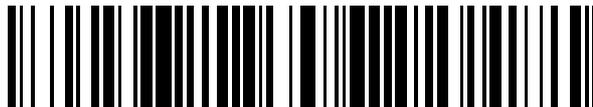


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 885**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01) **C07H 21/02** (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) **C07H 21/04** (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/38 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05852317 .6**

96 Fecha de presentación: **29.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1817061**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54

Título: **ELECTROPORACIÓN DE MYCOBACTERIUM Y SOBREEXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN MICOBACTERIAS.**

30

Prioridad:
01.12.2004 US 631977 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73

Titular/es:
**AERAS GLOBAL TUBERCULOSIS VACCINE
FOUNDATION
7500 OLD GEORGETOWN ROAD, SUITE 800
BETHESDA, MD 20814, US**

72

Inventor/es:
**SUN, Ronggai;
HONE, David, Michael y
SADOFF, Jerald, C**

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 370 885 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

Electroporación de *mycobacterium* y sobreexpresión de antígenos en micobacterias.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención proporciona cepas de *Mycobacterium* con propiedades de vacuna mejoradas para su uso como agentes de vacunación contra la tuberculosis. Las cepas de *Mycobacterium* se seleccionan preferiblemente de cepas progenitoras que se identifica que tienen potente inmunogenicidad, no manifiestan resistencia a antibióticos y no presentan transferencia horizontal a bacterias gram-negativas. La invención también proporciona *Mycobacterium* con propiedades mejoradas para suministrar transgenes que tendrán propiedades de vacuna para su uso en la vacunación contra otras enfermedades y para su uso en el tratamiento de cáncer.

15 **Antecedentes**

20 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) ha infectado a un tercio de la población mundial, provocando enfermedad activa en 8 millones y matando a 1,6-2,2 millones de individuos cada año, la mayoría de los cuales viven en el mundo en vías de desarrollo. La tuberculosis (TB) es una epidemia de proporciones globales que está creciendo y se está haciendo incluso más mortífera al cruzarse con la propagación del VIH. La TB es la enfermedad que provoca más muertes de personas con SIDA.

25 BCG, la vacuna contra TB ampliamente usada actualmente, se desarrollo hace más de 80 años y cuando se sometió a prueba ha tenido tasas de eficacia ampliamente variables contra la tuberculosis pulmonar, incluyendo ninguna eficacia en el último ensayo de campo extenso llevado a cabo en India (Fine *et al.*, *Vaccine*, 16(20):1923-1928; 1998; Anonymous, *Indian J Med Res.*, agosto; 110:56-69; 1999. No obstante, la Organización Mundial de la Salud actualmente recomienda BCG en el nacimiento o primer contacto con los servicios de salud para todos los niños (excepto aquellos con síntomas de enfermedad de VIH/SIDA) en países con alta prevalencia de TB. Esta política se basa en la evidencia de que BCG protege contra 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 contra la TB más allá de la infancia temprana es un tema controvertido con datos limitados que proporcionan resultados mixtos. La alta incidencia de TB pediátrica y adulta en países en vías de desarrollo en los que se practica ampliamente inmunización con BCG infantil, sin embargo, indica que BCG tal como se administra actualmente no es altamente eficaz a lo largo de los muchos años en los que las personas corren el riesgo de la enfermedad de TB. Por tanto, se considera que BCG es una herramienta de salud pública inadecuada para la intervención y el control de la TB.

40 Aproximadamente el 70 por ciento de los seres humanos expuestos a organismos de TB, y que tienen sistemas inmunitarios normales, no se infectan, y de los que sí se infectan sólo aproximadamente el 5 por ciento desarrollan la enfermedad en el plazo de los primeros dos años. La mayoría de individuos infectados suprimen la infección, que está asociada con el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares robustas frente a antígenos de *M. tb*. Un 5 por ciento adicional se reactivan más tarde cuando disminuye la inmunidad. Tanto la enfermedad primaria como la reactivación son mucho más comunes en personas con VIH/SIDA, lo que enfatiza nuevamente el papel de la inmunidad en la prevención y control de la infección.

Sumario de la invención

50 Debido a que la mayoría de los seres humanos pueden controlar la TB, existe una buena razón para esperar que induciendo inmunidad larga duración de la clase apropiada sería posible desarrollar vacunas eficaces que prevengan la infección inicial tras la exposición, prevengan la evolución temprana hasta la enfermedad, prevengan la reactivación del estado latente y prevenga la recidiva tras el tratamiento. En última instancia, es la combinación de uso de vacuna sistemático más la intervención quimioterápica la que finalmente eliminará *M. tb* como patógeno humano.

55 En vista del papel crítico que se piensa que la vacunación con BCG infantil desempeña en la prevención de la TB aguda, es difícil reemplazar BCG en ensayos para evaluar vacunas contra la TB candidatas sin pruebas abrumadoras de que la nueva vacuna contra la TB es un producto superior. El problema es que *M. tb* es principalmente un patógeno específico de ser humano y los modelos animales sólo imitan partes de la interacción huésped-patógeno. Por tanto, sólo pueden obtenerse pruebas definitivas de que una nueva vacuna contra la TB posee potencia mejorada a partir de ensayos de campo controlados en seres humanos. Estas consideraciones conducen a muchos investigadores a concluir que una etapa clave hacia una vacuna contra la TB mejorada será desarrollar cepas mejoradas de BCG, y los modelos animales, a pesar de sus limitaciones, sugieren que BCG recombinantes que sobreexpresan antígenos protectores tienen potencia aumentada en comparación con BCG.

65

Ciertos antígenos de *M. tb* poseen propiedades de vacuna y, cuando se administran a animales como formulaciones de vacuna, confieren una protección que es similar a la lograda mediante BCG solo (Anderson, *Infect Immun* 62(6) 2536-2544; 1994). Para hacer avanzar estos candidatos, se desarrolló una estrategia para potenciar la inmunogenicidad de tales antígenos en BCG. Por tanto, se desarrollaron cepas BCG que sobreexpresan antígenos de *M. tb* seleccionados y se mostró que estas cepas de BCG recombinantes (rBCG) inducían una protección más fuerte en comparación con las cepas de BCG progenitoras a partir de las que se derivó la cepa rBCG (Horwitz *et al.*, *Infect Immun* 72(4): 1672-1679; 2003). En un estudio, una cepa rBCG que expresaba el antígeno 85B (denominado en el presente documento "Ag85B") demostró ser más eficaz que BCG mezclado con el mismo antígeno (Horwitz *et al.*, citado anteriormente, 2003). Basándose en estos hallazgos, este enfoque tiene un potencial tremendo. Baulard, A. *et al.*, *Gene*, 1996, 176, 1-2, páginas 149-154 enseñan un vector de expresión de *Mycobacterium* que contiene genes resistentes a mercurio. El vector allí descrito se perderá finalmente en la progenie del *Mycobacterium* transformado. El documento US-A-5.736.367 enseña un vector que cuando se transforma en una bacteria huésped provoca que un gen de interés se integre en el cromosoma del huésped. Además, el vector emplea genes de resistencia a antibióticos. Una progenie de la misma contendrá el gen de interés integrado. McShane, H. *et al.*, *Nature Medicine*, 2004, 10, 11, páginas 1240-1244 enseñan la conveniencia de usar el antígeno 85A para su uso en vacunas útiles para inmunidad anti-micobacteriana adquirida de manera natural y sensibilizada con BCG en seres humanos. El documento US-B2 6.562.348 da a conocer un auxótrofo para leucina de *M. tb* para su uso como vacuna. Sin embargo, el *M. tb* descrito en el mismo no sería viable cuando se administra a un huésped, no codifica para ninguno de los otros antígenos o genes de interés y no alberga a un plásmido.

En ciertas circunstancias pueden usarse cepas de BCG que sobreexpresan antígenos para provocar de manera segura y eficaz respuestas inmunitarias que confieren protección frente a la infección por TB.

La presente invención proporciona cepas de *Mycobacterium* modificadas por ingeniería genética (recombinantes) con propiedades de vacuna mejoradas para su uso como agentes de vacunación contra la tuberculosis. Poseen una variedad de características, cada una de las cuales sirve para aumentar la inmunogenicidad de las cepas. Las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención se desarrollan a partir de cepas progenitoras que se seleccionan a propósito por su potente inmunogenicidad. En otras palabras, la cepa de *Mycobacterium* que se selecciona como cepa progenitora para someterse a manipulación genética (por ejemplo, para sobreexpresar un antígeno de tuberculosis) se escoge porque, incluso antes de la manipulación genética, presenta la capacidad para provocar una potente respuesta inmunitaria en un huésped vacunado. La cepa de BCG Danish 1331 es un ejemplo. Tales cepas se modifican entonces preferiblemente, por ejemplo, para sobreexpresar un antígeno de tuberculosis de interés. Preferiblemente, se usa un promotor que se activa *in vivo* en el *Mycobacterium* genéticamente recombinantes. Además, las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención se modifican por ingeniería genética para que puedan seleccionarse en una base distinta de la resistencia a antibióticos o se construyen de tal manera que no necesitan marcadores selectivos en absoluto, lo que las hace generalmente seguras para su uso como agentes de vacunación en poblaciones humanas. Como ejemplo, se elimina un gen requerido para la replicación micobacteriana y se coloca en un plásmido de expresión. Además, las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención no experimentan transferencia horizontal a bacterias gram-negativas y por tanto no pueden "escapar" del organismo huésped. Esto también garantiza su seguridad como agentes de vacuna en poblaciones humanas.

Como otro ejemplo, la presente invención describe el uso de la expresión del antígeno 85b mediante plásmidos como factor de estabilización de plásmidos, que obvia la necesidad de selección con antibióticos para su mantenimiento. La transformación directa de cepas micobacterianas con altas concentraciones de plásmidos mínimos que expresan Ag85B más otros antígenos utilizando selección positiva por PCR para su identificación produce cepas micobacterianas que sobreexpresan antígenos con estabilidad de plásmidos en ausencia de selección auxótrofa con antibióticos. Además, mientras que las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención son agentes excelentes para su uso en vacunas contra la tuberculosis, también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar o sobreexpresar antígenos distintos de los relevantes para la tuberculosis, y por tanto son útiles como agentes de vacuna contra otras enfermedades también. Además, puede usarse rBCG que sobreexpresa antígenos de TB o antígenos importantes en otras enfermedades en regímenes de sensibilización y refuerzo con proteínas recombinantes, junto con adyuvantes, vectores virales recombinantes, o vacunas de ADN o ARN como refuerzos.

La invención proporciona una bacteria transformada o progenie de la misma, que incorpora una secuencia de nucleótidos foránea que se replica y se expresa en la bacteria transformada (o progenie), en la que la secuencia de nucleótidos foránea no está unida a un marcador seleccionable. Además, la secuencia de nucleótidos foránea se encuentra en un plásmido y el plásmido codifica para un gen requerido para la supervivencia, y habiéndose delecionado el gen requerido para la supervivencia del genoma bacteriano de la bacteria transformada. En realizaciones preferidas, la secuencia de nucleótidos foránea codifica para el antígeno 85a, el antígeno 85b o el antígeno 85a/85b. Aún en otras realizaciones, el plásmido alberga un gen que codifica para proteínas que mantienen y/o estabilizan el plásmido. En algunas realizaciones, el gen que codifica para proteínas codifica para el antígeno 85a, el antígeno 85b o el antígeno 85a/85b. En una realización de la invención, la bacteria es un *Mycobacterium*. Aún en otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos foránea codifica para apoptosis. En otras realizaciones, el

plásmido alberga un gen que codifica para apoptosis. Aún en otra realización de la invención, la secuencia de nucleótidos foránea no puede replicarse en bacterias gram-negativas. En algunas realizaciones, la bacteria transformada es auxótrofa. Aún en otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos foránea es al menos una parte de un vector lanzadera unidireccional.

5 La invención proporciona además un método para transformar una bacteria. El método comprende la etapa de incorporar una secuencia de nucleótidos foránea que se replica y se expresa en la bacteria, y la secuencia de nucleótidos foránea no está unida a un marcador seleccionable. En una realización de la invención, la etapa de incorporación se realiza mediante electroporación. Aún en otra realización, la secuencia de nucleótidos foránea está en un plásmido y la electroporación se realiza en las siguientes condiciones: una razón de ADN de plásmido con respecto a células bacterianas que oscila entre 1 µg y 5 µg de ADN de plásmido con respecto a 1,25 x 10⁸ células bacterianas. En una realización de la invención, la razón es de aproximadamente 1,6 µg de plásmido con respecto a aproximadamente 1,25 x 10⁸ células bacterianas. En algunas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos foránea no puede replicarse en bacterias gram-negativas. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos foránea es al menos una parte de un vector lanzadera unidireccional. La secuencia de nucleótidos foránea se sitúa en un plásmido y codifica para un gen requerido para la supervivencia que se deletiona de un genoma bacteriano de la bacteria.

