

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 597**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02795382 .7**  
96 Fecha de presentación: **18.11.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1446422**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **ANTÍGENO MICOBACTERIANO RECOMBINANTE DE TIPO HEMAGLUTININA DE UNIÓN A LA HEPARINA (HBHA) METILADA.**

30 Prioridad:  
**19.11.2001 FR 0114953**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.01.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT PASTEUR DE LILLE  
1 RUE DU PROFESSEUR CALMETTE  
59019 LILLE CEDEX, FR y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:  
**PETHE, Kévin;  
MENOZZI, Franco y  
LOCHT, Camille**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

**ES 2 371 597 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

Antígeno micobacteriano recombinante de tipo hemaglutinina de unión a la heparina (HBHA) metilada.

5 La presente invención se inscribe en el ámbito de la búsqueda y de la puesta a punto de nuevas vacunas para el tratamiento de las infecciones micobacterianas, en particular la tuberculosis.

La invención se refiere a una secuencia peptídica recombinante inmunógena metilada, que corresponde a la hemaglutinina de unión a la heparina (HBHA) identificada en unas cepas micobacterianas tales como  
10 *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Menozzi *et al.* 1996. J. Exp. Med. 184: 993-1001).

La invención se refiere asimismo a unos procedimientos de preparación de una secuencia peptídica inmunógena que comprende la HBHA recombinante, siendo dicha secuencia metilada por modificación post-traduccional. La invención se refiere en particular a unos procedimientos de metilación química o enzimática de una secuencia  
15 peptídica que comprende la HBHA y previamente producida en una forma recombinante no metilada.

La invención se refiere además a unas herramientas, vectores y hospedantes celulares recombinantes, para la realización de los procedimientos químicos o enzimáticos de metilación post-traduccional de la HBHA recombinante.

20 La invención se refiere finalmente a unas composiciones inmunógenas que comprenden la HBHA metilada, nativa o recombinante, siendo dichas composiciones útiles para la preparación de vacunas contra las infecciones micobacterianas.

Las micobacterias son unos bacilos cuyo hábitat está muy diversificado. Según las especies, estas bacterias pueden colonizar el suelo, el agua, las plantas, los animales y/o el ser humano. Algunas especies, tales como *M. smegmatis*,  
25 son unos saprófitos no patógenos. Otras especies, sin embargo, son unos patógenos más o menos severos de los animales y/o del ser humano. Así, *M. avium* provoca unas infecciones en las aves. *M. bovis* es responsable de la tuberculosis bovina, aunque también ha estado implicado en casos de tuberculosis humana. En el ser humano, la tuberculosis está principalmente causada por la especie altamente patógena *M. tuberculosis*. En cuanto a la *M.*  
30 *leprae*, es responsable de la lepra, otra patología del ser humano que hace estragos principalmente en los países en vías de desarrollo.

La tuberculosis sigue siendo hoy en día un problema de salud pública preocupante, en la medida en la que representa la primera causa de mortalidad relacionada con un agente infeccioso único. La Organización Mundial de la Salud (OMS) censó 8,8 millones de casos de tuberculosis en 1995 (Dolin *et al.* 1994. Bull. WHO 72: 213-220).  
35 Más recientemente, la OMS ha publicado unas cifras alarmantes, con 10 millones de nuevos casos de tuberculosis por año y una mortalidad que alcanza 3 millones de personas por año (Dye *et al.* 1999. J. Am. Med. Assoc. 282: 677-686). Se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*. Sin embargo, no todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad.

40 El problema planteado por la tuberculosis se agravó en los años 80, con la emergencia y el desarrollo de la pandemia debida al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Así, el número de casos de tuberculosis asociada a la inmunodepresión provocada por el retrovirus VIH, responsable del SIDA, no dejó de aumentar.

45 Para ser eficaz, el tratamiento médico de la tuberculosis exige generalmente ser prolongado, sobre todo en los pacientes también infectados por el virus VIH. En el pasado, las infecciones con *M. tuberculosis* eran frenadas eficazmente por ciertos antibióticos, entre los cuales están la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida. Sin embargo, las antibioterapias han mostrado rápidamente sus limitaciones en el tratamiento curativo de la tuberculosis debido, por un lado, a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los antibióticos, en particular a la  
50 isoniazida y, por otra parte, a la toxicidad de ciertas moléculas anti-tuberculosas, como la pirazinamida.

