (Levine *et al.*, citado anteriormente, 1989; Lancet, II: 67-470; 1988). Ejemplos de vehículos incluyen proteínas, por ejemplo, las encontradas en la leche desnatada, azúcares, por ejemplo, sacarosa, o polivinilpirrolidona. Normalmente estos vehículos se usarían a una concentración de aproximadamente el 0,1-90% (p/v) pero preferiblemente a un intervalo del 1-10% (p/v).

#### **EJEMPLO 5. Seguridad en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID)**

Tal como se mencionó anteriormente, la expresión de Llo en BCG demostró ser relativamente ineficaz en potenciar el escape del endosoma, probablemente debido a la baja actividad de Llo a pH neutro en el microentorno del endosoma modificado en el que reside BCG (Hess, *et al.*, Proc Natl Acad Sci 95:5299; 1998; Grode *et al.*, J. Clin. Invest, J Clin Invest. 115(9):2472; 2005). No obstante, la expresión de Llo modificó aparentemente el endosoma lo suficiente como para reducir la virulencia de BCG-Llo+ en ratones SCID (Grode *et al.*, 2005). Esta observación sugiere que el redireccionamiento de BCG al citoplasma de células huésped tiene la posibilidad de mejorar tanto la inmunogenicidad como la seguridad de esta antigua vacuna viva frente a la TB. El objetivo de este estudio, por tanto, es determinar la seguridad de la cepa AFV102 que escapa del endosoma que expresa PfoA<sub>G137Q</sub> en ratones SCID.

Para este fin, se hicieron crecer cepas Danesa 1331 de BCG parental (BCG<sub>1331</sub>) y el derivado de BCG<sub>1331</sub> que expresa PfoA<sub>G137Q</sub>, cepa AFV102 en matraces

de 2 l con agitación (150 oscilaciones por minuto) hasta la fase logarítmica tardía (densidad óptica a 540 nm de 6,5-7,5). Se recogieron las bacterias mediante centrifugación y se almacenaron a  $1,5 \times 10^9$  ufc/ml a  $-80^\circ\text{C}$  en solución salina + el 0,05% (v/v) de Tyloxapol + el 10% (v/v) de glicerol.

5 Se prepararon los inóculos descongelando los viales en masa en hielo y realizando conjuntos de diluciones en serie en solución salina normal libre de endotoxina ( $<0,05$  UE/ml) (NaCl al 0,85% p/v). Estas diluciones se usaron para inocular grupos de 6 ratones SCID por vía subcutánea con las dosis respectivas mostradas en la tabla 2 suspendidas en un volumen de 0,1 ml.

10 Tabla 2. Diseño del estudio de seguridad en ratón SCID

Grupo	Vacuna	Dosis
1	PBS	
2	BCG <sub>1331</sub>	$3 \times 10^4$
3	BCG <sub>1331</sub>	$3 \times 10^5$
4	BCG <sub>1331</sub>	$3 \times 10^6$
5	BCG <sub>1331</sub>	$3 \times 10^7$
6	AFV102	$3 \times 10^5$
7	AFV102	$3 \times 10^6$
8	AFV102	$3 \times 10^7$
9	AFV102	$3 \times 10^8$

Tras la inoculación, se monitorizan a los ratones para determinar la supervivencia a lo largo de un periodo de 100 días tras la inoculación. Los resultados de este estudio muestran que los ratones inoculados con AFV102 sobreviven más que los ratones que reciben la dosis análoga de BCG<sub>1331</sub>.

El uso de una vacuna de dosis de refuerzo heteróloga para reforzar la inmunidad provocada por BCG ha atraído la atención recientemente. Por tanto, seres humanos y animales de laboratorio estimulados con BCG desarrollan respuestas inmunitarias celulares excelentes tras un refuerzo heterólogo compuesto por virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que codifica para el antígeno de *M. tb* 85A (en el presente documento "Ag85A"; también conocido como Rv3804c; Vordemeier *et al.*, Immunol. 112(3):461; 2004; McShane *et al.*, Nature Med. 10(11):1240; 2004); por el contrario, los individuos que no han recibido la dosis desarrollan respuestas relativamente mediocres al vector MVA-Ag85A vector (McShane *et al.*, 2004). Además, hay estudios independientes que muestran que animales de laboratorio sensibilizados con BCG y con refuerzo o bien con MVA-Ag85A (Williams *et al.*, Infect Immun. 73(6):3814; 2005) o bien con vacuna de subunidad *M. tb*72f (Brandt *et al.*, Infect. Immun. 72(11): 6622; 2004) desarrollan niveles superiores de resistencia a una exposición a *M. tb* que la que logran mediante la vacunación con BCG solo, lo que constituye un apoyo reforzado para este enfoque. Aunque estos estudios no definían las correlaciones de protección, está claro que las estrategias de vacunación heterólogas de sensibilización-refuerzo ofrecen un medio eficaz para producir protección frente a *M. tb*.

El objetivo de este ejemplo y del siguiente, por tanto, es evaluar la cepa AFV102 que escapa del endosoma en un régimen de vacunación de sensibilización-refuerzo. El objetivo del experimento en este ejemplo es optimizar el intervalo en un régimen de sensibilización-refuerzo en el que se usa la cepa AFV102 que escapa del endosoma como sensibilización y se usa un vector de vacuna de adenovirus serotipo 35 con replicación deficiente (Vogels

et al., J Virol. 77(15):8263-71; 2003; Barouch et al., J. Immunol. 172(10):6290; 2004) que alberga un casete de expresión que codifica para una proteína de fusión compuesta por los genes de *M. tb* Rv3804c-Rv1886-Rv0288 bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (Vogels et al., J Virol. 77(15):8263-71; 2003) como refuerzo. El refuerzo se administra por vía intranasal (i.n.), puesto que los adenovirus que expresan antígenos de TB son más eficaces por esta vía que por las vías de administración parenterales convencionales (Wang et al., J. Immunol. 173(10):6357; 2004).

10 Por consiguiente, se inmunizaron grupos de 10 cobayas Hartley macho SPF (250-300 gramos) tal como se muestra en la tabla 3 para evaluar intervalos de sensibilización-refuerzo de 14, 18 y 21 semanas.

Tabla 3. Diseño de estudio de régimen en cobayas

Grupo	Sensibilización I (Día 1)	Sensibilización II (Semana 3)	Sensibilización III (Semana 7)	Refuerzo (Semana 21)
1	Solución salina (i.d.)	-	-	-
2	AFV102 (i.d.)	-	-	Ad35-TBS (i.n.)
3	-	AFV102 (i.d.)	-	Ad35-TBS (i.n.)
4	-	-	AFV102 (i.d.)	Ad35-TBS (i.n.)
5	-	-	-	Ad35-TBS (i.n.)

15 Nota: Ad35-TBS indica un vector de vacuna de adenovirus serotipo 35 con replicación deficiente (Vogels et al., J Virol. 77(15): 8263-71; 2003; Barouche et al., J.Immunol. 172(10): 6290; 2004) que alberga un casete de expresión que codifica para una proteína de fusión compuesta por los genes de *M. tb* Rv3804c-Rv1886-Rv0288 bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (Vogels et al., J Virol. 77(15):8263-71; 2003).

20 Las sensibilizaciones se administran por vía intradérmica a una dosis de  $10^6$  ufc en 0,1 ml de glicerol al 10%. A los ratones control se les administran 0,1 ml de glicerol al 10% por vía intradérmica sólo. A las 14 semanas tras la sensibilización, se administra a los cobayas un refuerzo compuesto por Ad35-TBS y se les administra por vía intranasal a una dosis de  $10^9$  unidades formadoras de placa (es decir Vogels et al., 2003; Barouch et al. 2004) suspendido en 10 µl de PBS.

30 A las 14 semanas tras el refuerzo, se expone a los animales mediante aerosol a la cepa Erdman de *M. tb* mediante un aerosol generado a partir de una suspensión celular individual de 10 ml que contiene un total de  $10^7$  ufc de *M. tb*; este procedimiento administra ~100 bacterias vivas a los pulmones de cada animal, tal como se describió anteriormente (Brodin et al., 2004). A las 5 semanas tras la exposición, se sacrifican los animales en cada grupo y se recogen los pulmones y los bazo para el análisis histológico y microbiológico. En este último caso, se evalúan tejidos de pulmón y bazo de los cobayas para los recuentos de las ufc. Puesto que se usa la cepa Erdman de *M. tb* para la exposición, se añade TCH a los medios para distinguir la cepa de vacuna, que es sensible a TCH, de la cepa de exposición.

35 Los resultados de este estudio identifican el intervalo óptimo entre la sensibilización con BCGr y el refuerzo con Ad35-TBS.