20 La invención proporciona además un *Mycobacterium* transformado o progenie del mismo que comprende una secuencia de nucleótidos foránea que codifica para un gen de interés, y en el que existen una o más de las siguientes condiciones: a) el *Mycobacterium* transformado incluye un plásmido que no puede replicarse en bacterias gram-negativas; b) el *Mycobacterium* transformado no presenta resistencia a antibióticos; c) el *Mycobacterium* transformado es auxótrofo; y d) el *Mycobacterium* transformado alberga un vector lanzadera unidireccional. Además, la secuencia de nucleótidos foránea es parte de un plásmido. En una realización, el plásmido carece de un marcador seleccionable. Según la invención, la secuencia de nucleótidos foránea codifica para un gen requerido para la supervivencia, y en la que el gen requerido para la supervivencia se deletiona del genoma bacteriano del *Mycobacterium* transformado. En algunas realizaciones, el gen requerido para la supervivencia es *leuD*. El *Mycobacterium* transformado o progenie puede comprender además secuencias promotoras que se activan *in vivo*. El *Mycobacterium* transformado o progenie del mismo puede estar atenuado. El *Mycobacterium* transformado o progenie del mismo puede ser BCG, que puede ser, por ejemplo, BCG1331, BCG Pasteur, PCG Tokio, o BCG Copenhague.

35 La invención proporciona además una vacuna que comprende un *Mycobacterium* transformado o progenie del mismo que comprende una secuencia de nucleótidos foránea que codifica para un gen de interés, y en la que existen una o más de las siguientes condiciones: a) el *Mycobacterium* transformado incluye un plásmido que no puede replicarse en bacterias gram-negativas; b) el *Mycobacterium* transformado no presenta resistencia a antibióticos; c) el *Mycobacterium* transformado es auxótrofo; y d) el *Mycobacterium* transformado alberga un vector lanzadera unidireccional.

40 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El mapa para el vector suicida pAF103. La denotación para cada uno de los segmentos de ADN es tal como sigue: flanco izq. y flanco der.: flancos izquierdo y derecho del gen *leuD* respectivamente; *aph* es el gen de aminoglicosida fosfotransferasa (número de registro de gene bank: X06402), que confiere resistencia a kanamicina al plásmido; OriE es el origen de replicación de pUC (número de registro de gene bank AY234331); *Ble* es el gen (número de registro de Genbank L36850), que confiere resistencia a zeocina al plásmido; *SacB* es el gen (número de registro de Genbank: Y489048) que codifica para levansacarasa, que confiere a la bacteria sensibilidad a la sacarosa; P_{hsp60} es la secuencia promotora de gen de la proteína 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 reemplazarse por otros genes de enzimas endosomáticas cuando sea aplicable.

Figura 2. Nivel de protección medido mediante la cantidad de UFC en el pulmón tras la exposición para diferentes cepas de vacunas actuales.

55 **Figura 3.** Representación esquemática del vector de expresión sin antibióticos para introducir vectores de expresión en *Mycobacterium* recombinante, es decir rBCG. El gen que va a expresarse en rBCG se clona en el plásmido mediante el sitio *pacI*. Antes de la electroporación en rBCG, el plásmido se digiere con las enzimas de restricción indicadas para eliminar las regiones OriE y Kan, creando un vector de expresión lanzadera unidireccional. La denotación para cada uno de los segmentos de ADN es tal como sigue: P_{Rv3130} la secuencia promotora del antígeno Rv3130c; P_{Ag85B} es la secuencia promotora del antígeno 85B (es decir, Rv1886c); antígeno Y es un antígeno micobacteriano TB10.4 (es decir, Rv0288); Ag85B es la secuencia de ADN que codifica para el antígeno 85B (es decir, Rv1886c); Ag85A es el gen que codifica para el antígeno 85a (es decir, Rv3804c); *aph* es el gen de aminoglicosida fosfotransferasa (número de registro de gene bank: X06402), que confiere resistencia a kanamicina al plásmido; OriE es el origen de replicación de pUC (número de registro de gene bank: AY234331); *LeuD* es el gen que codifica para 3-isopropilmalato deshidratasa (es decir, Rv2987c); oriM es el origen de replicación en

Mycobacterium (número de registro de Genbank: M23557).

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

5 **Figura 5.** Análisis de PCR de colonias seleccionadas para determinar la presencia del plásmido de expresión. La PCR se llevó a cabo tal como se describe en Materiales y métodos. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1,0%. Carril 1: Se usó un marcador de tamaño molecular de ADN (Invitrogen) como patrón de ADN más 1 kb. Carril 2: Control negativo de molde de PCR; Carril 3: PCR para la cepa de BCG Danish1331; Carriles 4 a 7: PCR para las colonias numeradas 59, 61, 69 y 84 respectivamente; Carril 8: un pocillo que carga el blanco; Carril 9: PCR para el plásmido original.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

15 La presente invención proporciona cepas de *Mycobacterium* modificadas por ingeniería genética (recombinantes) con propiedades de vacuna mejoradas para su uso como agente de vacunación contra la tuberculosis. Poseen una variedad de características, cada una de las cuales sirve para aumentar la inmunogenicidad de las cepas. Las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención se desarrollaron a partir de cepas progenitoras que se seleccionan a propósito por su potente inmunogenicidad. En otras palabras, la cepa de *Mycobacterium* que se selecciona como cepa progenitora para someterse a manipulación genética (por ejemplo, para sobreexpresar un antígeno de tuberculosis) se escoge porque, incluso antes de la manipulación genética, presenta la capacidad para provocar una potente respuesta inmunitaria en un huésped vacunado. La cepa de BCG Danish 1331 es un ejemplo. Entonces, tales cepas se modifican preferiblemente, por ejemplo, para sobreexpresar un antígeno de tuberculosis de interés. Preferiblemente, se usa un promotor que se activa *in vivo* en la micobacteria genéticamente recombinante. Además, las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención se modifican por ingeniería genética para que puedan seleccionarse en una base distinta de la resistencia a antibióticos, haciéndolas generalmente seguras para su uso como agentes de vacunación en poblaciones humanas. Como ejemplo, se elimina un gen requerido para la replicación y se coloca en un plásmido de expresión. Además, las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención no experimentan transferencia horizontal a bacterias gram-negativas y por tanto no pueden “escapar” del organismo huésped (es decir, son “vectores lanzadera unidireccionales”). Esto también garantiza su seguridad como agentes de vacuna en poblaciones humanas. Además, mientras que las cepas de *Mycobacterium* recombinantes de la presente invención son agentes excelentes para su uso en vacunas contra la tuberculosis, también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar o sobreexpresar antígenos distintos de los relevantes para la tuberculosis, y por tanto son útiles como agentes de vacuna contra otras enfermedades también.

35 En realizaciones preferidas de la presente invención, las cepas de *Mycobacterium* son cepas atenuadas, por ejemplo BCG. Sin embargo, tal como reconocerán fácilmente los expertos en la técnica, también pueden utilizarse otras cepas de *Mycobacterium* atenuadas y no atenuadas. Los ejemplos de tipos adicionales de micobacterias incluyen pero no se limitan a *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium H37Ra*, *Mycobacterium vaccae*, etc.

Selección de la cepa de BCG

45 La técnica anterior sugiere que BCG no es una cepa homogénea sino que en su lugar ha desarrollado una serie de distintos linajes genéticos (Oettinger *et al.*, *Tuber Lung Dis.* 79(4): 243-250; 1999). Hasta hace poco no estaba claro si estas diferencias cambiaban la inmunogenicidad y potencia de los miembros de la familia de BCG. Sin embargo, tal como se describe en el presente documento, se ha descubierto ahora que la cepa específica de la que se deriva un BCG recombinante (denominada en el presente documento rBCG) establece una diferencia sustantiva en la potencia inmunogénica de rBCG. El ejemplo 1 a continuación muestra que la cepa de BCG Danish 1331 (denominada en el presente documento “BCG₁₃₃₁”) es una vacuna superior cuando se compara con BCG_{Tice}. Por tanto, aunque la sobreexpresión del antígeno 85B en la cepa rBCG30 aumentó la inmunogenicidad de la cepa BCG_{Tice} progenitora de la que se derivó rBCG30, rBCG30, que sobreexpresa el antígeno 85B en la cepa BCG tice, no adquirió la potencia de BCG₁₃₃₁. Por tanto, ciertas ventajas obtenidas de la sobreexpresión del antígeno en BCG pueden obtenerse seleccionando una cepa de BCG progenitora potente al inicio del proceso de construcción de la vacuna. Aunque esta solución puede parecer obvia a posteriori, los expertos en la técnica no hacen esta compensación (Horwitz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25): 13853-13858; 2000), lo que demuestra que hasta ahora no era ni común ni se consideraba esencial determinar en primer lugar si una cepa de BCG progenitora manifestaba una potencia adecuada antes de iniciar la construcción de vacunas de rBCG. Tales cepas son muy adecuadas para la sobreexpresión de antígenos de TB y BCG o antígenos foráneos.

60 Pueden seleccionarse cepas de BCG progenitoras potentes del grupo que incluye pero no se limita a BCG₁₃₃₁, BCG Pasteur, BCG Tokio y BCG Copenhague. La cepa de BCG progenitora debe reducir el nivel de organismos de exposición a *Mycobacterium tuberculosis* viables en al menos $0,4 \times 10^{10}$ más que BCG Tice en el modelo de exposición de cobaya con aerosol a baja dosis tal como se muestra en el ejemplo 1 a continuación.

65

Potenciación de la inmunogenicidad de BCG

Tal como se trató anteriormente, la inmunogenicidad de BCG no es constante. Además, el ejemplo 1 muestra que aunque la inmunogenicidad de los antígenos de BCG puede potenciarse a través de modificación genética de BCG, tales modificaciones se vuelven discutibles si la cepa de BCG progenitora en la que se hicieron los cambios recombinantes carece de potencia en el modelo de exposición de cobaya. Un corolario a este precepto es que las modificaciones que potencian adicionalmente la inmunogenicidad de BCG mejorarán adicionalmente la inmunogenicidad de cepas recombinantes derivados de tales cepas progenitoras.

Habiendo aplicado el enfoque detallado anteriormente para seleccionar una cepa de BCG apropiada para servir como progenitor a partir del cual se derivan vectores de vacuna y vacunas de rBCG, se introducen modificaciones genéticas en la cepa para generar los vectores de vacuna y vacunas de rBCG deseados. Los métodos empleados en la construcción de cepas rBCG individuales no son críticos para la presente invención y pueden seleccionarse de uno cualquiera o cualquier combinación de métodos conocidos por los expertos en la técnica (Horwitz *et al.*, PNAS 97(25): 13853-13858; 2000; Hess *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5299-5304; 1998).

Además, las vacunas de rBCG se benefician del uso de un promotor que se activa *in vivo* tras la infección. Por ejemplo, el uso del promotor activo de manera constitutiva tal como promotores de antígeno 85B, antígeno 85A, Hsp60 o Rv1908c (KatG) permite que el antígeno se exprese de manera constitutiva *in vivo* tras la inmunización. Por tanto, se provoca una respuesta inmunitaria robusta contra la infección para cada fase durante el transcurso de la infección. Mientras que seleccionar promotores activos de fase latente tales como promotor de los genes Rv2032, Rv3127, Rv2031c o Rv3030c etc. permite a rBCG expresar los antígenos seleccionados, especialmente antígenos específicos de fase latente cuando las vacunas de rBCG entran en fase latente *in vivo* tras la inmunización.

Vectores de expresión

Desarrollo de sistemas de selección sin antibióticos

Tal como se indica anteriormente, los plásmidos que se utilizan actualmente para la sobreexpresión de antígenos protectores en cepas rBCG son inaceptables debido a su dependencia de genes de resistencia a antibióticos para el mantenimiento, y a una capacidad inherente de tales plásmidos para transferirse horizontalmente a una amplia serie de huéspedes microbianos, representando de ese modo una amenaza de diseminación de genes de resistencia a antibióticos y casetes de expresión de antígenos a organismos del medio ambiente. Para superar estas importantes limitaciones, la presente invención describe un sistema de selección sin antibióticos novedosa y un sistema de lanzadera unidireccional para la introducción y el mantenimiento de los vectores de expresión en cepas huésped de *Mycobacterium* tales como rBCG.