Una sola vacuna está autorizada y se utiliza habitualmente desde hace más de 75 años para prevenir la infección tuberculosa. Se trata del bacilo de Calmette y Guérin, denominado BCG. Esta vacuna consiste en una forma viva de una cepa de *M. bovis*, aislada en 1908 en una vaca, y hecha avirulenta *in vitro* con el fin de permitir su  
55 administración por vía parenteral en el ser humano. Sin embargo, esta vacuna está actualmente sujeta a controversia porque presenta limitaciones, en particular, en términos de eficacia. En efecto, según numerosos ensayos clínicos efectuados por todo el mundo, la eficacia de protección obtenida gracias a la vacuna BCG varía de 0 a 85% (Fine, P.E. 1989. Rev. Infect. Dis. 11 Supl. 2: S353-S359). Un meta-análisis sugiere que la eficacia media del BCG no superaría el 50% de protección frente a la tuberculosis pulmonar (Colditz *et al.* 1994. Jama 271: 698-702). Además, la vacuna BCG es relativamente eficaz en el niño, mientras que su efecto protector es casi nulo en el  
60 adulto. Además, en la medida en que la vacuna BCG consiste en una cepa micobacteriana viva, su administración no está libre de efectos secundarios en el organismo humano, a pesar de que se trate de una cepa atenuada. Como dichos efectos secundarios se manifiestan con más razón en las personas inmunodeprimidas, por lo tanto se debe descartar la vacunación de estos pacientes con el BCG. Este problema no se puede salvar matando y desactivando  
65 los BCG puesto que en tal caso, éstos pierden cualquier actividad protectora (Orme, I.M. 1988. Infect. Immun. 56: 3310-3312).

La presente invención tiene por lo tanto como objetivo evitar los inconvenientes de la vacuna BCG, proponiendo una nueva composición inmunógena susceptible de ser utilizada como vacuna contra la tuberculosis. Esta composición inmunógena puede asimismo ser utilizada de manera más general en el ámbito de la prevención de las infecciones micobacterianas.

La tuberculosis es una enfermedad de contacto, que se transmite por vía aérea. Una vez inhalados, los gérmenes de *M. tuberculosis* llegan hasta los pulmones, que constituyen el foco infeccioso inicial. A partir de los pulmones, los gérmenes son rápidamente diseminados por vía sanguínea o linfática hacia otras regiones del organismo.

La secuencia entera del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* mejor caracterizada hasta la fecha, a saber H37Rv, ha sido determinada y analizada con el fin de profundizar los conocimientos relativos a la biología de este patógeno, e identificar nuevas dianas que permitan implementar nuevos tratamientos terapéuticos, es decir, profilácticos o curativos (Cole *et al.* 1998. Nature 393: 537-544). Así, el enfoque actual consiste en crear unos bancos genómicos a partir del ADN de *M. tuberculosis* y en detectar sistemáticamente dichos bancos para identificar nuevas dianas terapéuticas potenciales. Curiosamente, se ha observado que las cepas de *M. tuberculosis* presentan entre sí una gran homogeneidad genética, siendo los cambios de nucleótidos de una secuencia genómica a otra muy raros. Asimismo, la mayor parte de las proteínas son idénticas a través de todas las cepas de esta especie. Esto resulta particularmente importante a nivel de la inmunidad y del desarrollo de vacunas, en la medida en la que los marcadores antigénicos a determinar son casi ubiquitarios.

A pesar de la importante incidencia de las infecciones micobacterianas, se conocen todavía pocas cosas de los mecanismos moleculares primarios implicados en su patogénesis.

Uno de los mayores acontecimientos de la patogénesis de la tuberculosis es la adherencia de los microorganismos a las células dianas. Los macrófagos alveolares han sido durante mucho tiempo considerados como la puerta de entrada de *M. tuberculosis*, y se supone que transportan las bacterias de los pulmones hacia otros organismos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la *M. tuberculosis* era asimismo capaz de interactuar con las células epiteliales, entre las cuales están las células M, lo que podría permitir a los bacilos atravesar directamente la barrera epitelial (Teitelbaum *et al.* 1999. Immunity 10: 641-650). La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos, así como los factores bacterianos implicados en la diseminación extra-pulmonar de *M. tuberculosis* siguen siendo hoy en día desconocidos.