40 **EJEMPLO 6. Exposición de inmunización**

Para medir la potencia de la cepa AFV102 candidata para vacuna frente a la TB contra la exposición de *M. tb*, se inmunizan grupos de 8 (cobayas

Hartley SFP adultos jóvenes (250-300 gramos) tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Diseño de estudio de exposición en cobayas

Grupo	Sensibilización 1 (Día 1)	Refuerzo (Semana n*)	Exposición (refuerzo + 14 semanas)
1	Solución salina (i.d.)	-	100 ufc de Erdman
2	Danasa 1331 de BCG (i.d.)	-	100 ufc de Erdman
3	Solución salina (i.d.)	Ad35-TBS (i.n.)	100 ufc de Erdman
4	AFV102 (i.d.)	AFV102 (i.d.)	100 ufc de Erdman
5	AFV102 (i.d.)	Ad35-TBS (i.n.)	100 ufc de Erdman

5 Nota:

1. n\* indica que el intervalo entre la sensibilización y el refuerzo será el valor definido en el ejemplo anterior.

10 2. Ad35-TBS indica un vector de vacuna de adenovirus serotipo 35 con replicación deficiente ((Vogels et al., J Virol. 77(15): 8263-71; 2003; Barouche et al., J. Immunol. 172(10): 6290; 2004) que alberga un casete de expresión que codifica para una proteína de fusión compuesta por los genes de *M. tb* Rv3804c-Rv1886-Rv0288 bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (Vogels et al., J Virol. 77(15):8263-71; 2003).

15 Las sensibilizaciones en los grupos 4 y 5 se administran por vía intradérmica a una dosis de  $10^6$  ufc en 0,1 ml de glicerol al 10%. A los ratones control en los grupos 1 y 3 se les administran 0,1 ml de glicerol al 10% por vía intradérmica sólo. A los ratones control en el grupo 2,  $10^6$  ufc de la cepa Danasa 1331 de BCG en 0,1 ml de glicerol al 10%.

20 A las 14 semanas tras la sensibilización, se administra a los cobayas un refuerzo. En el grupo 5, el refuerzo está compuesto por AFV102 y se administra por vía intradérmica a una dosis de  $10^6$  ufc en 0,1 ml de glicerol al 10%. En los grupos 4 y 6, los refuerzos están compuestos por Ad35-TBS y se administran por vía intranasal a una dosis de  $10^9$  unidades formadoras de  
25 placas (es decir Vogels et al., 2003; Barouch et al. 2004) suspendidos en 10  $\mu$ l de PBS.

30 A las 14 semanas tras la inmunización final, se expone a los animales mediante un aerosol a *M. tb* mediante un aerosol generado a partir de una suspensión celular individual de 10 ml que contiene un total de  $10^7$  UFC de *M. tb*; este procedimiento administra ~100 bacterias vivas a los pulmones de cada animal, tal como se describió anteriormente (Brodin et al., 2004). Tras la exposición, se monitorizó a los animales para determinar la supervivencia junto con un grupo sano de animales no vacunados no expuestos. También se  
35 monitorizan a los animales para determinar la pérdida de peso y la salud general.

40 Los resultados de este estudio demuestran que los animales con inmunización simulada mueren lo más rápidamente tras la exposición, los animales vacunados con BCG por vía intradérmica sin refuerzo muestran un tiempo medio intermedio hasta la muerte y los animales inmunizados con AFV102 y con refuerzo por vía intranasal con Ad35-TBS son los que sobreviven más tiempo.

**EJEMPLO 7. Apoptosis**

La apoptosis es la muerte celular programada que difiere drásticamente de la muerte celular necrótica en lo que se refiere a su inducción y consecuencias. La apoptosis de las células que contienen antígenos extraños es un estímulo poderoso conocido de inmunidad celular contra tales antígenos. El proceso por el que la apoptosis de las células que contienen el antígeno conduce a inmunidad celular se ha denominado en ocasiones de sensibilización cruzada.<sup>1,2,3</sup> Existen varios mecanismos para la inducción de apoptosis que conducen a un aumento de la inmunidad mediada por células específica de antígeno. La apoptosis mediada por caspasa 8 conduce a protección inmunitaria celular específica de antígeno.<sup>4</sup> La producción de caspasa 8 en el citoplasma celular por BCG recombinante que escapa del endosoma será un método adicional poderoso para inducir la muerte celular programada en el contexto de antígenos extraños expresados por BCG recombinante, contra BCG y otros antígenos de la tuberculosis sobreexpresados por BCG recombinante, así como contra los propios antígenos de BCG conduciendo a altos niveles de inmunidad celular específica de antígeno. El receptor 5 de muerte (DR-5) también conocido como TRAIL-R2 (receptor de TRAIL 2) o TNFR-SF-10B (miembro 10B de la superfamilia de factores de necrosis tumoral) también media la apoptosis mediada por caspasa 8.<sup>4</sup> La apoptosis inducida por retrovirus está mediada por TRAIL-DR5 que conduce a una eliminación posterior del virus.<sup>5</sup> La expresión de DR-5 por BCG recombinante que escapa del endosoma debe proporcionar un potente efecto adyuvante para la inducción de la inmunidad celular específica de antígeno contra los antígenos expresados por BCGr. También puede inducirse que las células que expresan los antígenos experimenten apoptosis a través del ligamiento de Fas, que es un fuerte estímulo para la inducción de respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno.<sup>6</sup> El BCG recombinante que escapa del endosoma que expresa Fas o la proteína de fusión ectodominio de CD4/dominio citoplasmático de FAS inducirá apoptosis y respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno.

La potenciación de la inmunidad celular mediante las cepas que escapan del endosoma de BCGr o mediante las cepas que escapan del endosoma de BCGr que producen potenciadores de apoptosis adicionales descritas anteriormente no se limita a antígenos de BCG o antígenos específicamente codificados para la sobreexpresión por BCGr, sino que incluyen cualquier antígeno en la célula eucariota en la que pueda invadir el BCGr mencionado anteriormente. Como ejemplo, si un BCGr de este tipo se administra a células tumorales en las que se induce apoptosis, entonces se inducirá la inmunidad celular contra antígenos tumorales importantes con eliminación, reducción o prevención del tumor y/o la metástasis. Este efecto antitumoral se producirá además del efecto antitumoral general que genera BCG cuando se administra localmente tal como es el caso con el cáncer de vejiga.

En una realización adicional de esta invención, BCGr con escape de endosoma o BCGr con escape de endosoma potenciado mediante la producción de mediadores específicos de la apoptosis, administrado dentro del tumor u otras células en las que tal BCGr también produce antígenos extraños contra los que se generarán respuestas inmunitarias celulares fuertes, inducirán la producción de respuestas celulares fuertes contra esas células tumorales u otras células eucariotas que contienen estos antígenos. Estas respuestas celulares conducirán a la destrucción de las células tumorales mediada por el sistema inmunitario, además de la sensibilización cruzada e inducción de inmunidad celular contra antígenos tumorales u otros antígenos importantes con la posterior eliminación, reducción o prevención del tumor y/o la metástasis. Como ejemplo de un antígeno extraño de este tipo está un antígeno de HLA diferente del HLA de la célula huésped contra el que se generará una respuesta celular heteróloga fuerte.

BCGr con escape de endosoma o BCGr con escape de endosoma cuyas propiedades de inducción apoptótica están potenciadas mediante la expresión de mediadores específicos de la apoptosis que también producen antígenos

tumorales específicos inducirán respuestas celulares específicas de antígeno fuertes contra estos antígenos tumorales, incluyendo interrupción de cierta tolerancia para estos antígenos que conduce a eliminación, reducción o prevención de tumores y/o metástasis sin necesidad de administración directa del BCGr en el propio tumor.

La apoptosis tras el daño al ADN o la caspasa 9 induce tolerancia a ciertos antígenos. La inducción de tolerancia es importante en el control o la prevención de enfermedades autoinmunitarias tales como, pero sin limitarse a, diabetes, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino y esclerosis múltiple. La producción de caspasa 9 o de otras proteínas que inducen tolerancia mediada por apoptosis por BCGr que escapa del endosoma en células tales como, pero sin limitarse a, células pancreáticas  $\beta$ , células colorrectales y nerviosas, producirá apoptosis limitada que inducirá tolerancia contra dianas antigénicas de autoinmunidad en esas células tratando o evitando de esa manera el estado patológico autoinmunitario. La identificación de antígenos específicos implicados en reacciones autoinmunitarias permitirá la inducción de tolerancia contra estos antígenos diana autoinmunitarios a través la producción por BCGr que escapa del endosoma tanto de estos antígenos como de caspasa 9 u otras moléculas que pueden inducir tolerancia mediada por apoptosis. Tal BCGr tratará y/o evitará estas enfermedades autoinmunitarias.

#### Referencias para el ejemplo 7.

1. Heath, W.R., G.T. Belz, G.M. Behrens, C. M. Smith, S.P. Forehan, I.A., Parish, G.M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone, y J. A. Villadangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199:9.

2. Gallucci, S., M. Lolkema, y P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Biotechnology*. 5:1249.

3. Albert, M.L., B. Sauter, y N. Bhadrwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I -restricted CTLs. *Nature* 392:86

4. Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gruney, M. Skutbatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, y A. Ashkenazi. 1997. Control of Trail induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818.

5. Clarke, P., S. M. Meintzer, S. Gibson, C. Widmann, T.P. Garrington, G.L. Johnson, y K.L. Tyler. 2000. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *J. Virol* 74:8135.