La selección sin antibióticos de plásmidos se logra delecionando selectivamente un gen del huésped que es esencial para la replicación y complementando posteriormente la deleción incorporando una copia funcional del gen en un plásmido de expresión. Por tanto, los huéspedes bacterianos dependen del plásmido de expresión para la supervivencia, dando como resultado un mecanismo para mantener el plásmido dentro del huésped de *Mycobacterium* en ausencia de selección con antibióticos. Un método preferido supone la inactivación de genes para crear un fenotipo auxótrofo. Por ejemplo, en *M. tb* y BCG, la inactivación del gen *leuD* (Genome Seq ID n.º Mb3011C) crea un fenotipo dependiente de leucina y las cepas que poseen un gen *leuD* inactivado son dependientes de la complementación con leucina para sobrevivir (Hondalus *et al.*, Infect Immun. 68(5): 2888-98. 2000). Además, las cepas $\Delta leuD$ de *Mycobacterium* no pueden replicarse *in vivo* (Hondalus *et al.*, citado anteriormente, 2000), por tanto los mutantes $\Delta leuD$ de rBCG y *M. tb* mantendrán los plásmidos *leuD*⁺ *in vitro* e *in vivo*.

El método específico para introducir la mutación auxótrofa en las cepas de *Mycobacterium* diana no es importante para la presente invención y puede seleccionarse de cualquier método de intercambio alélico conocido por los expertos en la técnica (Parish *et al.*, Microbiology, 145: 3497-3503; 1999). De manera similar, la complementación de la mutación auxótrofa se logra introduciendo una copia funcional del gen inactivado (por ejemplo *leuD*⁺) en el vector de expresión. El vector de expresión también requiere un origen de replicación de *Mycobacterium* (por ejemplo OriM; Labidi *et al.*, Plasmid, 27(2): 130-140; 1992) para permitir la replicación en las cepas de *M. tb* y rBCG diana. Las cepas de *Mycobacterium* que albergan un plásmido de este tipo serán dependientes de la expresión del gen *leuD* codificado por el plásmido para la supervivencia tras la retirada de la leucina de los medios. ++

Desarrollo de vectores lanzadera unidireccionales novedosos

El procedimiento anterior describe un enfoque para crear un sistema de selección para el mantenimiento de vectores de expresión en *M. tb* y rBCG. Sin embargo, este sistema de vector debe poder replicarse en *Escherichia coli* para permitir la manipulación eficaz de la estructura del plásmido antes de su introducción en *Mycobacterium*. Además, para ampliar las cepas huésped de *E. coli* recombinantes potenciales que pueden utilizarse durante la construcción del plásmido, permitiendo de ese modo a los investigadores usar un huésped de *E. coli* que facilite la construcción

del plásmido, es preferible incluir un marcador de selección con antibióticos (por ejemplo resistencia a kanamicina) y un origen de replicación de intervalo de huésped amplio (por ejemplo OriE; Halpern *et al.*, Proc Natl Acad Sci, USA 76(12): 6137-6141; 1979; Mosig *et al.*, New Biol 1(2): 171-179; 1989) en el vector de expresión. Estos elementos están flanqueados por sitios de digestión con endonucleasas de restricción únicos (por ejemplo *NdeI*) para permitir la eliminación del marcador de resistencia a antibióticos y el origen de replicación de *E. coli* antes de introducir el plásmido en las cepas de *Mycobacterium* diana. Además, se incluyen sitios de endonucleasas de restricción únicos (por ejemplo *PacI*) en los que pueden introducirse los casetes de expresión de antígenos.

Una vez que se ha logrado esto en *E. coli* y el plásmido deseado se ha identificado y caracterizado, se aísla el ADN de plásmido recombinante y se digiere con la endonucleasa de restricción que libera el marcador de selección con antibióticos y el OriE. Entonces, se liga el ADN del plásmido digerido usando ADN ligasa de T4. El plásmido resultante contiene por tanto el gen que complementa la auxotrofia del huésped *Mycobacterium*, pero no presenta resistencia a antibióticos, y no puede replicarse en bacterias gram-negativas. El plásmido, que también puede incluir un casete de expresión de antígenos, se introduce entonces en el mutante auxótrofo de *Mycobacterium* diana usando procedimientos de electroporación convencionales. Las cepas recombinantes que albergan el plásmido se aíslan cultivándolas en medios que carecen del metabolito que se requiere para el crecimiento (por ejemplo leucina). La ventaja única de este sistema es que el plásmido de expresión final ya no posee el gen de resistencia a antibióticos. Por tanto no puede propagar el gen de resistencia a antibióticos al medio ambiente como plásmidos de expresión comúnmente usados en la actualidad. Además, el plásmido de expresión de la presente invención ya no tiene la capacidad de replicación en un intervalo de huésped amplio, puesto que se delecionan los elementos genéticos que permitían tal replicación. Tales vectores se denominan por tanto vectores lanzadera "unidireccionales".

Sobreexpresión de antígenos de TB

En la presente invención, el gen incorporado en el casete de expresión en el vector lanzadera unidireccional y luego en el rBCG puede codificar para un inmunógeno de *M. tb*. El inmunógeno de *M. tb* puede ser, por ejemplo, una proteína nativa de longitud completa, una fusión quimérica entre dos o más inmunógenos o miméticos de *M. tb*, o un fragmento o fragmentos de un inmunógeno de *M. tb* que se origina a partir de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los antígenos de *M. tb* se expresan por el vector lanzadera unidireccional bajo el control de un promotor que es activo durante al menos una fase de la infección micobacteriana *in vivo*. El promotor particular no es importante para la presente invención pero puede seleccionarse de promotores que son activos de manera constitutiva tales como: antígeno 85B, Hsp60, antígeno 85A, Rv1908c (*KatG*) y/o promotores que son activos durante la infección latente tal como el promotor para los genes Rv3130C (Florczyk *et al.*, Infect Immun 71(9): 5332-5343; 2003; Voskuil *et al.*, J Exr Med 198(5): 705-713; 2003), Rv2032, Rv3127 y/o Rv2031c. Para aumentar el nivel de expresión del antígeno, puede usarse un derivado que produce micélulas de las cepas de vector de *Mycobacterium*. Se producen cepas que producen micélulas de especies de *Mycobacterium* sobreexpresando FtsZ (base de datos de Genome n.º Mb2174c) o mediante inactivación dirigida al sitio de *whiB3*. La modificación del nivel de expresión de FtsZ o la inactivación de *whiB3* puede lograrse usando métodos genéticos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la sobreexpresión de FtsZ se logra incorporando el gen *ftsZ* en el vector lanzadera unidireccional bajo el control de un promotor fuerte, tal como los promotores para el antígeno 85B, antígeno 85A, Hsp60 o Rv1908c. (*KatG*), que son activos de manera constitutiva, y/o promotores que son activos durante la infección latente tales como los promotores para los genes Rv2032, Rv3127, Rv2031c y Rv3130C (Florczyk *et al.*, citado anteriormente; 2003; Voskuil *et al.*, citado anteriormente, 2003). La inactivación dirigida al sitio de *whiB3* se logra mediante intercambio alélico usando los procedimientos explicados resumidamente a continuación.

Ejemplos de antígenos foráneos que pueden insertarse en *Mycobacterium* recombinante

En la presente invención, el casete de expresión en el vector lanzadera unidireccional portado por el vector de *Mycobacterium* puede codificar para un inmunógeno, que puede ser o bien un inmunógeno foráneo de patógenos virales, bacterianos o parásitos, o bien un inmunógeno endógeno, tal como pero sin limitarse a un antígeno autoinmunitario o un antígeno tumoral. Los inmunógenos puede ser, por ejemplo, una proteína nativa de longitud completa; fusiones quiméricas entre un inmunógeno foráneo y un mimético o proteína endógena; o un fragmento o fragmentos de un inmunógeno que se origina a partir de patógenos virales, bacterianos y parásitos.

Tal como se usa en el presente documento, "inmunógeno foráneo" se refiere a una proteína o fragmento de la misma, que no se expresa normalmente en el tejido o célula animal receptora, tal como, pero sin limitarse a, proteínas virales, proteínas bacterianas, proteínas de parásitos, citocinas, quimiocinas, agentes inmunorreguladores o agentes terapéuticos.

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

en la técnica.

El inmunógeno foráneo puede ser cualquier molécula que se expresa por cualquier patógeno viral, bacteriano o parásito antes de o durante la entrada en, colonización de, o replicación en su huésped animal. El rBCG puede expresar inmunógenos o partes de los mismos que se originan a partir de patógenos virales, bacterianos y parásitos. Estos patógenos pueden ser infecciosos en seres humanos, animales domésticos o huéspedes de animales salvajes.

Los patógenos virales, de los que se derivan los antígenos virales, incluyen, pero no se limitan a, ortomixovirus, tal como virus de la gripe (ID de taxonomía: 59771; retrovirus, tal como VRS, VLTH-1 (ID de taxonomía: 39015) y VLTH-II (ID de taxonomía: 11909); virus del herpes tal como VEB (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); rhabdovirus, tal como rabia; picornovirus, tal como virus de la poliomielitis (ID de taxonomía: 12080); virus de la viruela, tal como vaccinia (ID de taxonomía: 10245); rotavirus (ID de taxonomía: 10912) y parvovirus, tal como virus adenoasociado 1 (ID de taxonomía: 85106).

Pueden encontrarse ejemplos de antígenos virales en el grupo que incluye pero no se limita a los antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana Nef (n.º de cat. del National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository 183; número de registro de Genbank n.º AF238278), Gag, Env (n.º de cat. del National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository 2433; número de registro de Genbank U39362), Tat (n.º de cat. del National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository 827; número de registro de Genbank M13137), derivados mutantes de Tat, tales como Tat-Δ31-45 (Agwale *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. en prensa. 8 de julio de 2002), Rev (n.º de cat. del National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository 2088; número de registro de Genbank L14572), y Pol (n.º de cat. del National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository 238; número de registro de Genbank AJ237568) y epitopos de células T y B 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, tales como pero sin restringirse a fusión entre gp120 y CD4 (Fouts *et al.*, J. Virol. 2000, 74:11427-11436; 2000); derivados truncados o modificados de env de VIH-1, tales como pero sin restringirse a gp140 (Stamatos *et al.* J Virol, 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; Syers, *et al.* J Virol, 74:5091-5100; 2000; Binley, *et al.* J Virol, 74:627-643; 2000), antígeno de superficie de la hepatitis B (número de registro de Genbank AF043578; Wu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:4726-4730; 1989); antígenos de rotavirus, tales como VP4 (número de registro de Genbank AJ293721; Mackow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:518-522; 1990) y VP7 (número de registro de Genbank AY003871; Green *et al.*, J. Virol., 62:1819-1823; 1988), antígenos del virus de la gripe tales como hemaglutinina (número de registro de Genbank AJ404627; Pertmer y Robinson, Virology, 257:406; 1999); nucleoproteína (número de registro de Genbank AJ289872; Lin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 9654-9658; 2000) antígenos del virus del herpes simple tales como timidina cinasa (número de registro de Genbank AB047378; Whitley *et al.*, En: New Generation Vaccines, páginas 825-854; 2004).

Los patógenos bacterianos, de los que se derivan los antígenos bacterianos, incluyen pero no se limitan a, *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Rickettsia spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.* y *Borellia burgdorferi*.

Los ejemplos de antígenos protectores de patógenos bacterianos incluyen los antígenos somáticos de *E. coli* enterotoxigénica, tales 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 la 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 capa superficial paracrystalina protectoras 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, J., *et al.*, Infect. Immun. 65:1286-92 ; 1997; Hess, J., *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; Cortesy-Theulaz, *et al.*, Infection & Immunity 66, 581-6; 1998), y el dominio de unión a receptor de la toxina letal y/o el antígeno protector de *Bacillus anthrax* (Price, *et al.*, Infect. Immun. 69, 4509-4515; 2001).

Los patógenos parásitos, de los que se derivan los antígenos de parásitos, incluyen pero no se limitan 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.*

Los ejemplos de antígenos protectores de patógenos parásitos incluyen los antígenos de circumsporozoito de *Plasmodium spp.* (Sadoff *et al.*, Science, 240:336-337; 1988), tales como el antígeno de circumsporozoito de *P. bergerei* o el antígeno de circumsporozoito de *P. falciparum*; el antígeno de superficie del merozoito 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* (Hyman *et al.*, Vaccine, 18: 3011-3017; 2000), paramiosina de *Brugia malayi* (Li *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 49:315-323; 1991), la triosa-fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* (Shoemaker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:1842-1846; 1992); la proteína similar a globina secretada de *Trichostrongylus colubriformis* (Frenkel *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 50:27-36; 1992); glutatión-S-transferasa de *Frasciola 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, las vacunas de rBCG pueden codificar 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, que incluye pero no se limita a inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y tumorales, o fragmentos y derivados de inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante y tumorales de los mismos. Por tanto, en la presente invención, rBCG pueden codificar para inmunógenos autoinmunitarios, de trasplante o tumorales, o partes o derivados de los mismos. Alternativamente, rBCG puede codificar para genes sintéticos (tal como se describió anteriormente), que codifican para antígenos autoinmunitarios, de trasplante o específicos de tumor o partes de los mismos.

Ejemplos de antígenos específicos de tumor incluyen antígeno específico de la 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. Immunother., 14:104-109; 1993). Recientemente se ha 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 a montar una respuesta inmunitaria para eliminar células tumorales malignas que manifiestan el mismo antígeno (Koeppen *et al.*, Anal. N.Y. Acad. Sci., 690:244-255; 1993).