Las cepas de *M. tuberculosis* producen en su superficie una adhesina denominada HBHA por "heparin-binding hemagglutinin adhesin" (Menozzi *et al.* 1996. J. Exp. Med. 184: 993-1001). Esta proteína está asimismo producida por otras micobacterias patógenas, tales como *M. leprae* y *M. avium* (Reddy *et al.* 2000. J. Infect. Dis. 181: 1189-1193). En cambio, la HBHA no está producida por la especie saprófita no patógena *M. smegmatis* (Pethe *et al.* 2001. Mol. Microbiol. 39: 89-99).

La unión de *M. tuberculosis* a las células epiteliales se inhibe mediante unos anticuerpos anti-HBHA o mediante competición con la heparina. No siendo el caso de los macrófagos, esta observación sugiere que la adherencia conferida por la HBHA es específica de las células no fagocitarias. El mecanismo de esta adherencia se basa en el reconocimiento por el campo carboxi-terminal rico en residuos lisinas de la HBHA (Pethe *et al.* 2000. J. Biol. Chem. 275: 14273-14280), de receptores que contienen unos glicosaminoglicanos sulfatados llevados por las células epiteliales.

Más recientemente, unos trabajos han demostrado que la HBHA no ha desempeñado ningún papel preponderante en las etapas iniciales de la infección tuberculosa, ni tampoco en la persistencia de las micobacterias a nivel de los pulmones (Pethe *et al.* 2001. Nature 412: 190-194). Estos investigadores también han demostrado que la HBHA no era necesaria para la colonización y la supervivencia en el bazo. Sin embargo, la HBHA desempeña un papel crucial en la diseminación extra-pulmonar de las micobacterias. Esta adhesina es en consecuencia un factor de virulencia cuya unión a las células no fagocitarias representa una etapa esencial del proceso de diseminación de las micobacterias de los pulmones hacia el bazo o potencialmente a otros órganos tales como el hígado, los huesos, los riñones o, eventualmente, el cerebro.

La presente invención tiene como objetivo utilizar, en el ámbito de un tratamiento esencialmente profiláctico, el poder antigénico de la HBHA, cuyo papel es primordial en la diseminación de los microorganismos en los sujetos infectados.

La clonación del gen que codifica la HBHA y su expresión en *Escherichia coli* han sugerido que la proteína sufre una modificación post-traducciona (Menozzi *et al.* 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12625-12630). En esta publicación, los autores habían emitido la hipótesis de que la HBHA nativa podría ser glicosilada, hipótesis que resultó más tarde inexacta. Los trabajos más recientes muestran en efecto que la única modificación post-traducciona covalente que sufre la HBHA producida por *M. tuberculosis* es una metilación compleja de los residuos lisinas contenidos en el campo carboxi-terminal de la proteína.

En el marco de la presente invención, los inventores revelan la naturaleza de la modificación post-traduccional que contiene la HBHA nativa, a saber una metilación covalente compleja, confiriendo dicha modificación un poder antigénico protector contra unas infecciones por micobacterias. La secuencia peptídica de la HBHA recombinante, producida después de la expresión de su gen en *E. coli* por ejemplo, no presenta ninguna actividad protectora, y esto, mientras no sufra ninguna modificación post-traduccional al igual que la HBHA nativa.

La invención se refiere por lo tanto a una secuencia peptídica recombinante inmunógena que comprende un antígeno metilado que corresponde a la HBHA nativa o a la parte C-terminal de ésta.

En el sentido de la presente invención, la expresión "secuencia peptídica" designa la totalidad o parte de la secuencia de la proteína HBHA, a partir del momento en el que dicha "secuencia peptídica" contiene por lo menos el campo carboxi-terminal rico en residuos lisinas que asegura la unión a la heparina. La secuencia de dicho campo carboxi-terminal es la siguiente:

KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK

Esta secuencia ha sido dada a conocer en la solicitud internacional publicada con el número WO 97/44463.

Se entiende por "proteína", "proteína HBHA" o "HBHA" en el sentido de la presente invención, la totalidad o parte de la secuencia peptídica de la HBHA, con la condición sin embargo de incluir por lo menos el campo C-terminal de dicha HBHA. Cuando la secuencia considerada comprende como mucho el campo C-terminal de la HBHA, se habla ventajosamente de "péptido". Se designan, en particular, por "péptidos" los productos procedentes de una digestión enzimática de la HBHA. Sin embargo, el uso del término "péptido" no se limita a este caso, pudiendo ser asimismo "péptido" sinónimo de "proteína" en el ámbito de la invención.