6. Chattergoon, M.A., J.J. Kim, J.S. Yang, T. M. Robinson, D. J. Lee, T. Dentchev, D.M. Wilson, V. Ayyavoo, y D.B. Weiner. 2000. Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat Biotechnology* 18:974.

7. Hugues, S., E. Mougneau, W. Ferlin, D. Jeske, P. Hofman, D. Homann, L. Beaudoin, D. Schrike, M. Von Herrath, A. Lehuen, y N. Glaichenenhaus. 2002. Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16:169.

#### **EJEMPLO 8. Sobreexpresión de antígenos de vacuna en una cepa de BCGr que puede escapar del endosoma**

Para sobreexpresar antígenos de TB en la cepa AFV102 de BCGr, se insertaron secuencias que codifican para el promotor de Rv3031 unidas funcionalmente a secuencias que codifican para Rv3804c (también conocido como Ag85A), Rv1886 (también conocido como Ag85B) y Rv0288 (también conocido como TB10.4) en el sitio *PacI* de pAF100. El plásmido resultante, pAF105 (figura 12), se digirió posteriormente con la endonucleasa de restricción *NdeI* para

eliminar el gen de resistencia a kanamicina y el replicón de *E. coli*, y se recircularizó mediante ligamiento con ligasa de T4. Este ADN (1-2 µg) se introdujo en la cepa AFV102 de BCGr mediante electroporación. Se cultivaron las bacterias en placas de 8,75 cm que contenían 25-30 ml de medios sólidos (Middlebrook 7H10). Tras una preselección mediante PCR para detectar colonias que albergan el plásmido de expresión de antígeno, una colonia de BCGr seleccionada, que es positiva para PfoA y contiene el casete de expresión del antígeno de TB, se designa AFV 112 y se expande hasta 500 ml en medios líquidos agitados (Middlebrook 7H9) a 37°C. Una vez que el cultivo alcanza la fase logarítmica tardía, se añade glicerol al cultivo de 500 ml hasta una concentración final del 10% (v/v) y se almacena la cepa premadre en alícuotas de 5 ml a -80°C.

Se evalúa la pureza de los cultivos de BCG y BCGr extendiendo uniformemente alícuotas de 100 µl del cultivo de BCG diluido en serie (por ejemplo etapas de 10 veces a partir de Neat  $10^{-8}$ ) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en placas de 8,75 cm que contienen 25-30 ml de medios sólidos (Middlebrook 7H10). Se usa análisis de PCR y endonucleasa de restricción del ADN del plásmido para confirmar que el genotipo deseado está presente en cada aislado de BCGr. Además, se secuencian los fragmentos de ADN generados por PCR mediante técnicas de secuenciación automática de didesoxinucleótidos para confirmar la presencia de genes de longitud completa.

Para evaluar la secreción de PfoA por AFV102 y AFV112 que albergan el plásmido de expresión de antígeno de TB, se hicieron crecer ambas cepas hasta la fase semilogarítmica, tal como se describió anteriormente. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo de estos cultivos y se filtraron a través de filtros de membrana de 0,2-mm, tal como se describió anteriormente (Hess et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 95:5299-304; 1998). Entonces se evalúan las proteínas del filtrado de cultivo para determinar la actividad hemolítica, tal como se describió anteriormente. Los resultados muestran que AFV102 y AFV112 presentan niveles similares de actividad hemolítica y que AFV112 conserva el alelo  $\Delta$ ureC:: $\Omega$ PfoA<sub>G137Q</sub> y expresa una proteína PfoA funcional.

Finalmente, se evalúa la expresión de los antígenos de TB en proteínas de sobrenadantes de cultivo separadas en geles de SDS-PAGE al 10-15%. Los resultados muestran la expresión aumentada de Rv3804c y Rv1886. Puesto que no se espera que Rv0288 se sobreexpresen en el sobrenadante de cultivo, la sobreexpresión de esta proteína de 10 kDa, que se expresa en el mismo ARNm que Rv3804c y Rv1886, se deduce por la observación de que Rv3804c y Rv1886 se sobreexpresan.

Tomado como un todo, este ejemplo demuestra que es posible generar una cepa de BCGr que tanto exprese PfoA como sobreexpresen antígenos de TB. Una cepa de este tipo puede servir como vacuna frente a la TB de segunda generación.

## REIVINDICACIONES

1. *Mycobacterium* que se modifica mediante ingeniería genética para incluir una proteína endosomalítica que puede expresarse y secretarse que es activa a un pH de 6-8, en el que la proteína se selecciona del grupo de perfringolisina O, pneumolisina, estreptolisina O, cerolisina,  $\alpha$ -hemolisina o una variante funcional de las mismas que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural.
2. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, en el que dicha proteína endosomalítica que puede expresarse o secretarse es perfringolisina O o una variante funcional de la misma que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural.
3. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, en el que una secuencia de aminoácidos de dicha proteína endosomalítica que puede expresarse o secretarse se representa mediante SEQ ID NO. 2.
4. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, en el que dicha proteína endosomalítica que puede expresarse o secretarse se codifica por una secuencia génica específica para perfringolisina O o una variante funcional de la misma que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural.
5. *Mycobacterium* según la reivindicación 4, en el que dicha secuencia génica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 3.
6. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, en el que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar adicionalmente una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis.
7. *Mycobacterium* según la reivindicación 6, en el que dicha proteína apoptótica o dicho potenciador de apoptosis se selecciona del grupo que consiste en caspasa 8, receptor de muerte 5, Fas y proteína de fusión ectodominio de CD4/dominio citoplásmico de FAS.
8. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, modificándose dicho *Mycobacterium* mediante ingeniería genética para expresar de manera funcional un gen de interés.
9. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, modificándose dicho *Mycobacterium* mediante ingeniería genética para expresar de manera funcional una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis; y un gen de interés.
10. *Mycobacterium* según la reivindicación 1, siendo dicho *Mycobacterium* BCG.
11. Método de permitir que un *Mycobacterium* escape de endosomas, que comprende la etapa de modificar mediante ingeniería genética dicho *Mycobacterium* para contener, expresar y secretar una proteína endosomalítica que es activa a un pH de 6 a 8, en el que la proteína se selecciona del grupo de perfringolisina O, pneumolisina, estreptolisina O, cerolisina,  $\alpha$ -hemolisina o una variante funcional de las mismas que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha proteína endosomalítica es perfringolisina O o una variante funcional de la misma que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha proteína endosomalítica es una perfringolisina O mutante codificada por SEQ ID NO: 3.
14. Método según la reivindicación 11, en el que dicho *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* atenuado.
15. Método según la reivindicación 14, en el que dicho *Mycobacterium* atenuado es BCG.
16. Método según la reivindicación 11, en el que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar adicionalmente una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis.
17. Método según la reivindicación 16, en el que dicha proteína apoptótica o dicho potenciador de apoptosis se selecciona del grupo que consiste en caspasa 8, receptor de muerte 5, Fas y proteína de fusión ectodominio de CD4/dominio citoplásmico de FAS.
18. Método según la reivindicación 11, en el que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar de manera funcional un gen de interés.
19. Método según la reivindicación 11, en el que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar de manera funcional una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis; y un gen de interés.
20. Preparación de vacuna, que comprende un *Mycobacterium* según la reivindicación 1 modificado mediante ingeniería genética para expresar y secretar una proteína endosomalítica funcional seleccionada del grupo de perfringolisina O, pneumolisina, estreptolisina O, cerolisina,  $\alpha$ -hemolisina o una variante funcional de las mismas que tiene la actividad de la proteína de referencia y cuya secuencia de aminoácidos es homóloga en al menos un 70% a la de la proteína de tipo natural, en la que dicha proteína endosomalítica funcional es activa a pH neutro.
21. Preparación de vacuna según la reivindicación 20, en la que dicha proteína endosomalítica es perfringolisina O.
22. Preparación de vacuna según la reivindicación 21, en la que dicha proteína endosomalítica es una variante funcional de perfringolisina O codificada por SEQ ID NO: 3.
23. Preparación de vacuna según la reivindicación 20, en la que dicho *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* atenuado.
24. Preparación de vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho *Mycobacterium* atenuado es BCG.
25. Preparación de vacuna según la reivindicación 20, en la que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar adicionalmente una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis.
26. Preparación de vacuna según la reivindicación 25, en la que dicha proteína apoptótica o dicho potenciador de apoptosis se selecciona del

grupo que consiste en caspasa 8, receptor de muerte 5, Fas y proteína de fusión ectodominio de CD4/dominio citoplásmico de FAS.