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

Los ejemplos de antígenos autoinmunitarios incluyen la cadena β 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 β de IAS proporciona protección y tratamiento a ratones con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (Topham *et al.*, citado anteriormente, 1994).

Desarrollo de rBCG que expresa un adyuvante

Puede construirse rBCG que codifica para un inmunógeno y un adyuvante, y puede usarse para aumentar las respuestas del huésped al rBCG. De manera alternativa, puede construirse rBCG que codifica para un adyuvante, en mezclas con otros rBCG para aumentar las respuestas del huésped a inmunógenos codificados por el rBCG compañero.

El adyuvante particular codificado por el rBCG no es crítico para la presente invención y puede ser la subunidad A de la toxina colérica (es decir, CtxA; número de registro de Genbank X00171, AF175708, D30053, D30052), o partes y/o derivados mutantes de la misma (por ejemplo el dominio A1 de la subunidad A de Ctx (es decir, CtxA1; número de registro de Genbank n.º K02679), de cualquier *Vibrio cholerae* clásico (por ejemplo la cepa de *V. cholerae* 395, n.º de ATCC 39541) o la cepa de *V. cholerae* El Tor (por ejemplo la cepa de *V. cholerae* 2125, n.º de ATCC 39050). Alternativamente, puede usarse cualquier toxina bacteriana que sea un 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 (número de registro de Genbank M35581), subunidad S1 de la toxina pertussis (por ejemplo *ptxS1*, número de registro de Genbank AJ007364, AJ007363, AJ006159, AJ006157, etc.); como una alternativa adicional el adyuvante puede ser una de las adenilato ciclasa-hemolisinas 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* (número de registro de Genbank X14199), *B. parapertussis* (número de registro de Genbank AJ249835) o *B. bronchiseptica* (número de registro de Genbank Z37112).

Desarrollo de rBCG que expresa un agente inmunorregulador

Puede construirse rBCG que codifica para un inmunógeno y un citocina, y puede usarse para aumentar respuestas del huésped al rBCG. Alternativamente, puede construirse rBCG que codifica para dicha citocina sola, en mezclas

con otro rBCG para aumentar las respuestas del huésped a inmunógenos codificados por el rBCG compañero.

La citocina particular codificada por el rBCG no es crítica para la presente invención y puede incluir, pero no se limita a, interleucina-4 (denominada en el presente documento "IL-4"; número de registro de Genbank AF352783 (IL-4 murina) o NM_000589 (IL-4 humana)), IL-5 (número de registro de Genbank NM_010558 (IL-5 murina) o NM_000879 (IL-5 humana)), IL-6 (número de registro de Genbank M20572 (IL-6 murina) o M29150 (IL-6 humana)), IL-10 (número de registro de Genbank NM_010548 (IL-10 murina) o AF418271 (IL-10 humana)), IL-12_{p40} (número de registro de Genbank NM_008352 (IL-12 p40 murina) o AY008847 (IL-12 p40 humana)), IL-12_{p70} (número de registro de Genbank NM_008351/NM_008352 (IL-12 p35/40 murina) o AF093065/AY008847 (IL-12 p35/40 humana)), TGFβ (número de registro de Genbank NM_011577 (TGFβ1 murino) o M60316 (TGFβ1 humano)), y TNFα (número de registro de Genbank X02611 (TNFα murino) o M26331 (TNFα humano)).

La apoptosis es la muerte celular programada, que difiere drásticamente de la muerte celular necrótica en cuanto a su inducción y consecuencias. La apoptosis de células que contienen antígenos foráneos es un estímulo conocido poderoso de inmunidad celular contra tales antígenos. El proceso por el que la apoptosis de células que contienen antígenos conduce a inmunidad celular se ha denominado a veces sensibilización cruzada. (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. Villyangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199:9; Gallucci, S., M. Lolkema, y P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Biotechnology*. 5:1249; 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). Existen varios mecanismos para la inducción de la 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. La producción de caspasa 8 por rBCG y la secreción en el citoplasma de células eucariotas por rBCG en el contexto de antígenos foráneos expresados por el rBCG, frente a BCG y otros antígenos de tuberculosis sobreexpresados por el rBCG así como frente a antígenos del propio BCG conducirán a altos niveles de inmunidad celular específica de antígeno. El receptor 5 de muerte (DR-5) también conocido como TRAIL-R2 (receptor 2 de TRAIL) o TNFR-SF-10B (miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 10B) también media la apoptosis mediada por caspasa 8 (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). La apoptosis inducida por reovirus está mediada por TRAIL-DR5 que conduce a la eliminación posterior del virus (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). La expresión de DR-5 por BCG recombinante proporcionará un efecto adyuvante potente para la inducción de inmunidad celular específica de antígeno contra antígenos expresados por rBCG. También puede inducirse que células que expresan antígenos experimenten apoptosis a través de ligación de Fas que es un fuerte estímulo para la inducción de respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno (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).

BCG recombinante que expresa Fas o la proteína de fusión dominio citoplasmático de Fas/ectodominio de CD4 inducirá apoptosis y respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno.

La potenciación de inmunidad celular mediante rBCG, que producen potenciadores de la apoptosis tal como se describe anteriormente no se limita a antígeno o antígenos de BCG específicamente codificados para su sobreexpresión por rBCG sino que incluye cualquier antígeno en la célula eucariota que el rBCG mencionado anteriormente puede invadir. Como ejemplo, si se administra un rBCG de este tipo a células tumorales en las que se induce apoptosis, entonces se inducirá inmunidad celular contra antígenos tumorales importantes con eliminación, reducción o prevención del tumor y/o metástasis. Este efecto antitumoral será 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, rBCG potenciado por la producción de mediadores específicos de apoptosis, suministrados dentro del tumor u otras células en las que tal rBCG también produce antígenos foráneos contra los que se montarán respuestas inmunitarias celulares fuertes, inducirá la producción de respuestas celulares fuertes contra las células que contienen estos antígenos foráneos. Estas respuestas celulares conducirán a la destrucción de células tumorales mediada por el sistema inmunitario, sensibilización cruzada adicional e inducción de inmunidad celular contra el tumor u otros antígenos importantes con eliminación, reducción o prevención posterior del tumor y/o metástasis. Un ejemplo de un antígeno foráneo de este tipo es un antígeno HLA diferente del HLA de la célula huésped contra el que se montará una respuesta celular heteróloga fuerte.

rBCG cuyas propiedades de inducción apoptótica se potencian mediante la expresión de mediadores específicos de la apoptosis que también expresa antígenos tumorales específicos inducirá respuestas celulares específicas de antígeno fuertes contra estos antígenos tumorales, incluyendo la rotura de cierta tolerancia para estos antígenos que conduce a la eliminación, reducción o prevención de tumores y/o metástasis sin la necesidad de suministro directo del rBCG en el propio tumor.

La apoptosis que sigue al daño en el ADN o la caspasa 9 induce tolerancia a ciertos antígenos (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). La inducción de tolerancia es importante para controlar o prevenir 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 u otras proteínas que inducen tolerancia mediada por la apoptosis por rBCG en células tales como pero sin limitarse a células pancreáticas B, células nerviosas y colorrectales producirá apoptosis limitada que inducirá tolerancia contra las dianas antigénicas de autoinmunidad en esas células tratando o previniendo de ese modo el estado patológico autoinmunitario. La identificación de antígenos específicos implicados en las reacciones autoinmunitarias permitirá la inducción de tolerancia contra esos antígenos diana autoinmunitarios a través de la producción de rBCG de tanto estos antígenos como la caspasa 9 u otras moléculas que pueden inducir tolerancia mediada por la apoptosis. Tal rBCG tratará y/o prevendrá estas enfermedades autoinmunitarias.

Se describen a continuación procedimientos de ADN y ARN recombinante para la introducción de casetes de expresión funcionales para generar rBCG que puede expresar un agente inmunorregulador en tejidos o células eucariotas.

Los siguientes ejemplos deben 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 los procedimientos, condiciones y materiales alternativos pueden variarse y permanecer dentro del conocimiento del experto habitual sin apartarse del alcance general de la invención como se enseña en la memoria descriptiva.

EJEMPLOS

MÉTODOS

Cultivo de cepas de *Mycobacterium*

Se hicieron crecer en cultivo cepas de BCG seleccionadas en medios líquidos, tal como Middlebrook 7H9 o medio sintético Saulton, preferiblemente a 37°C. Las cepas pueden mantenerse como cultivos agitados o estáticos. Además, la tasa de crecimiento de BCG puede aumentarse mediante la adición de ácido oleico (al 0,06% v/v; Research Diagnostics n.º de catálogo 01257) y detergentes tales como tiloxapol (al 0,05% v/v; Research Diagnostics n.º de catálogo 70400). La pureza de los cultivos de BCG pueden evaluarse extendiendo de manera uniforme alícuotas de 100 µl del cultivo de BCG diluido en serie (por ejemplo etapas de 10 veces a partir del cultivo puro - 10⁸) en solución salina tamponada con fosfato (denominada en el presente documento PBS) sobre placas de 3,5 pulgadas que contienen 25-30 ml de medios sólidos, tal como Middlebrook 7H10. Además, la pureza del cultivo puede evaluarse adicionalmente usando kits comercialmente disponibles tales como medio de tiglicolato (Science Lab, n.º de catálogo 1891) y medio de caseína y soja (BD, n.º de catálogo 211768).

Se almacenan lotes simiente de BCG a -80°C a una densidad de 0,1-2 x 10⁷ ufc/ml. Los cultivos líquidos se recogen normalmente a una densidad óptica (a 600 nm) de 0,2 - 4,0 con respecto a un control estéril; se colocan los cultivos en tubos de centrifuga de un tamaño apropiado y se someten los microorganismos a centrifugación a 8.000 x g durante 5-10 min. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden los microorganismos en disolución de almacenamiento compuesta de Middlebrook 7H9 que contiene el 10-30% (v/v) de glicerol a una densidad de 0,1-2 x 10⁷ ufc/ml. Se dispensan estas suspensiones en viales congelados de silicato de boro de 1,5 ml, estériles en alícuotas de 1 ml y luego se colocan a -80°C.

Técnicas de biología molecular generales

Se usan 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 del fabricante; se prepara ADN de plásmido usando kits de purificación de ADN de plásmidos a pequeña escala (kit de Qiagen Miniprep[®], Santa Clarita, CA) o a gran escala (kit de Qiagen Maxiprep[®], Santa Clarita, CA) según los protocolos del fabricante (Qiagen, Santa Clarita, CA); se adquiere tampón de electroforesis en gel de agarosa, agarosa ultra pura, etanol al 100% (v/v), MgCl₂ 1 M, EDTA pH 8,0, Tris-HCl (pH 7,5) y agua milli-Q de calidad para biología molecular, libre de nucleasa, de Life Technologies, Gaithersburg, MD. Se realizan digestiones mediante 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). La secuenciación de nucleótidos para verificar la secuencia de ADN de cada plásmido recombinante descrita en las siguientes secciones se logró mediante técnicas de secuenciación de ADN automatizadas convencionales usando un secuenciador automatizado de Applied Biosystems, modelo 373A.

Se adquieren cebadores de PCR de proveedores comerciales tales como Sigma (St. Louis, MO) y se sintetizan usando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems (modelo 373A). Se usan cebadores de PCR a una

concentración de 150-250 μ M y se determinan 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 realizan las PCR en un Strategene Robocycler, modelo 400880 (Strategene, La Jolla, CA). Se diseñan los cebadores de PCR para las amplificaciones usando el software Clone Manager[®] versión 4.1 (Scientific and Educational Software Inc., Durham NC). Este software permite el diseño de cebadores de PCR e identifica los sitios de ER que son compatibles con los fragmentos de ADN específicos que se están manipulando. Se realizan las PCR en un dispositivo termociclador, tal como el Strategene Robocycler, modelo 400880 (Strategene), y se fijan los tiempos de hibridación, elongación y desnaturalización del cebador en las PCR según procedimientos convencionales (Straus *et al.*, citado anteriormente, 1990). Las digestiones con ER y las PCR se analizan posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa usando procedimientos convencionales (Straus *et al.*, citado anteriormente, 1990; y Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 1989). Se define un clon positivo como uno que presenta el patrón de ER y/o el patrón de PCR apropiados. Pueden evaluarse adicionalmente los plásmidos identificados a través de este procedimiento usando procedimientos de secuenciación de ADN convencionales, tal como se describió anteriormente.