Una secuencia peptídica "recombinante" según la invención corresponde a una secuencia peptídica obtenida por expresión, en un hospedante celular heterólogo, de una secuencia nucleotídica que codifica dicha secuencia peptídica. En particular, dicho hospedante celular heterólogo puede ser una bacteria que no pertenece al género *Mycobacterium*, por ejemplo *E. coli*, u otros organismos tales como las levaduras y las células animales y vegetales.

La expresión "secuencia nucleotídica" designa cualquier secuencia de ADN que codifica una secuencia peptídica tal como se define en el marco de la presente invención.

De acuerdo con la aceptación habitual, un "antígeno" designa cualquier secuencia peptídica según la presente invención que tiene un poder inmunógeno. En particular, un antígeno conforme a la invención podrá ser restringido al campo de unión a la heparina carboxi-terminal de la HBHA.

En el contexto de la invención, las expresiones "campo de unión a la heparina carboxi-terminal", "campo de unión a la heparina", "campo carboxi-terminal" y "campo C-terminal" de la HBHA designan la misma región de dicha HBHA, región cuya secuencia se ha proporcionado anteriormente. Estas expresiones son por lo tanto equivalentes.

De manera preferida, la secuencia peptídica recombinante inmunógena según la presente invención está metilada al nivel del campo de unión a la heparina de la HBHA. En particular, los grupos metilos son llevados por unos residuos lisinas presentes en dicho campo de unión a la heparina.

En un modo de realización todavía más preferido de la presente invención, los grupos metilos son llevados por la totalidad o sólo parte de los residuos lisinas presentes en el campo C-terminal de la HBHA, con la condición de que la secuencia peptídica así metilada presente una actividad inmunógena.

Ventajosamente, por lo menos trece residuos lisinas de los quince presentes en el campo C-terminal son metilados. Los dos residuos no metilados son en particular los aminoácidos distales de la secuencia indicada *supra* del campo C-terminal de la HBHA.

Los residuos lisinas metilados son preferentemente mono- o dimetilados.

En el artículo de Menozzi *et al.*, 1998, *supra*, se ha demostrado asimismo que la HBHA nativa era reconocida por dos anticuerpos monoclonales, a saber 3921 E4 y 4057D2 (Rouse *et al.* 1991. Infect. Immun. 59: 2595-2600), mientras que la forma recombinante de la HBHA no modificada de manera post-traduccional no era reconocida por el anticuerpo 4057D2, lo que indica que uno de los epítomos de la HBHA nativa estaba ausente en la HBHA recombinante.

La secuencia peptídica recombinante inmunógena según la presente invención, a saber la forma recombinante de la HBHA metilada de manera post-traduccional, es reconocida por el anticuerpo monoclonal 4057D2, y esto, contrariamente a la forma recombinante no metilada de dicha HBHA, tal como se describe en los ejemplos siguientes.

La invención se refiere asimismo a unos procedimientos de preparación de una secuencia peptídica inmunógena que comprende la HBHA recombinante, siendo dicha secuencia metilada mediante modificación post-traducciona.

5 En particular, un procedimiento de preparación según la presente invención comprende por lo menos las etapas siguientes:

- a) la producción de la proteína HBHA recombinante en un hospedante celular heterólogo – siendo esta forma de la HBHA no metilada-
- 10 b) la purificación de dicha proteína mediante unos métodos convencionales; y
- c) la metilación post-traducciona de la HBHA recombinante purificada.

15 Se entiende que, en el marco de la invención, la etapa de purificación de la proteína HBHA se puede realizar antes o, según otro modo de realización, después de la etapa de metilación de dicha proteína.

20 El procedimiento de preparación según la invención permite obtener la proteína HBHA recombinante metilada o, alternativamente, cualquier péptido metilado que comprende por lo menos el campo de unión a la heparina de dicha proteína. En particular, dicho péptido metilado obtenido mediante el procedimiento según la invención corresponde a dicho campo de unión a la heparina de la HBHA.

25 Ventajosamente, el hospedante celular heterólogo utilizado en el marco del procedimiento de preparación según la invención es una bacteria, en particular *E. coli* o *M. smegmatis*. En particular, el hospedante utilizado es *M. smegmatis*.