- 5 27. Preparación de vacuna según la reivindicación 20, en la que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar adicionalmente de manera funcional un gen de interés.
28. Preparación de vacuna según la reivindicación 20, en la que dicho *Mycobacterium* se modifica mediante ingeniería genética para expresar adicionalmente de manera funcional
- 10 una proteína apoptótica o un potenciador de apoptosis;
- y un gen de interés.
- 15 29. *Mycobacterium* según las reivindicaciones 8 y 9, método según las reivindicaciones 18 ó 19 o preparación de vacuna según las reivindicaciones 27 ó 28, en los que dicho *Mycobacterium* es una cepa de *Mycobacterium* atenuada que sobreexpresa un gen de interés que codifica para antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, seleccionándose en particular dichos antígenos del grupo que consiste en Rv0125, Rv0203, Rv0287, Rv0288, Rv0603, Rv1196, Rv1223, Rv1271c, Rv1733c, Rv1738, Rv1804c, Rv1886, Rv2031c, Rv2032, Rv2253, Rv2290, Rv2389c, Rv2626c, Rv2627c, Rv2779c, Rv2873, Rv2875, Rv3017c, Rv3407, Rv3804c, Rv3810 y Rv3841.
- 20
30. *Mycobacterium* según las reivindicaciones 8 y 9, método según las reivindicaciones 18 y 19 o preparación de vacuna según las reivindicaciones 27 ó 28, en los que el *Mycobacterium* es una cepa de *Mycobacterium* atenuada que expresa un gen de interés que codifica para un antígeno parasitario derivado de *Plasmodium spp.*, en particular, de *Plasmodium falciparum*.
- 25

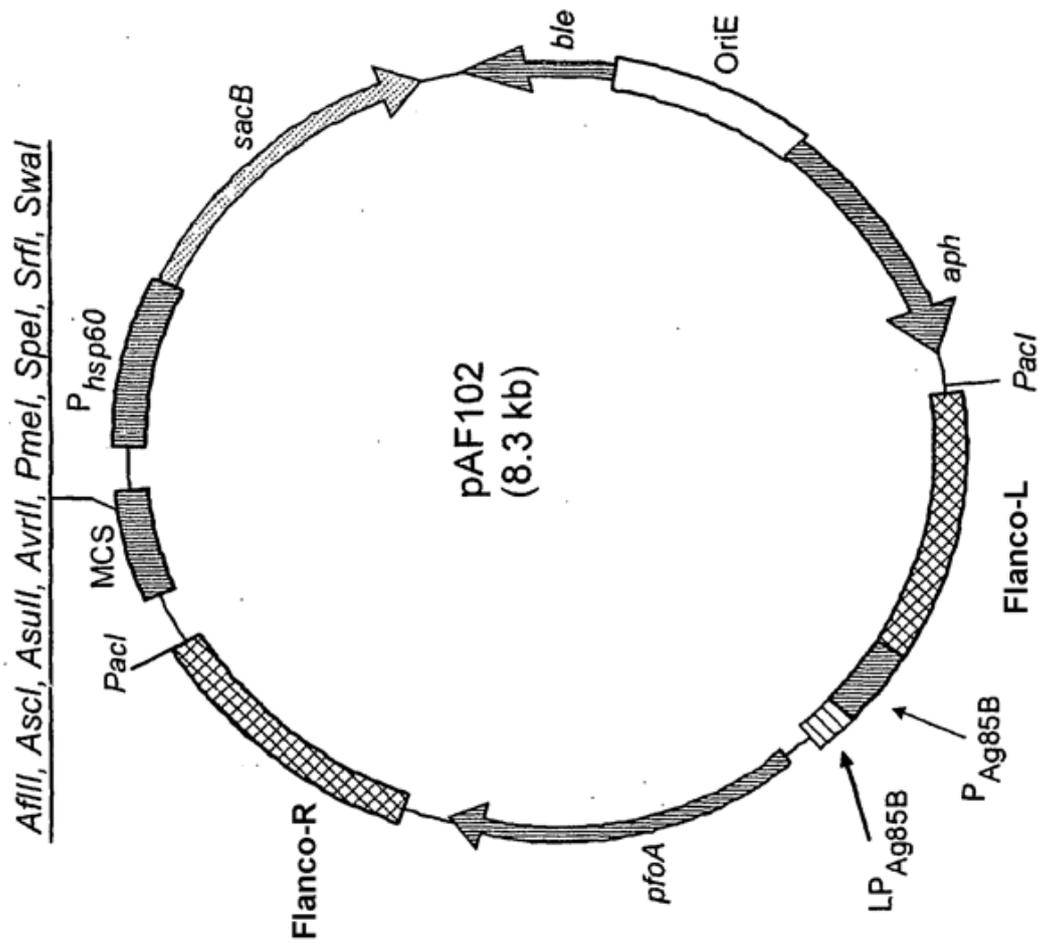


Figure 1

atgataagatttaagaaaaaaaataatagcaagtattgcaatggccttatgtctgttttctcaaccagtaatcagtttctcaaggatataacaga  
 faaaaatcaaagtattgattciggaaatcaagcctaagttacatagaatgaagtttagctagtaatggagataaaatgaaagttttgtccaa  
 aggaaggtaaaaagactggtaataaattatagttgtagaacgtcaaaaagatcccttacaacatcaccagtagatatcaataattgattctg  
 laaatgaccgtacatataccaggagcattacaactgcagataaagcccttgggaaaatagacctacaatcctaatggtaaaaagaagcctatt  
 aacattaatagatttaccaggattaaggggtgaaaatagataaaggttgatgatccaacctatggaaaagtttctggagcaattgatgag  
 'tagtctaaagtggaatgaaaagtattcatctacacatacttaccagcaagaactcaatattcagaatctatggttatagtaaatacaaatatc  
 aagtgcccttaattgtaatgctaaagtcctgaaaactcacttggagtagactttaatgcagtagcaaacatgagaaaaagttatgatttagc  
 atataaacaatattctatacagtaagtcagacttacctaaagaatccatcagatcttttgatgacagtggtacatttaattgattaaaaaaaagg  
 ggtaagtaalgaaagcacctccactatggttcaaatgtagcttattggaagaactatatatgtaagtagaaactacttctagtagaaagatgt  
 ncaagctgcttcaaaagctcttataaagaacttgataaaaaatagtaacaataaagataattatgaaaatagttccttcacagcagtagtt  
 ttaggaggagatgcacaagaacatacaaaagttgtaactaaggactttgatgaataagaaaagtaattaaagacaatgcaacttttagtaca  
 aaaaaccagcatatccaatcttatactagttttctaaaagataactcagttgctgctgttcacaataaaacagattatatagaacaactct  
 acagagtattcaaggaaaaataaacttagatcatagtgaggcctatgttgcacagttgaaagtagcatgggatgaaagttcatatgacaaga  
 aggaaatgaagtttaactcataaaacatgggatggaaatlatcaagataaaacagctcactattcaacagtaatacctctgaagccaatgcaa  
 gaaatataagaataaaggcaagagagtgacaggtctgctgggaatggggagagatgtataagtgaaatgatgttcattaacaataat  
 ataaatgtttcaatatggggaactactttataacctggatctagttacttacaatlaa

## Figura 2A

MIRFKKTKLIASIAMALCLFSQPVISFSKDITDKNQSIDSGISSLSYNRNEVLASNGDKIESF  
 VPKEGKKTGNKFIVVERQKRSLTTPVDISIIDS VNDRTYPGALQLADKAFVENRPTILMV  
 KRKPININIDLPLKGENSIKVDPTYGKVSGAIDELVSKWNEKYSSTHTL PARTQYSES  
 MVYSKSQISSALNVNAKVLNSLGVDFNAVANNEKVMILAYKQIFYTVSADLPKNPSD  
 LFDDSVTFNDLKQKGVSNAPPLMVSNAVYGRITIVVKLETTSSSKDVQAAFALIKNTDI  
 KNSQQYKDIYENSSTAVVLGGDAQEHNKVVTKDFDEIRKVIKDNATFSTKNPAYPISYT  
 SVFLKDNSVAAVHNKTDYIETTSTEYSKGINLDHSGAYVAQFEVAWDEVSYDKEGNE  
 VLTHKTWDGNYQDKTAHYSTVIPLEANARNIRIKARECTGLAWEWWRDWISEYDVPLT  
 NNINVSIWGTTLYPGSSITYN