Se adquieren cepas de *Escherichia coli*, tales como DH5 α , y Sable2^R, de Life Technologies (Gaithersburg, MD) y sirven como huésped inicial de los plásmidos recombinantes descritos en los ejemplos más adelante. Se introducen plásmidos recombinantes en las cepas de *E. coli* mediante electroporación usando un dispositivo de electropulsos de alto voltaje, tal como el pulsador de genes (BioRad Laboratories, Hercules, CA), fijado a 100-200 Ω , 15-25 μ F y 1,0-2,5 kV, tal como se describe (Straus *et al.*, citado anteriormente, 1990). Se identifican las condiciones de electroporación óptimas determinando parámetros que dan como resultado tasas de transformación máximas por mcg de ADN por bacteria.

Se hacen crecer cepas bacterianas en agar de tripticasa y soja (Difco, Detroit, MI) o en caldo de tripticasa y soja (Difco, Detroit, MI), que se elaboran según las indicaciones del fabricante. A menos que se establezca lo contrario, todas las bacterias se hacen crecer a 37°C en CO₂ al 5% (v/v) con agitación suave. Cuando resulta apropiado, se complementan los medios con antibióticos (Sigma, St. Louis, MO). Se almacenan las cepas bacterianas a -80°C suspendidas en (Difco) que contiene el 30% (v/v) de glicerol (Sigma, St. Louis, MO) a aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colonia (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 tales 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 las normativas gubernamentales, mientras que los métodos usados anteriormente, aunque eficaces, tienen registros de cultivo de laboratorio escasamente documentados y por tanto no es probable que cumplan esas normativas. El cumplimiento de dicha normativa es esencial si un producto va a aprobarse para su uso en seres humanos por las autoridades normativas de Estados Unidos y Europa.

Un vector suicida para el intercambio alélico en *Mycobacterium* es un plásmido que tiene capacidad de replicarse en cepas de *E. coli* pero no tiene capacidad de replicación en *Mycobacterium spp.*, tal como *M. tb* y la BCG. El vector suicida específico para su uso en los 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. Un diseño preferido de un plásmido suicida para el intercambio alélico se muestra en la figura 1. El plásmido comprende los siguientes segmentos de ADN: una secuencia de oriE para que el plásmido se replique en *E. coli* (número de registro de GenBank L09137), una secuencia de resistencia a kanamicina para la selección tanto en *E. coli* como en *Mycobacterium* (número de registro de GenBank AAM97345), y un marcador de selección de antibióticos adicional (por ejemplo, el gen de resistencia a zeocina (número de registro de GenBank AAU06610), que estará bajo el control de un promotor de *Mycobacterium* (por ejemplo, el promotor *hsp60*). El segundo marcador de selección de antibióticos no es esencial pero se incluye para permitir la selección doble para prevenir el crecimiento de aislados con resistencia a kanamicina espontáneos durante el proceso de intercambio alélico (Garbe *et al.*, Microbiology 140: 133-138; 1994).

La construcción de tales vectores suicidas puede lograrse usando técnicas de ADN recombinante convencionales tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, los criterios normativos actuales han aumentado el espectro de introducir partículas de priones obtenidas de productos expuestos a productos bovinos que contienen material infectado con BSE. Para evitar la introducción de materiales (por ejemplo secuencias de ADN) en la cepa diana de origen desconocido, por tanto, es preferible que todos los ADN en el vector suicida se preparen de manera sintética por fuentes comerciales (por ejemplo Picoscript, Inc.). Por consiguiente, un método preferido para la construcción de vectores suicidas es reunir un esquema de secuencias de ADN usando software para ADN (por ejemplo Clone Manager), luego sintetizar el ADN en un modo de pago por servicio por cualquier proveedor comercial que ofrece tal servicio (por ejemplo Picoscript Inc.). Este método se usó para producir un vector suicida, pAF100 (no mostrado) que luego se modificó adicionalmente por la presente solicitud particular (pAF103, representada esquemáticamente en la figura 1 y descrita adicionalmente en la tabla 1).

Tabla 1. Vector suicida

Nombre	Estructura principal	Alelo específico para el intercambio de alelos
pAF103	pAF100	Regiones flanqueantes de 1 kb del gen <i>leuD</i>

Un vector suicida de este tipo tiene ventajas, tales como que contiene dos marcadores de selección de antibióticos, minimizando de ese modo la selección de mutantes espontáneos que presentan resistencia a un antibiótico, lo que se produce a aproximadamente $1/10^5$ por generación. La resistencia espontánea a dos antibióticos es extremadamente rara y sólo se produce a aproximadamente $1/10^{16}$ por generación. Por tanto, hay una probabilidad de menos de $1/10^6$ de que se produzcan cepas doblemente resistentes en los cultivos usados para realizar el procedimiento de intercambio alélico.

Para la selección negativa durante el proceso de intercambio alélico, se incluye un gen *sacB* (Genoma Seq. ID N.º NT01BS4354), que confiere un fenotipo sensible a sacarosa, para enriquecer los cultivos con cepas que se han sometido a la etapa de recombinación de ADN final y han completado el intercambio alélico.

Formulación y estrategias de vacunación

La estrategia para la formulación de vacunas se estructura en estudios para determinar la estabilidad y viabilidad máximas a lo largo de todo el proceso de fabricación. Esto incluye la determinación de la máxima viabilidad de los microorganismos (vivos con respecto a muertos) durante el cultivo utilizando una variedad de medios comúnmente usados para el cultivo de *Mycobacteria* incluyendo la adición de glicerol, azúcares, aminoácidos, y detergentes o sales. Tras el cultivo, las células se recogen mediante centrifugación o filtración en flujo tangencial y se resuspenden en un medio estabilizante que permite la protección de las células durante el proceso de congelación y liofilización. Los agentes estabilizantes comúnmente usados incluyen glutamato de sodio, o aminoácidos o derivados de aminoácidos, glicerol, azúcares o sales comúnmente usadas. La formulación final proporcionará un microorganismo suficientemente viable para su administración mediante inyección intradérmica, percutánea, perfusión o administración oral con estabilidad suficiente para mantener una vida útil de almacenamiento adecuada para su distribución y uso.

Evaluación preclínica de vacunas contra la TB

Pruebas de seguridad generales

Se infectaron ratones BALB/c en grupos de seis por vía intraperitoneal con 2×10^6 UFC de la(s) cepa(s) de rBCG de interés y las cepas progenitoras análogas. Se monitorizan los animales para determinar su salud general y peso corporal durante 14 días tras la infección. Los animales que reciben las cepas de BCG y rBCG permanecen sanos, y no pierden peso ni presentan signos evidentes de enfermedad durante el periodo de observación.

Virulencia de cepas de rBCG novedosas en ratones inmunocompetentes

Se infectan grupos de 15 ratones BALB/c inmunocompetentes por vía intravenosa con 2×10^6 de la cepa progenitora de BCG y rBCG respectivamente. El día uno tras la infección, se sacrificarán tres ratones en cada grupo y se analizarán las UFC en el bazo, pulmón e hígado para asegurarse de que cada animal tiene igual dosis 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 el bazo, hígado y pulmón para evaluar el crecimiento *in vivo* de las cepas de rBCG en comparación con la cepa de BCG progenitora. Se espera que las cepas de rBCG presenten una virulencia similar a la de las de BCG progenitora.

Pruebas de seguridad estrictas en ratones inmunocomprometidos

Se infectan ratones inmunocomprometidos que tienen SCID (inmunodeficiencia combinada grave) en grupos de 10 por vía intravenosa con 2×10^6 ufc de la cepa rBCG y BCG progenitora, respectivamente. El día uno tras la infección, se sacrifican tres ratones en cada grupo y se evalúan las ufc en el bazo, hígado y pulmón para verificar las dosis de inoculación. Se monitorizan los siete ratones restantes en cada grupo para determinar su salud general y el peso corporal. Se realiza un seguimiento de la supervivencia de estos ratones y los resultados se consideran satisfactorios cuando la supervivencia de ratones infectados con rBCG no es peor que la del animal infectado con la cepa progenitora en el periodo de observación completo.

Prueba de seguridad en cobayas

La seguridad de cepas de rBCG también se evalúa en el modelo de cobaya en comparación con la vacuna de BCG progenitora, 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 recombinantes y progenitoras, y se monitorizan los animales para determinar su salud general y el peso corporal durante seis

semanas. Se realiza la autopsia para los animales que mueren antes del periodo de seis semanas. Todos los animales se sacrifican al final de las seis semanas tras la infección y se realiza el examen de patología macroscópica. No hay pérdida de peso corporal, ni comportamiento anómalo y todos los órganos parecen normales en la autopsia en la semana 6. Se indica una prueba satisfactoria cuando no se observan efectos adversos en la salud para la vacuna de rBCG-Pfo, y los animales aumentan de peso a la tasa normal en comparación con los animales inoculados con la cepa progenitora.

Al mismo tiempo, se monitorizan los niveles bacterianos en los órganos de los animales. Cobayas inmunizadas con la vacuna o bien progenitora o bien recombinante se sacrifican a diversos intervalos tras la inoculación, tras lo cual se evalúan los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos regionales (inguinales) para determinar las ufc de BCG o rBCG.

Prueba de toxicidad:

Para evaluar la toxicidad de las cepas de rBCG, se vacunan 12 cobayas en cada grupo por vía intradérmica con una dosis, cuatro veces superior a la dosis única o cuatro veces inferior a la dosis única para uso humano de cepas de rBCG, cepa progenitora de BCG o solución salina respectivamente. En el día tres 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 examinan la patología macroscópica y el aspecto de los sitios de inyección. Se extraen muestras de sangre para realizar la bioquímica de la sangre, y se realiza la histopatología de los órganos internos y los sitios de inyección.

Estudios para determinar la protección:

Estudio de protección murino

Se inmunizan ratones C57B1/6 (hembra, 5-6 semanas de edad) en grupos de 13 por vía subcutánea con 10^6 UFC de rBCG, BCG progenitora o solución salina. Se usa otro grupo de ratones como controles sanos. Ocho semanas tras la inmunización, los ratones se exponen a la cepa Erdman de *M. tb* (o cepa resistente a Kan H37Rv) mediante un aerosol generado a partir de una suspensión celular única de 10 ml que contiene un total de 10^7 UFC de la cepa de exposición, una dosis que administra 100 bacterias vivas a los pulmones de cada animal, tal como se describió anteriormente. Se monitorizan los animales de experimentación para determinar la supervivencia junto con animales no expuestos. Tras la exposición, los animales también se monitorizan para determinar la pérdida de peso y salud general. En el día uno tras la exposición, se sacrifican tres ratones en cada grupo para determinar las ufc en pulmón para confirmar la dosis de exposición y uno se sacrifica para determinar la histopatología de bazo y pulmón. Entonces, cinco semanas tras la exposición, se sacrifican nueve animales en cada grupo, y se realiza el análisis de histopatología y microbiología del animal. Se evalúan tejidos de pulmón y bazo de seis ratones para el recuento de ufc (se usan placas con aportes complementarios de selección para distinguir la cepa de la vacuna de la cepa de exposición). Si se exponen a la cepa resistente a Kan H37Rv, se usa Kan o TCH para distinguir la cepa de exposición de la cepa de la 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 naturalmente resistente).

Inducción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) cutánea.

Se inmunizaron cobayas libres de patógenos específicos (SPF) por vía intradérmica con 10^3 cepas de rBCG o de BCG progenitora. Nueve semanas tras inmunización, se afeitan el lomo de los animales y se les inyecta por vía intradérmica 10 μ g de PPD en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato. Tras 24 horas, se mide el diámetro de la induración dura. Las cepas de rBCG deben inducir a DTH igual a o superior a la inducido por las cepas de BCG progenitoras.

Estudio de exposición en cobayas

Para determinar la eficacia de las vacunas de rBCG frente a la exposición a *M. tb*, se inmunizan cobayas (SPF Hartley adultos jóvenes, 250-300 gramos, macho) en grupos de 12, cada uno con cepa rBCG, BCG progenitora o solución salina. Las vacunas y controles se administran por vía intradérmica con 10^6 ufc. A las 10 semanas tras la inmunización, los animales inmunizados con rBCG, BCG y simulación se exponen mediante aerosol a *M. tb* mediante un aerosol generado a partir de una suspensión celular única 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.*, J Infect Dis. 190(1), 2004). Tras la exposición, se monitorizan los animales para determinar la supervivencia junto con un grupo sano de animales no expuestos, no vacunados. Tras la exposición, se monitorizan los animales para determinar la pérdida de peso y la salud general. 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 realiza el análisis de histopatología y microbiología del animal. 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 la vacuna de la cepa de exposición). Si se exponen a la cepa resistente a Kan H37Rv, se usa Kan o TCH para distinguir la cepa de exposición de la cepa de la vacuna. Si se usa la cepa Erdman de *M. tb* para la exposición, se usa TCH (BCG es sensible pero *M. tb* es naturalmente resistente) para distinguir la cepa de vacuna de la cepa de exposición. Se indica una prueba satisfactoria cuando los animales inmunizados con simulación mueren más rápido tras la exposición, mientras que los animales inmunizados con rBCG sobreviven más tiempo que los animales inmunizados con la cepa de BCG progenitora.