30 Los métodos de purificación de proteína son conocidos por el experto en la materia y no son, como tales, objeto de la presente invención. Por ejemplo, las propiedades de unión a la heparina conferidas por el campo C-terminal de la HBHA pueden ser aprovechadas practicando una purificación de dicha HBHA por afinidad sobre columna heparina-sefarosa (Pethe *et al.*, 2000, *supra*).

La invención se refiere en particular a unos procedimientos de metilación química y enzimática de una secuencia peptídica que comprende la HBHA previamente producida en forma recombinante no metilada.

35 Por “producción en forma recombinante” se entiende la producción del péptido mediante expresión en un hospedante heterólogo procarionta o eucariota sea cual sea. La producción se puede obtener a partir de un cultivo celular o *in vivo* como, por ejemplo, en la leche o en una planta.

40 La metilación química según la invención se inspira en la bibliografía (Means, G.E. 1977. Meth. Enzymol. 47: 469-478). En particular, la reacción de metilación química se efectúa en una disolución que comprende formaldehído y NaBH<sub>4</sub>.

45 Los procedimientos de metilación enzimática según la invención se pueden llevar a cabo con la ayuda de una o varias metiltransferasas micobacterianas. Dichas metiltransferasas catalizan la transferencia de grupos metilos de un donante hacia un receptor, en este caso la secuencia peptídica de la HBHA recombinante previamente purificada. El donante de radical metilo puede ser en particular la S-adenosilmetionina (AdoMet), bien conocida por el experto en la materia.

50 Más particularmente, la o las metiltransferasas están presentes y activas en los extractos de proteínas totales de micobacterias tales como *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*.

La o las metiltransferasas micobacterianas pueden ser purificadas a partir de extractos proteicos totales de cepas de micobacterias antes de ser dispuestas en el medio de reacción con el fin de catalizar la o las reacciones de transmetilación del donante hacia el receptor.

55 Unos vectores y hospedantes celulares recombinantes pueden ser utilizados para la realización de los procedimientos enzimáticos de metilación post-traducciona de la HBHA recombinante.

60 En particular, un hospedante celular recombinante es capaz de coexpresar las secuencias nucleotídicas que codifican la HBHA y la o las metiltransferasas micobacterianas. Dicho hospedante celular es preferentemente una bacteria, y en particular una cepa de *E. coli*.

El término “coexpresar” define, en el contexto de la invención, la facultad, para un hospedante celular dado, de expresar por lo menos dos secuencias nucleotídicas distintas.

65 El hospedante celular se caracteriza porque puede albergar simultáneamente por lo menos dos vectores recombinantes, vectores entre los cuales uno codifica la HBHA mientras que el o los otros codifican la o las

metiltransferasas micobacterianas.

En particular, el hospedante celular puede albergar tantos vectores recombinantes como proteínas diferentes a producir, codificando entonces cada vector una proteína micobacteriana recombinante distinta.

5 Los términos "vector", "vector de expresión" y "plásmido" se utilizan en el contexto de la presente invención para designar indiferentemente la misma herramienta de clonación y de expresión de secuencias nucleotídicas, clásica para el experto en la materia.

10 Todas las proteínas micobacterianas recombinantes, o sólo parte de ellas, están codificadas por el mismo vector de expresión.

En particular, el hospedante celular puede albergar un solo vector de expresión a partir del cual se producen todas las proteínas micobacterianas, a saber la HBHA y la o las metiltransferasas.

15 Cuando el hospedante celular alberga un solo vector, la producción de cada proteína micobacteriana, HBHA o metiltransferasa, se controla mediante unas secuencias de regulación distintas o, según otro modo de realización, mediante las mismas secuencias de regulación.

20 En particular, la producción de la totalidad o parte de las proteínas recombinantes está controlada por las mismas secuencias de regulación.

Un vector de expresión puede codificar ventajosamente la HBHA y por lo menos una metiltransferasa micobacteriana.

25 Alternativamente, un vector de expresión codifica una sola proteína micobacteriana recombinante seleccionada de entre la HBHA y la o las metiltransferasas.