## Figura 2B

AAG GAT ATC ACC GAC AAG AAC CAG AGC ATC GAT AGC GGC ATC TCC AGC  
 CTG TCG TAC AAC CGC AAC GAA GTG CTA GCC TCG AAC GGC GAC AAG ATC  
 GAA AGC TTC GTT CCG AAG GAG GGT AAG AAG ACG GGT AAT AAG TTC ATC  
 GTC GTA GAA CGT CAG AAG CGA TCC TTG ACC ACG TCG CCA GTC GAT ATC  
 AGC ATC ATT GAT TCG GTG AAC GAC CGG ACC TAT CCG GGC GCA CTG CAA CTT  
 GCC GAC AAA GCC TTT GTG GAA AAC CGC CCG ACC ATC CTA ATG GTG AAG CGC  
 AAG CCG ATC AAC ATT AAC ATC GAC CTG CCG CAG CTG AAG GGT GAG AAC  
 TCG ATC AAG GTG GAC GAC CCG ACC TAT GGC AAG GTG TCC GGC GCG ATC  
 GAC GAG CTG GTG TCG AAG TGG AAC GAG AAG TAT TCA TCC ACC CAT ACT CTC  
 CCA GCG CCG ACC CAG TAT TCA GAG AGC ATG GTC TAC TCG AAG TCC CAG  
 ATA TCA AGT GCC CTG AAT GTG AAT GCT AAG GTC CTG GAA AAC TCG CTG  
 GGC GTG GAC TTT AAC GCA GTA GCG AAC AAC GAG AAG AAG GTG ATG ATT  
 TTG GCC TAC AAA CAA ATC TTC TAT ACG GTG TCG GCG GAC CTG CCC AAG AAC  
 CCC AGC GAC CTG TTC GAC GAC TCG GTT ACG TTC AAC GAC CTC AAG CAG AAG  
 GGG GTG AGC AAT GAG GCG CCT CCG CTG ATG GTC TCG AAC GTC AAG GAC  
 GGA CCG ACG ATC TAC GTC AAG TTA GAA ACC ACC TCT TCC TCG AAG GAC  
 GTC CAG GCC GCC TTC AAA GCC CTG ATC AAG AAC ACC GAC ATC AAG AAC TCC  
 CAG CAG TAC AAG GAC ATT TAC GAG AAT TCG TCC TTC ACC GCG GTC GTC TTG  
 GGC GGC GAT GCG CAG GAA CAC AAC AAA GTG GTC ACC AAG GAC TTC GAT  
 GAG ATA CCG AAA GTC ATT AAG GAC AAC GCG ACT TTC TCC ACA AAA AAC  
 CCG GCA TAC CCG ATC AGC TAT ACC AGT GTG TTC CTC AAG GAC AAC AGC GTC  
 GCC GCT GTT CAC AAC AAG ACC GAC TAC ATC GAG ACG ACC TCG ACC GAG TAC  
 AGC AAG GGG AAA ATC AAC CTG GAT CAC TCG GGC GCC TAC GTT GCC CAG  
 TTC GAG GTG GCC TGG GAC GAA GTC AGC TAT GAC AAG GAG GGC AAT GAA  
 GTG CTC ACG CAC AAA ACG TGG GAC GGG AAC TAC CAA GAT AAG ACA GCC  
 CAC TAC TCA ACC GTG ATC CCC CTC GAG GCC AAC GCG AGG AAC ATC CGC  
 ATC AAG GCG CCG GAG TGC ACG GGT CTT GCG TGG GAG TGG TGG CGC GAC  
 GTC ATC TCG GAG TAC GAC GTG CCG TTG ACC AAC AAC ATC AAT GTG AGC ATC  
 TGG GGA ACC ACC CTG TAC CCC GGG TCG TCG ATC ACC TAC AAC TGA