Estudio de exposición y seguridad en primates:

Más recientemente, el mono *Cynomolgus* se ha usado para la evaluación de vacunas frente a *M. tb*. La relación evolutiva entre seres humanos y primates no humanos y las manifestaciones patológicas y clínicas similares de la tuberculosis en estas especies han hecho atractivo el modelo de primates no humano para estudios experimentales de la enfermedad de la TB y la eficacia de la vacuna.

Este modelo, caracterizado por el desarrollo de cavitación en el pulmón, parece ser aplicable a la TB humana. Se sigue el curso de la infección y la enfermedad por rayos X y pérdida de peso, así como por una variedad de pruebas hematológicas, incluyendo velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), proliferación de células mononucleares en sangre periférica (PBMC) y producción de citocina, actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL), y respuesta de anticuerpos. Tras la infección, el mono *Cynomolgus* desarrolla patología de pulmón con lesiones características y, dependiendo de las dosis de exposición, la muerte por infección respiratoria aguda se produce en el plazo de cuatro a seis meses tras la infección. Las dosis de infección inferiores pueden conducir a infecciones crónicas sin enfermedad, muy similares en seres humanos.

Diseño del estudio

El estudio comparará directamente diversas dosis de la cepa de BCG progenitora frente a BCG recombinante administrada o bien sola o bien seguida por dos administraciones de refuerzo posteriores con la vacuna que comprende secuencias que se sobreexpresan en los constructos de rBCG. Esta última podría administrarse o bien como proteína recombinante basada en una formulación de adyuvante adecuada, ADN o bien como constructos de Ad35.

El primer estudio evalúa la eficacia protectora de BCG progenitora frente a los constructos de rBCG sin una administración de refuerzo. Este estudio comprende tres grupos (10 animales cada uno) diseñados de la siguiente forma: cada grupo comprende BCG, rBCG y solución salina. Se realizan pruebas cutáneas a dos animales de cada grupo con los antígenos sobreexpresados en los constructos de rBCG así como con PPD convencional y solución salina como controles. Una induración prolongada y positiva en el grupo de rBCG en comparación con BCG es indicativa de la captación de la vacuna *in vivo* y la provocación de una respuesta inmunitaria. Los ocho animales restantes de cada grupo se exponen con aerosol con 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 o con la supervivencia como criterio de valoración.

El seguimiento del protocolo de sensibilización con BCG es esencialmente el mismo que el anterior excepto en que primero se vacunan los animales con BCG, rBCG y solución salina, seguido por dos administraciones de refuerzo con los antígenos sobreexpresados.

El estudio de inmunogenicidad y protección en el modelo de primate no humano tendrá como objetivo investigar los aspectos inmunobiológicos e inmunopatológicos de la tuberculosis en macacos para realizar estudios de eficacia sobre constructos de rBCG. Los animales se crían en cautividad desde crías hasta adultos jóvenes con un peso promedio de 2 a 3 Kg que se han acondicionado meticulosamente antes del inicio del experimento. Los estudios de preinoculación consisten de análisis de sangre básicos que incluyen estudios hematológicos de rutina y velocidades de sedimentación de eritrocitos así como ensayos de proliferación de linfocitos. Se realizan pruebas cutáneas con PPD para asegurarse de la falta de sensibilidad a tuberculina y se obtienen radiografías de tórax como parte del perfil previo a la infección. El periodo de inmunización durará 21 semanas en total, cubriendo la vacunación primaria con BCG o rBCG en la semana = 0 y refuerzos de antígenos en las semanas 12 y 16. Se evalúa la inmunidad específica de antígeno midiendo la proliferación y secreción de interferón γ (IFN γ) en pruebas de estimulación de linfocitos. La frecuencia de linfocitos que producen IFN γ se determina mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISPOT) o citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Con este fin, se extraen muestras de sangre en las semanas 0, 4, 8, 12, 16 y 20 con respecto a la vacunación primaria.

De cuatro a seis semanas tras la última inmunización se expondrá a 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. El transcurso de la infección se evaluará por la pérdida de peso, fiebre, ESR elevada, DTH a PPD, respuesta proliferativa *in vitro* de PBMC estimulada con PPD y los antígenos sobreexpresados en rBCG seguido por mediciones de los niveles de producción de IFN-g. Se realizará radiografía de tórax para detectar anomalías que concuerden con TB pulmonar, y

finalmente, se llevará a cabo la autopsia en las semanas 12-16 tras la exposición.

Evaluación clínica de vectores y vacunas contra la TB

5 **Estudios de seguridad y toxicidad:** Los estudios de seguridad y toxicidad preclínica a los que obligan las directrices normativas se realizan como estudios de toxicología y seguridad preclínica tal como se describió anteriormente. Tras estos estudios se realizan estudios de seguridad en seres humanos. Se realizan estos estudios inicialmente en adultos sanos con resultados negativos en la prueba de Quantiferon, seguidos por disminución en edad hacia niños y neonatos.

10 **Estudios de inmunogenicidad:** Los estudios de inmunogenicidad en ratones y primates pueden utilizar, pero no se limitan a, métodos convencionales de evaluación de la inmunidad celular tal como INF γ , ELISPOT y/o citometría de fluido con estimulación con péptidos o antígenos a corto y largo plazo. Se utilizan metodologías similares para la evaluación de respuestas en seres humanos. Se emplean estudios de tetrámeros para la evaluación de repuestas de CD4 y CD8 tras la vacunación de seres humanos.

15 **Optimización de estrategias de sensibilización - refuerzo:** rBCG funciona bien como vacuna independiente contra la TB u otras enfermedades para lo que se ha obtenido mediante ingeniería genética que exprese transgenes relevantes. Tal como se usa en el presente documento, un "transgén" es un segmento de ADN que esta funcionalmente unido a un promotor de micobacterias y que expresa una proteína de interés. rBCG tal como se describe en el presente documento como vacuna contra la TB o que expresa transgenes para proteger contra otras enfermedades también funciona extremadamente bien para sensibilizar el sistema inmunitario para la inmunización de refuerzo con proteínas recombinantes mezcladas con adyuvantes o antígenos de vectores virales o bacteriales. Tanto en estudios preclínicos con animales como en estudios con seres humanos, la sensibilización con BCG seguida por refuerzo con proteína recombinante/adyuvante o vector se optimiza en lo que se refiere a los regímenes y las dosis. Estas estrategias de sensibilización – refuerzo son los medios más potentes para inducir inmunidad en seres humanos debido a la potencia de la sensibilización con BCG especialmente tal como se realiza en esta invención seguida por centrarse y potenciar la repuesta de la administración de refuerzo del sistema inmunitario mediante la proteína recombinante o el vector.

Estudios de vacuna terapéutica tras la exposición en animales

Se usarán ratones C57BL/6 para estabilizar la infección latente; se administrarán vacunas terapéuticas a los ratones en el punto de tiempo en que sólo se haya inducido inmunidad específica frente a *M. tb* insignificante mediante infección a dosis baja y en otro punto de tiempo en que la inmunidad específica frente a la *M. tb* disminuya y predomina con células T de memoria. Entonces se evaluará el beneficio terapéutico de las vacunas en ratones dos y cinco meses tras la última administración de vacuna terapéutica enumerando los recuentos de ufc en pulmones y bazo de ratones individuales. Los recuentos de ufc se analizarán mediante métodos estadísticos convencionales en los grupos de ratones y los resultados se usarán para abordar si la vacunación terapéutica reduce significativamente la infección con *M. tb* latente 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 rBCG

45 La vacunación oral del animal diana con el rBCG de la presente invención también puede lograrse usando métodos anteriormente descritos (Miller *et al.*, Can Med Assoc J 121(1): 45-54; 1979). La cantidad del rBCG administrada por vía oral variará dependiendo de las especies del sujeto, así como la enfermedad o el estado que está tratándose. Generalmente, la dosificación empleada será de aproximadamente 10^3 a 10^{11} organismos viables, preferiblemente de aproximadamente 10^5 a 10^9 organismos viables.

50 El rBCG generalmente se administra junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. El portador o diluyente farmacéuticamente aceptable particular empleado no es crítico para la presente invención. Los ejemplos de diluyentes incluyen una 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.*, Lancet, II: 467-470; 1988). Los ejemplos de portadores incluyen proteínas, por ejemplo, como las que se encuentran en la leche desnatada, azúcares, por ejemplo, sacarosa, o polivinilpirrolidona. Normalmente estos portadores se usan a una concentración de aproximadamente el 0,1-90% (p/v) pero preferiblemente a un intervalo del 1 - 10% (p/v).

EJEMPLOS**Ejemplo 1. Potencia de cepas de BCG progenitoras en cobayas: estudio de protección de cobayas con rBCG 30.**

5 Como ejemplo de un estudio realizado con la vacuna de rBCG30 existente, se realizó un gran estudio en cobayas dirigido a comparar la eficacia protectora de dos lotes de rBCG30 con la misma cepa de BCG Tice progenitora y otra vacuna de BCG disponible comercialmente (cepa SSI-1331) usada en todo el mundo en seres humanos. Los dos lotes de rBCG30 se produjeron o bien en condiciones de laboratorio (rBCG30-UCLA) o bien se fabricaron en condiciones de GMP (rBCG30-KIT) para uso en seres humanos.

10 Se inmunizaron cobayas (10 animales por grupo) por medio de la vía subcutánea con una dosis única de 10^3 ufc de cada una de las vacunas de BCG. Se incluyó un grupo control negativo (inmunizados con solución salina) en el estudio. Ocho semanas tras la vacunación, se expusieron los animales con la cepa virulenta Erdman por medio de la vía de aerosol calibrando el compartimiento del nebulizador del aparato de infección aerotransportada Middlebrook para administrar aproximadamente 10-15 bacterias en los pulmones. Se sacrificaron los animales a las 10 semanas tras la exposición. En la necropsia, se extrajeron los pulmones y los bazo de los animales y se determinó el número de bacterias viables sembrando en placa diluciones de 10 veces en serie de homogenados de bazo y lóbulo pulmonar sobre Middlebrook 7H11 nutriente. Se contaron las formaciones de colonias bacterianas tras 21 días de incubación a 37°C bajo un 5% (v/v) de CO₂. Se expresan los datos como log₁₀ del número medio de bacterias recuperadas.

Los resultados (figura 2) indican que mientras que todas las vacunas eran protectoras frente a la exposición con Mtb en comparación con el control negativo, de solución salina, las diferencias entre las vacunas tienden a estar en dos grupos:

- 1) siendo rBCG30 (UCLA) y BCG Danish 1331 más protectoras; y
- 2) siendo BCG (cepa Tice progenitora) y rBCG30 (KIT) menos protectoras.

Es por tanto razonable concluir que mientras que rBCG30 (UCLA) producida en condiciones de laboratorio, pero no con calidad de GMP, parece inducir mejor la protección que la cepa Tice progenitora, en el mejor de los casos, la eficacia protectora es comparable sólo con la BCG SSI disponible comercialmente. Por tanto, una mejora en BCG Danish 1331 debe ser el objetivo de la generación de una nueva vacuna de rBCG.

EJEMPLO 2. Construcción de huéspedes para que sirvan como portadores de vectores de expresión que carecen de marcadores de resistencia a antibióticos

Construcción del plásmido para el gen leuD desactivado en la cepa Danish 1331 de BCG: Se ensamblaron entre sí las regiones flanqueantes de 1 kb izquierda y derecha del gen leuD mediante síntesis de ADN (DNA 2.0, CA) para formar un segmento de ADN de 2 kb con sitios pacl en ambos extremos. Se clonó este fragmento de ADN en el plásmido de intercambio alélico mencionado anteriormente usando digestión con la enzima de restricción Pacl seguido por ligamiento, para producir un plásmido deficiente en leuD.

Inactivación por intercambio alélico del gen leuD: La inactivación del gen leuD se lleva a cabo tal como se describió excepto porque se aportan 50 µg/ml de leucina en el medio de cultivo para la cepa con el gen leuD desactivado. Se facilita un diagrama de flujo de las etapas principales del procedimiento en la figura 4.

Validación de LeuD desactivado:

Prueba fenotípica: Se somete a prueba la cepa obtenida para determinar su dependencia del aporte complementario de leucina para el crecimiento. Específicamente, se cultiva la bacteria en el medio 7H9 con el 10% de OADC y el 0,05% (v/v) de aporte complementario de tiloxapol en presencia o ausencia de 50 µg/ml de leucina, y se monitoriza el crecimiento de las bacterias midiendo el valor de DO₆₀₀.

Análisis de la secuencia regional del genoma: Se prepara el ADN genómico de la cepa construida tal como se describió anteriormente. Se usan pares de cebadores complementarios a los flancos tanto izquierdo como derecho de 1 kb del gen seleccionado como diana para la amplificación por PCR para obtener un fragmento de aproximadamente 2 kb del cromosoma. Este producto de PCR se secuencia para confirmar la ausencia del gen leuD en la región.