**Figura 3**

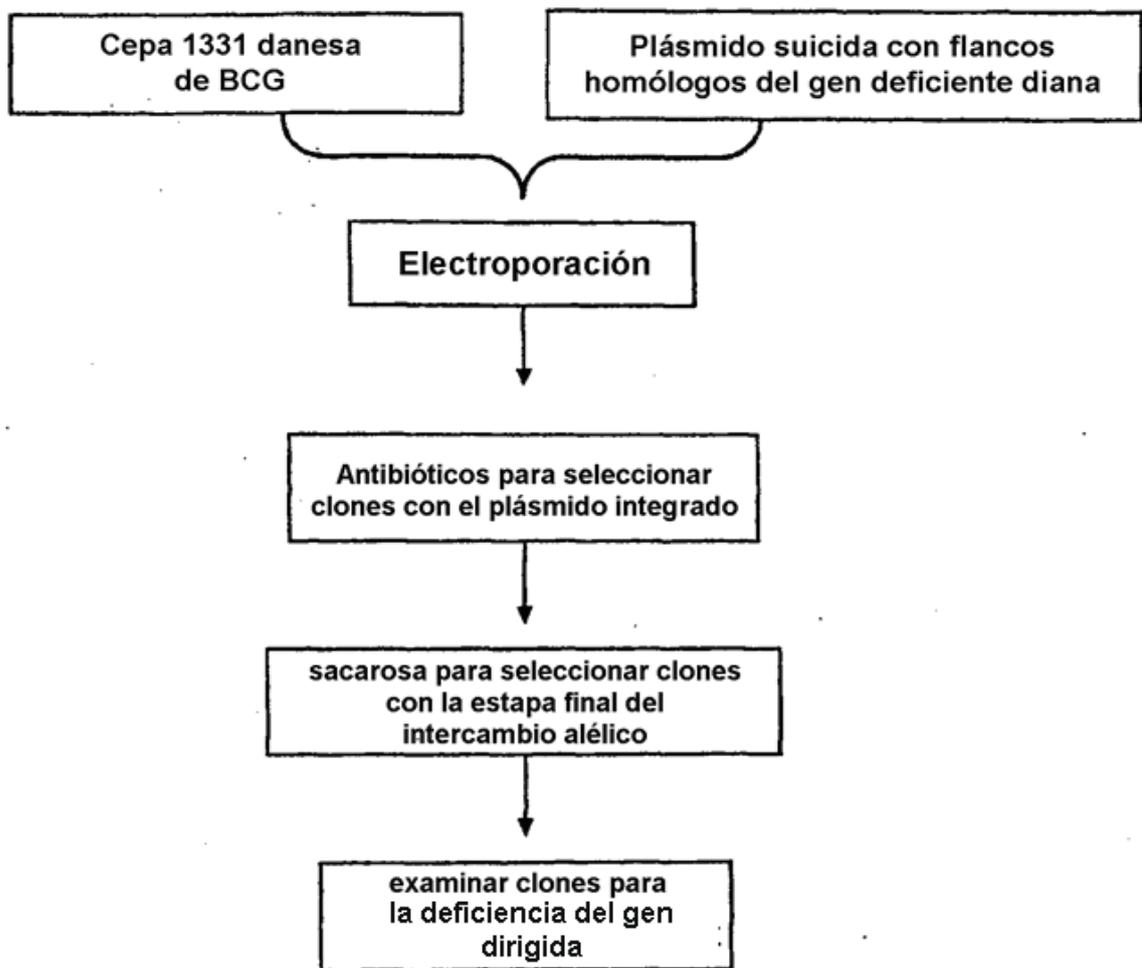


Figura 4

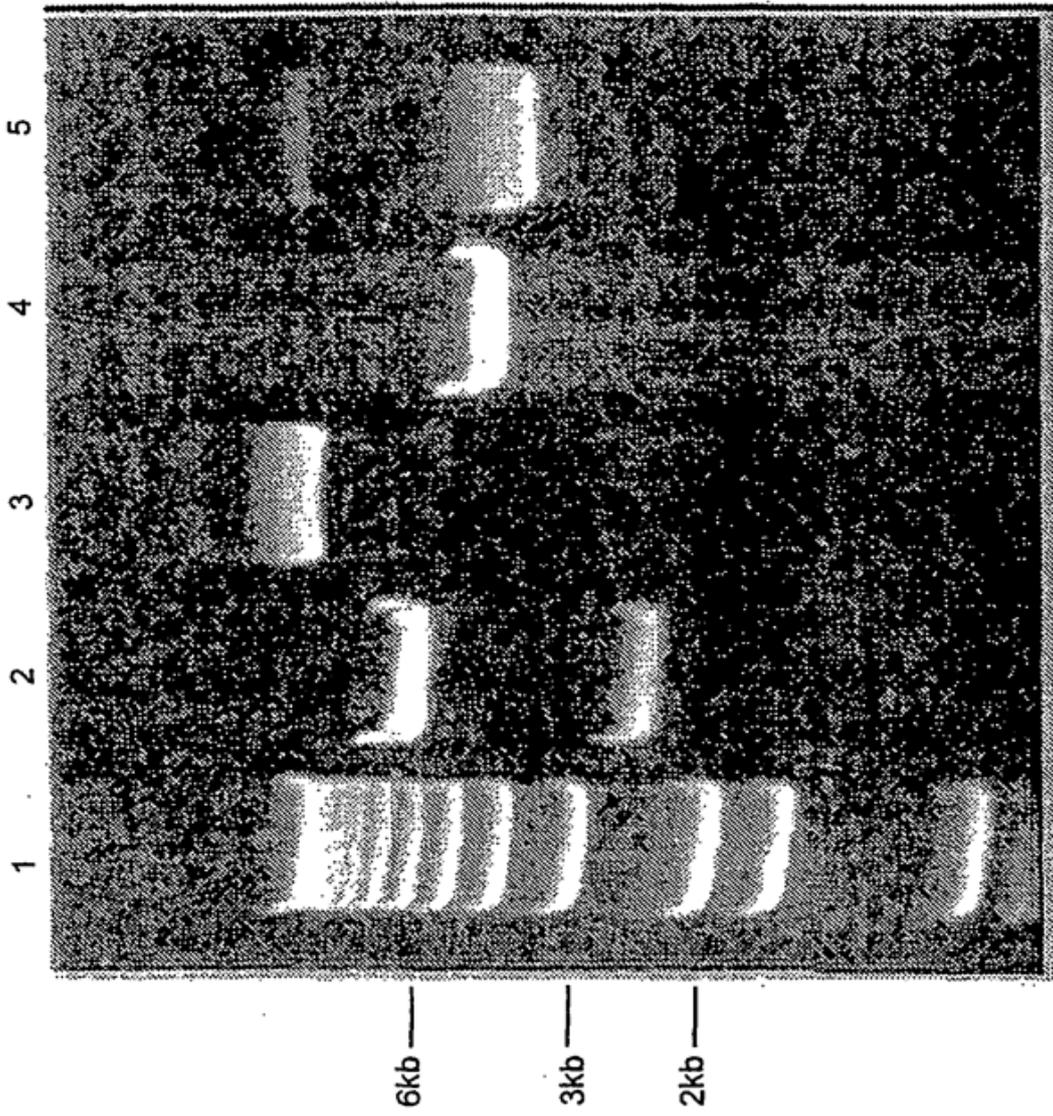


Figura 5

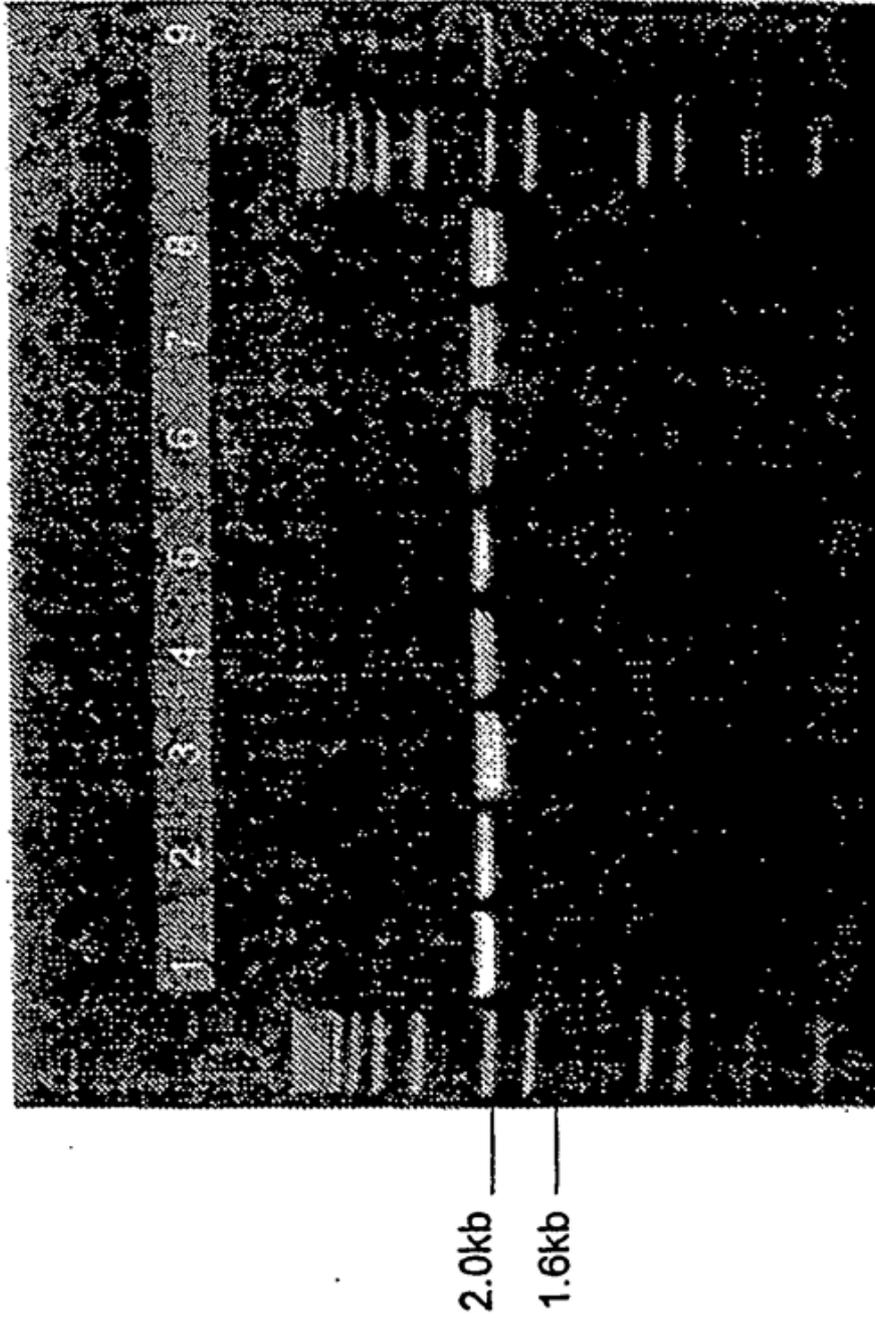


Figura 6

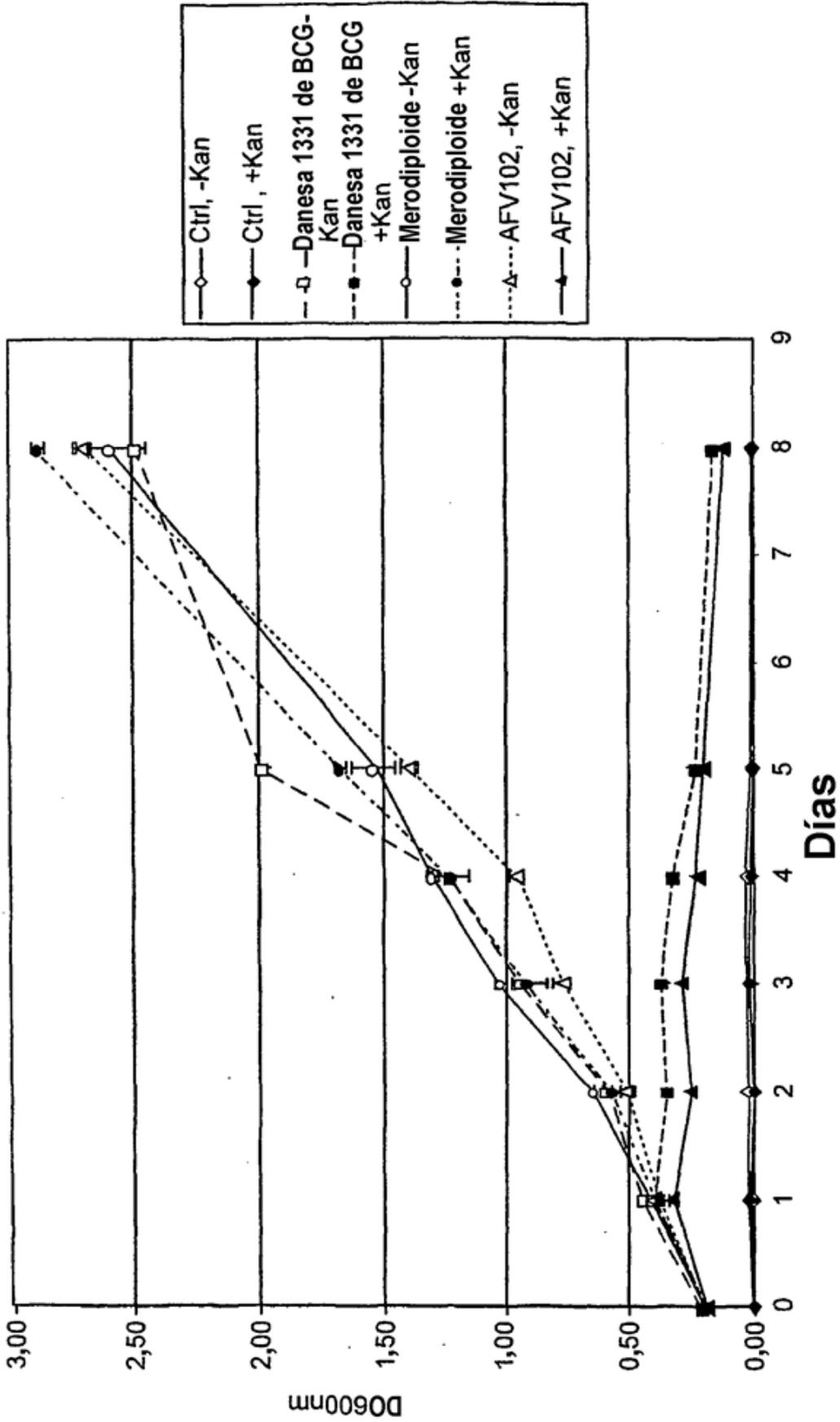


Figura 7

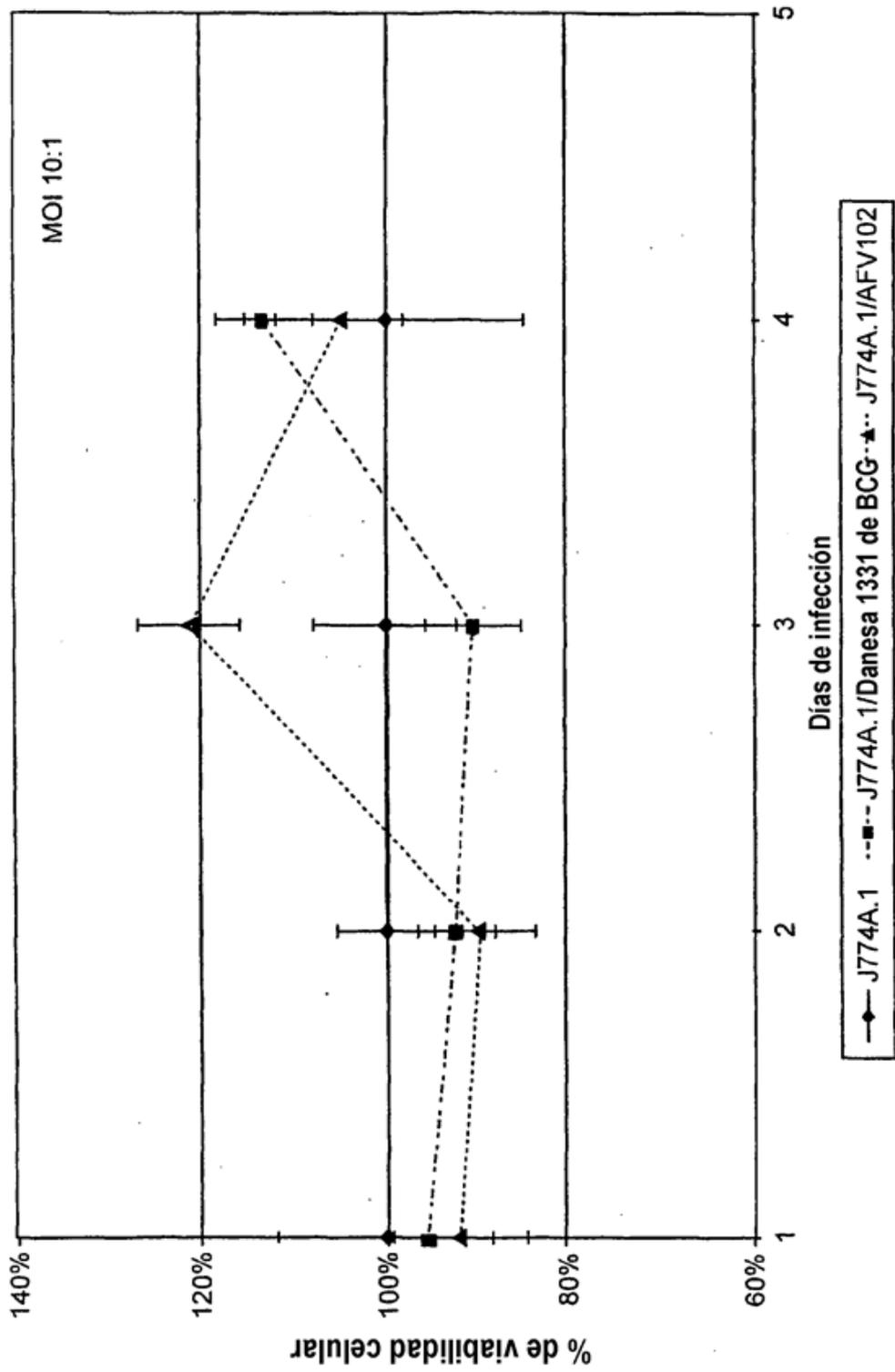


Figura 8

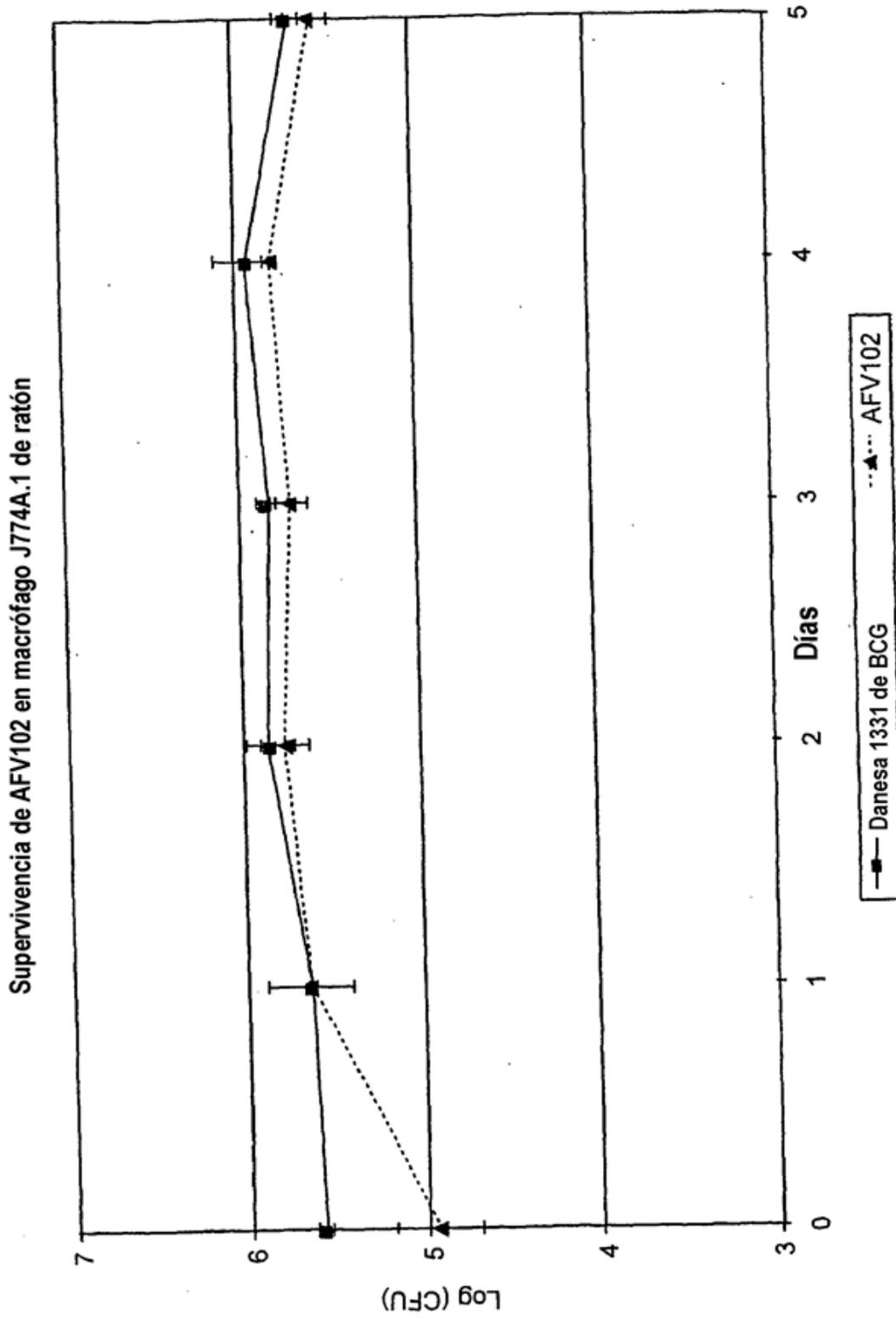


Figura 9

Actividad hemolítica del sobrenadante de cultivos de AFV102 y BCG a pH 7,0 y pH 5,5