EJEMPLO 3.**Sobreexpresión de antígenos de *M. tb* en cepas de rBCG**

Manipulaciones del ADN: Los antígenos de *M. tb* TB10.4 (Rv0288), Ag85B (Rv1886c) y Ag85A (Rv3804c) se

expresan de manera policistronica en el orden descrito usando promotores de Ag85B más Rv3130 (Florczyk *et al.*, citado anteriormente, 2003). Se colocan las secuencias de ADN que codifican para un péptido con la secuencia KDEL en el extremo de cada antígeno como señal de retención en el retículo endoplasmático para mejorar la presentación de antígenos para cada antígeno. Además, se colocan una estructura de bucle en 5' y secuencias de terminador transcripcional en 3' para garantizar la estabilidad del ARNm policistronico transcrito. Finalmente, se usan secuencias de la enzima de restricción Pacl para flanquear ambos extremos para facilitar la clonación del casete de expresión en el vector de expresión. Todos el ADN en el casete de expresión se produce por síntesis génica (Picoscript Inc, TX). Se clona el casete de expresión en el vector de expresión utilizando los sitios Pacl. Tras la amplificación en *E. coli*, se digiere el plásmido con Ndel para eliminar el gen de resistencia a kanamicina y oriE, seguido por ligamiento para crear un sistema de lanzadera unidireccional, que entonces se introduce en un mutante auxótrofo para leuD de *Mycobacterium* usando procedimientos de electroporación convencionales (Parish *et al.*, Microbiology, 145: 3497-3503; 1999). La figura 3 representa esquemáticamente un vector de expresión sin antibióticos a modo de ejemplo.

Expresión de antígenos de *M. tb* usando un sistema de selección sin antibióticos: La autotrofia para leucina de BCG Danish 1331, que se usa como huésped para el sistema de selección sin antibióticos, se cultiva en medio 7H9 complementado con el 10% de OAD (ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa), el 0,05% (v/v) de tiloxapol y 50 µg/ml de leucina. Tras la electroporación, se aíslan las cepas recombinantes que albergan el plásmido de expresión de antígenos mediante siembra en placas 7H10 (BD Difco) sin leucina. La supervivencia de la bacteria depende de la expresión de antígenos del gen leuD mediante el plásmido, que funciona a su vez como mecanismo para mantener el plásmido en las células. Se aíslan las colonias individuales resultantes y se cultivan en medio 7H9 como anteriormente, excepto sin complementación de leucina.

Validación de la expresión: Se detecta la expresión de cada antígeno mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Específicamente, se recoge el sobrenadante del cultivo y se procesa como se describió anteriormente (Harth *et al.*, Infect Immun 65(6):2321-2328; 1997). Entonces se separan los antígenos expresados sobre un gel de SDS-PAGE y se inmunotransfieren con anticuerpos frente al antígeno 85A, 85B y 10.4. Se evalúa el nivel de expresión de cada antígeno midiendo cuantitativamente la intensidad de cada banda específica en comparación con la producida mediante bacterias huésped negativas para el plásmido de expresión.

EJEMPLO 4. Expresión de los antígenos seleccionados en micobacterias sin selección con antibióticos

Materiales y métodos:

Preparación de plásmidos y micobacterias para la electroporación: Se aisló el ADN de plásmido recombinante y se digirió con la endonucleasa de restricción *Ndel* (New England Biolabs) para liberar el marcador de selección con antibióticos (por ejemplo resistencia a kanamicina) y la región del origen de replicación de *E. coli* (OriE). Entonces, se circularizó el fragmento de ADN de plásmido digerido usando ADN ligasa de T4 (New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante, que contiene el origen de replicación de *Mycobacterium* y los antígenos seleccionados, pero no el gen de resistencia a antibióticos y no puede replicarse en bacterias Gram-negativas, se introdujo en el *Mycobacterium* seleccionado. Para preparar el *Mycobacterium* para la electroporación, se cultivaron bacterias BCG Danish 1331 a 37°C en medio Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) con aporte complementario del 10% de OADC a la fase de crecimiento exponencial. Se usó tiloxapol (0,05% v/v, Research Diagnostics n.º de catálogo 70400) para dispersar las bacterias. Entonces se lavaron las células en glicerol al 10% más 0,05% de tiloxapol tres veces para eliminar el medio de cultivo antes de la electroporación. Para cada electroporación, se usaron 1,6 µg de plásmido por cada $1,25 \times 10^8$ células bacterianas. Se llevó a cabo la electroporación a 2,2 kV, 25 µF de capacitancia y 1,0 kΩ de resistencia. Tras la electroporación, se sembraron en placa inmediatamente las células sobre placas de agar Middlebrook 7H10 (BD Biosciences) en diluciones en serie de 10 veces y se incubaron a 37°C.

Selección por PCR de la colonia bacteriana que alberga el plásmido de expresión:

Se seleccionaron en primer lugar las cepas recombinantes mediante PCR usando el cebador directo GTTAAGCGACTCGGCTATCG (SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso ATGCCACCACAAGCACTACA (SEQ ID NO: 2) para amplificar la secuencia de ADN de la región oriM en un plásmido de expresión. Los parámetros de PCR fueron los siguientes: Etapa 1: 95°C 4 minutos, un ciclo; Etapa 2: 95°C 1 min., 60°C 1 min., y luego 72°C 1 min. para un total de 30 ciclos; Etapa 3: 72°C 10 minutos para un ciclo. Etapa 4: almacenamiento a 4°C. Se analizaron los productos de PCR resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia del plásmido en las células.

Resultados

Se realizó una PCR que se diseñó para amplificar la región de replicación del plásmido (OriM) se realizó para seleccionar las colonias resultantes que albergaban el plásmido de sobreexpresión. Puesto que esta región no está presente en el cromosoma bacteriano, la presencia de esta región en las células es una fuerte indicación de que el

plásmido se ha introducido en las células. Entre las colonias de rBCG seleccionadas, algunas colonias produjeron el producto de PCR, que es similar en tamaño al de una reacción control positivo del plásmido, tal como se analizó mediante electroforesis en gel. En cambio, las bacterias BCG progenitoras no produjeron ningún producto de PCR, tal como se muestra en la figura 5. Este experimento proporciona pruebas a primera vista de que el plásmido se ha introducido satisfactoriamente en *Mycobacterium* y que se ha aislado un clon bacteriano que alberga el plásmido sin el uso de selección con antibióticos.

Discusión

Los plásmidos convencionales para su uso en cepas de *Mycobacterium* recombinantes contienen una región de replicación y un marcador de selección (normalmente un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a kanamicina o un gen que complementa un defecto metabólico, por ejemplo *leuD* o *asd* (Galan *et al.*, Gene, 94:29; 1990) como elementos de plásmido esenciales que tienen utilidad en experimentos de ADN recombinante. Normalmente, se usan antibióticos para seleccionar clones que albergan plásmidos recombinantes. Sin embargo, esto representa un riesgo de propagación involuntaria de genes de resistencia a antibióticos en casos en los que el organismo modificado genéticamente resistente a antibióticos esta destinado a su uso fuera de la contención del laboratorio.

En el estudio anterior, se introdujo un plásmido recombinante que puede expresar antígenos, que no contiene ni la región oriE ni un marcador de selección con antibióticos en las bacterias y se aislaron satisfactoriamente clones que albergan el plásmido sin usar selección. Aunque el experimento actual empleaba oriM como región de replicación del plásmido, se prevé que otras regiones de replicación del plásmido sirvan como sustitutos, tales como la región de replicación de pMF1 (Bachrach *et al.*, Microbiol., 146:297; 2000). La única ventaja de este sistema es que el plásmido recombinante ya no posee un gen de resistencia a antibióticos. Por tanto, no puede propagarse inadvertidamente resistencia a antibióticos al medio ambiente, tal como sería en el caso con plásmidos de expresión comúnmente usados. Además, el plásmido de expresión de vector lanzadera unidireccional de la presente invención ya no puede replicarse en un intervalo de huésped amplio, puesto que se delecionan los elementos genéticos que permiten tal replicación. Esta restricción añade un segundo nivel de contención al plásmido recombinante, reduciendo de ese modo sustancialmente los riesgos asociados con la liberación de un organismo modificado genéticamente (OMG) al medio ambiente

Aunque los resultados actuales muestran que es posible introducir plásmidos recombinantes en cepas de *Mycobacterium* atenuadas sin selección, otros factores pueden desempeñar un papel en la estabilidad del plásmido libre de marcador de selección en el *Mycobacterium*. Por tanto, la región de replicación contiene genes que facilitan la replicación del plásmido y median la segregación del plásmido en células hermanas, contribuyendo de ese modo a la capacidad para identificar clones que albergan el plásmido sin selección.

Un posible factor que permite el aislamiento de clones que albergan el plásmido sin selección es la razón de plásmido con respecto a célula superior usada en el enfoque actual. El uso de una razón de plásmido con respecto a célula superior aumenta la probabilidad de que una célula capte un plásmido, disminuye el número de células sin plásmido. En este estudio, la razón de plásmido con respecto a célula era aproximadamente 10 veces superior a la utilizada normalmente en enfoques convencionales que emplean un sistema de selección. En teoría, razones de plásmido con respecto a célula incluso superiores deben dar como resultado incluso más clones que albergan el plásmido, hasta que se alcanza un punto de saturación de plásmido, que puede inhibir la captación del ADN de plásmido por las células electroporadas. En realizaciones preferidas de la invención, la razón del plásmido con respecto a bacterias está en el intervalo de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 10 µg de ADN de plásmido con respecto a aproximadamente $1,25 \times 10^8$ células bacterianas, y preferiblemente está en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg de ADN de plásmido con respecto a aproximadamente $1,25 \times 10^8$ células bacterianas.

Además, los antígenos de TB que se sobreexpresan por el plásmido pAF105 pueden desempeñar un papel importante en la estabilización del plásmido. Este plásmido sobreexpresa dos proteínas del complejo de antígeno 85 (Ag85A (Rv3804c) y Ag85B (Rv1886c)), ambas de las cuales tienen una actividad micoliltransferasa, que se requiere para la biosíntesis de dimicolato de trehalosa, una estructura dominante necesaria para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Es posible, por tanto, que la sobreexpresión de al menos uno de estos antígenos contribuya a la estabilidad del plásmido libre de selección confiriendo una ventaja de crecimiento en las células que albergan el plásmido, permitiendo por tanto la identificación de los clones que albergan el plásmido sin selección.

REIVINDICACIONES

1. Micobacteria transformada o progenie de la misma que incorpora una secuencia de nucleótidos foránea, que se replica y se expresa en la misma, en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea no está unida a un marcador seleccionable y en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea se encuentra en un plásmido, dicho plásmido codifica para un gen requerido para la supervivencia, y dicho gen requerido para la supervivencia se deleciona del genoma bacteriano de dicha bacteria transformada.
2. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea codifica para el antígeno 85a, el antígeno 85b o el antígeno 85a/85b.
3. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicho plásmido alberga un gen que codifica para proteínas que mantienen y/o estabilizan el plásmido.
4. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 3, en la que dicho gen que codifica para proteínas codifica para el antígeno 85a, el antígeno 85b o el antígeno 85a/85b.
5. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dichas secuencias de nucleótidos foráneas codifican para mediadores para la apoptosis expresando también antígenos tumorales específicos.
6. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicho plásmido alberga un gen que codifica para secuencias de nucleótidos foráneas que codifican para mediadores para la apoptosis expresando también antígenos tumorales específicos para la apoptosis.
7. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea no puede replicarse en bacterias Gram negativas.
8. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicha bacteria transformada es auxótrofa.
9. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea es al menos una parte de un vector lanzadera unidireccional.
10. Método de producción de una micobacteria transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la etapa de incorporar una secuencia de nucleótidos foránea que se replica y se expresa en dicha bacteria, en el que dicha secuencia de nucleótidos foránea no está unida a un marcador seleccionable.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha etapa de incorporación se realiza mediante electroporación.
12. Método según la reivindicación 10, en el que dicha secuencia de nucleótidos foránea está en un plásmido y dicha electroporación se realiza en las siguientes condiciones:
 una razón de ADN de plásmido con respecto a células bacterianas que oscila entre 1 µg y 5 µg de ADN de plásmido con respecto a $1,25 \times 10^8$ células bacterianas.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha razón es de aproximadamente 1,6 µg de plásmido con respecto a aproximadamente $1,25 \times 10^8$ células bacterianas.
14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha secuencia de nucleótidos foránea no puede replicarse en bacterias Gram negativas.
15. Método según la reivindicación 10, en el que dicha secuencia de nucleótidos foránea es al menos una parte de un vector lanzadera unidireccional.
16. Micobacteria transformada o progenie de la misma que comprende una secuencia de nucleótidos foránea que codifica para un gen de interés, en la que existen una o más de las siguientes condiciones:
 - a) dicha micobacteria transformada incluye un plásmido que no puede replicarse en bacterias Gram negativas o
 - b) dicha micobacteria transformada no muestra resistencia a antibióticos o
 - c) dicha micobacteria transformada es auxótrofa o

d) dicha micobacteria transformada alberga un vector lanzadera unidireccional, y en la que dicha secuencia de nucleótidos foránea es parte de un plásmido y dicha secuencia de nucleótidos foránea codifica para un gen requerido para la supervivencia, y en la que dicho gen requerido para la supervivencia se deleciona del genoma bacteriano de dicha micobacteria transformada.

5 17. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 16, en la que dicho plásmido carece de un marcador seleccionable.

10 18. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 16, en la que dicho gen requerido para la supervivencia es *leuD*.

19. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 16, que comprende además secuencias promotoras que se activan *in vivo*.

15 20. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 16, estando dicha micobacteria transformada atenuada.

20 21. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 20, siendo dicha micobacteria transformada BCG.

22. Micobacteria transformada o progenie de la misma según la reivindicación 21, en la que dicho BCG se selecciona de las siguientes cepas BCG1331, BCG Pasteur, BCG Tokio y BCG Copenhague.

25 23. Vacuna que comprende una micobacteria transformada o progenie según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

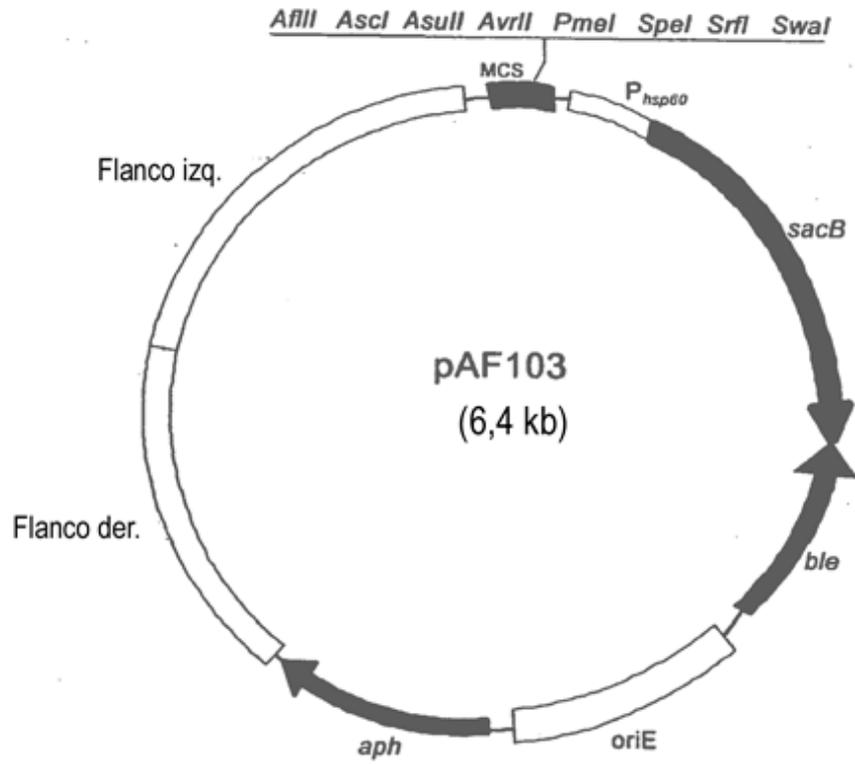


Figura 1

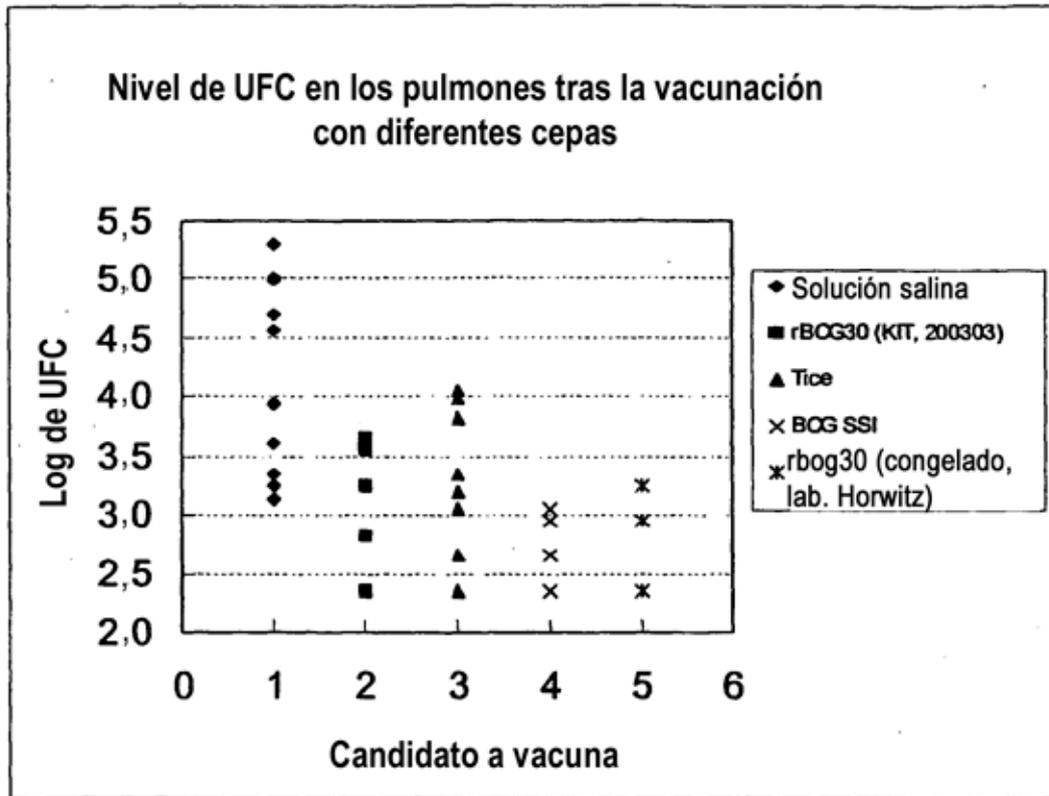


Figura 2

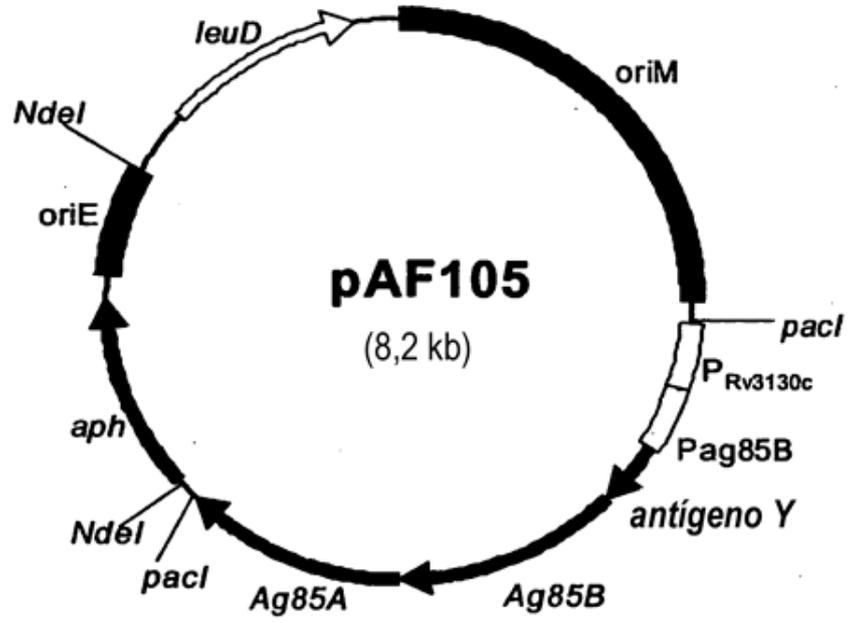


Figura 3

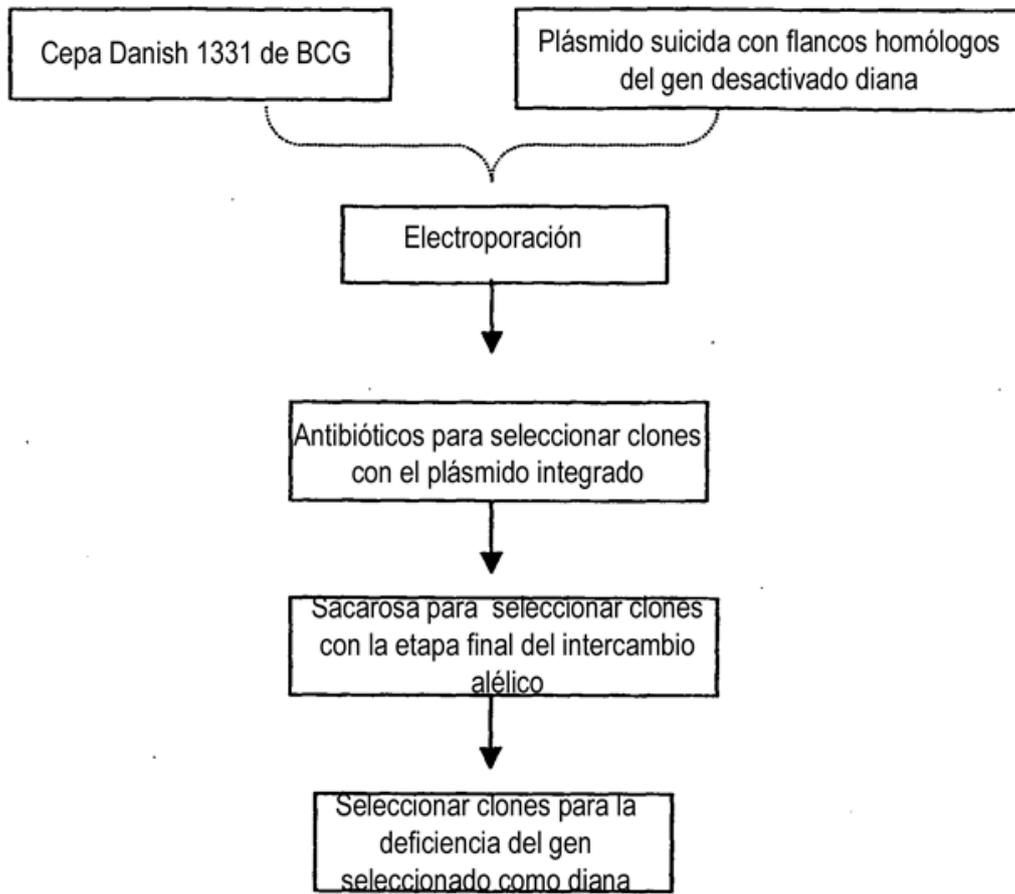


Figura 4

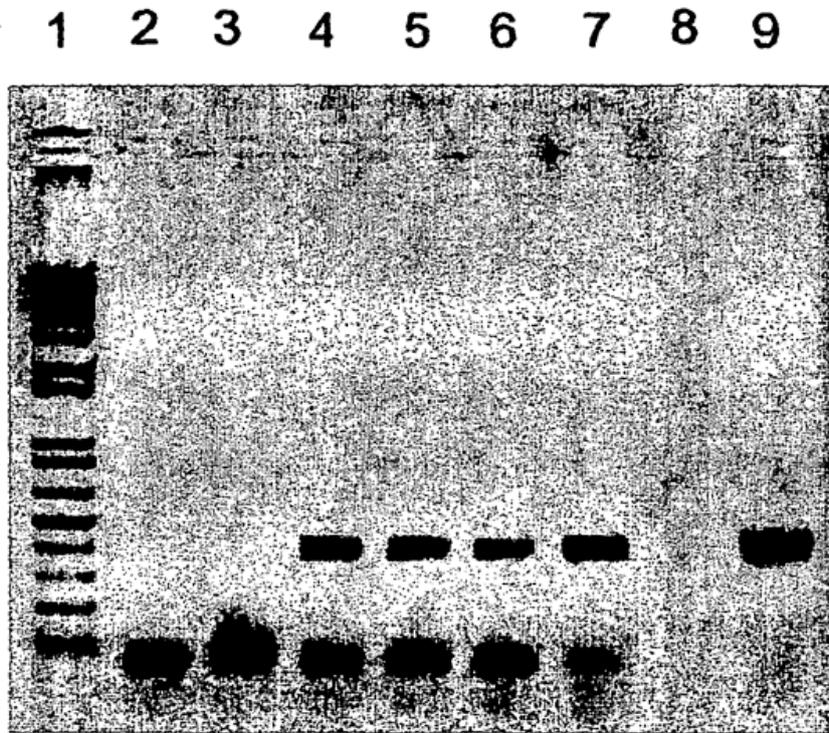


Figura 5