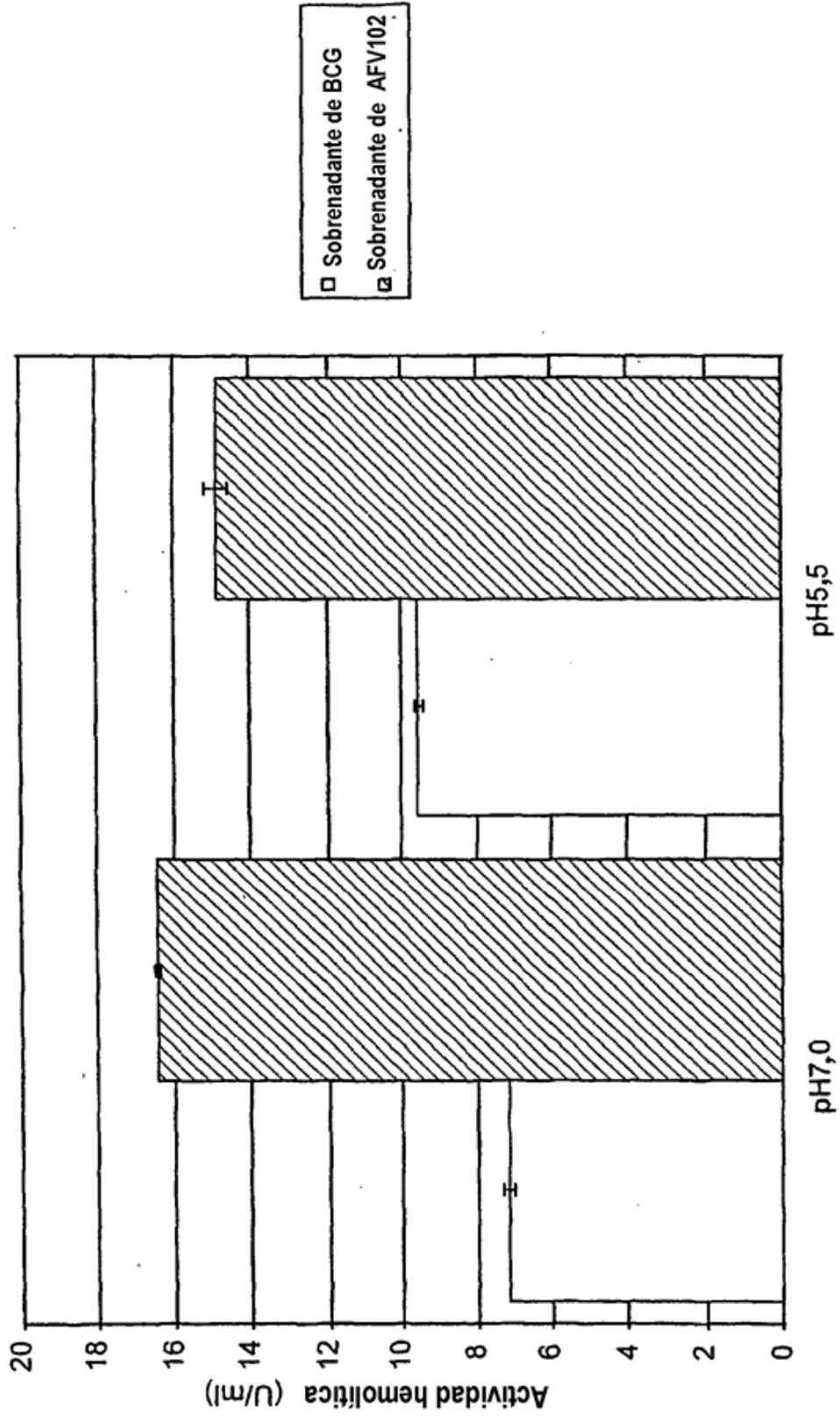


Figura 10

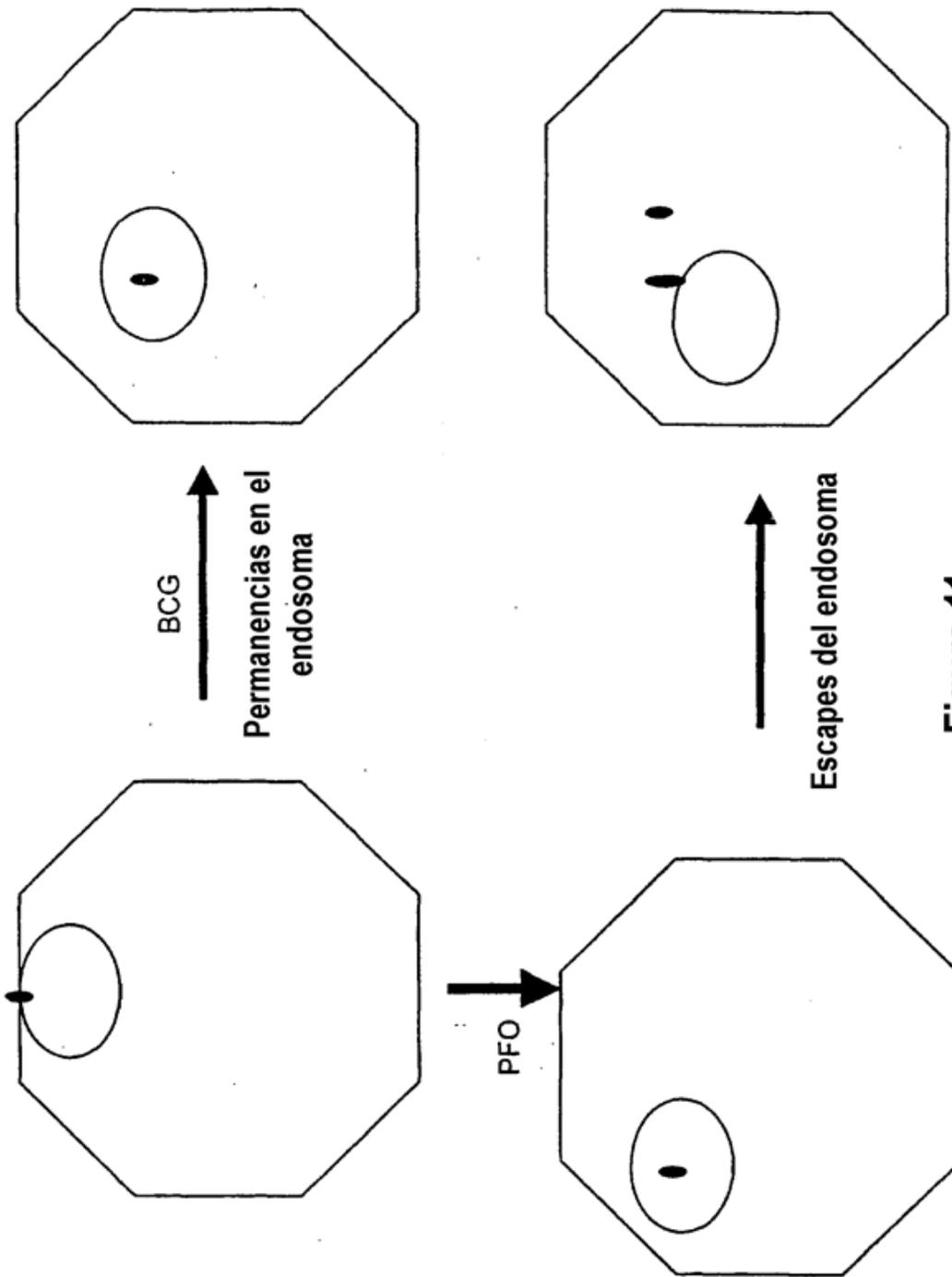


Figura 11

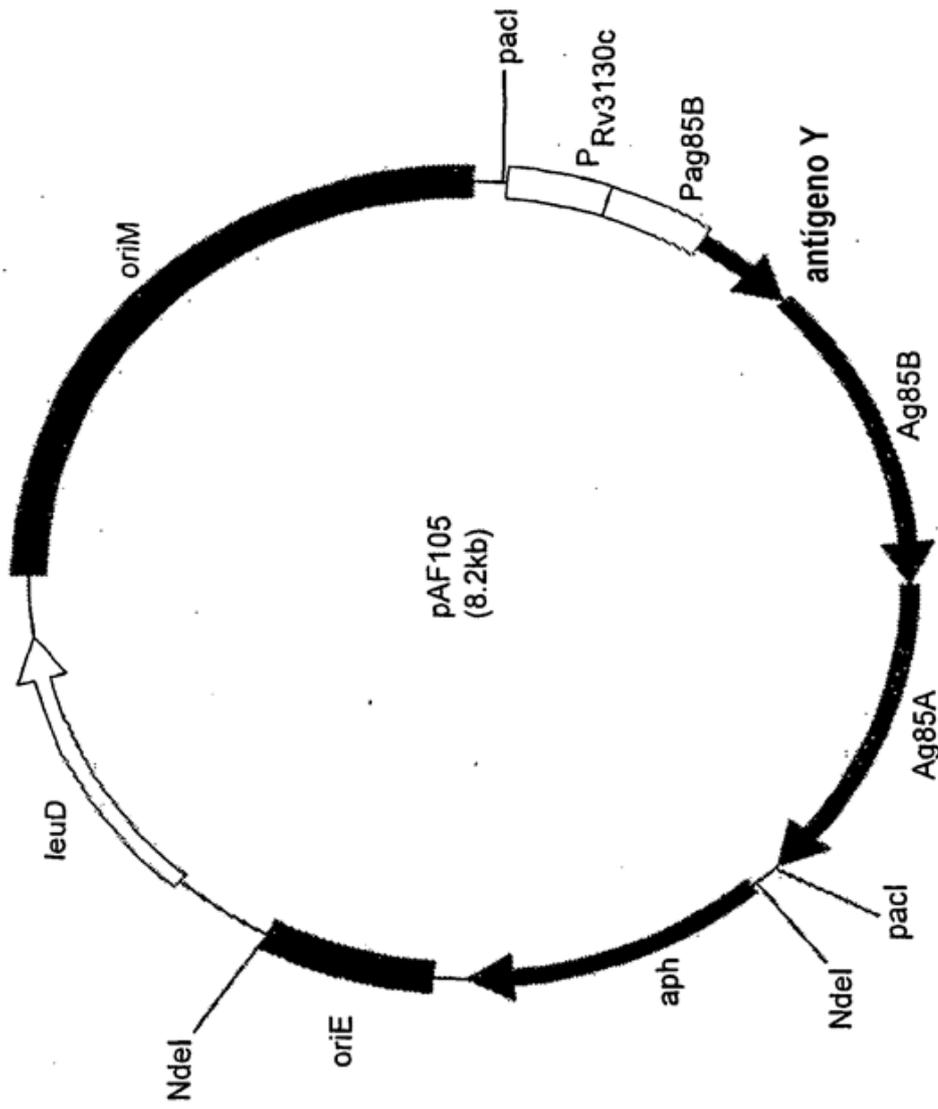


Figura 12