30 La presente invención se refiere a los hospedantes celulares y a los vectores de expresión, tales como los definidos *supra*, para la realización de los procedimientos de metilación enzimática según la invención.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de obtención de una secuencia peptídica inmunógena que comprende la HBHA recombinante, siendo dicha secuencia metilada mediante modificación post-traducciona, comprendiendo dicho procedimiento por lo menos las etapas siguientes:

- 35 a) co-producción de la proteína HBHA y de la o de las metiltransferasas micobacterianas mediante un hospedante celular tal como el definido anteriormente;
- 40 b) metilación post-traducciona de la HBHA recombinante por la o las metiltransferasas recombinantes; y
- c) purificación de la HBHA recombinante metilada mediante unos métodos convencionales.

45 La invención se refiere además a unas secuencias peptídicas recombinantes inmunógenas metiladas susceptibles de ser obtenidas *in vivo* mediante un procedimiento enzimático, o *in vitro* mediante un procedimiento químico o enzimático.

La invención se refiere por último a unas composiciones que comprenden la HBHA metilada, nativa o recombinante, siendo dichas composiciones útiles para la preparación de vacunas contra las infecciones micobacterianas.

50 En particular, una composición inmunógena según la presente invención comprende, en una formulación farmacéuticamente aceptable, un principio activo que es una secuencia peptídica metilada seleccionada de entre la secuencia peptídica de la HBHA nativa y la secuencia peptídica de la HBHA recombinante.

55 Una "formulación farmacéuticamente aceptable" corresponde, en el sentido de la invención, a una formulación medicamentosa susceptible de ser utilizada en el ser humano, a dosis aceptables *in vivo* frente a la toxicidad y la farmacología de los compuestos en cuestión, siendo al mismo tiempo eficaces en un plano terapéutico, y en particular desde el punto de vista inmunógeno.

60 En un modo de realización preferido de la invención, la secuencia peptídica metilada que sirve de principio activo está asociada a uno o varios adyuvantes.

65 Por "adyuvante" o "compuesto adyuvante", se entiende en el sentido de la presente invención, un compuesto apto para inducir o para aumentar la respuesta inmunitaria específica frente a un antígeno o un inmunógeno, consistiendo dicha respuesta indiferentemente en una respuesta humoral y/o celular. Esta respuesta inmunitaria pasa generalmente por una estimulación de la síntesis de inmunoglobulinas específicas de un antígeno dado, en particular unos IgG, IgA e IgM, o de citoquinas.

El principio activo, la secuencia peptídica metilada de la HBHA, así como el o los adyuvantes, son generalmente mezclados con unos excipientes farmacéuticamente compatibles, tales como el agua, un tampón salino, dextrosa, glicerol, etanol o mezclas de los mismos.

5 Dichas composiciones inmunógenas se preparan en forma de disoluciones líquidas o de suspensiones inyectables, o también en forma sólida, por ejemplo liofilizada, adaptada a la puesta en disolución previa a la inyección.

10 Una composición inmunógena según la presente invención se formula para permitir una administración por vías tan diversas como la vía nasal, oral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, vaginal, rectal, ocular u auricular. En particular, la elección de los compuestos auxiliares está dictada por el modo de administración seleccionado. Dichos compuestos auxiliares pueden ser en particular unos agentes humectantes, emulsionantes o tampones.

15 Ventajosamente, una composición inmunógena según la invención comprende, por dosis, de 0,1 a 20 µg, y preferentemente 5 µg, de proteína HBHA purificada.

La presente invención se ilustra, sin estar limitada por ello, mediante las figuras siguientes:

20 - Figura 1: determinación de la masa del péptido que corresponde al campo de unión a la heparina de las HBHA nativa y recombinante. Dichas HBHA han sido sometidas a una digestión por la endoproteinasa Glu-C (Endo-Glu; EC3.4.24.33) durante una noche. Los fragmentos que corresponden al campo de unión a la heparina han sido purificados mediante HPLC. Las masas de los fragmentos que proceden de la HBHA recombinante (A) y de la HBHA nativa (B) han sido después analizadas mediante espectrometría de masas.

25 - Figura 2: representación del campo de unión a la heparina de la HBHA producida por *M. bovis* BCG o *M. smegmatis* (HBHA recombinante metilada). Las lisinas modificadas en mono- o en dimetilsilinas han sido identificadas según la técnica de degradación de Edman.

30 - Figura 3: determinación de la masa del péptido que corresponde al campo de unión a la heparina de la HBHA recombinante no metilada y de la HBHA recombinante metilada por vía química. Las diferentes formas de HBHA han sido sometidas a una digestión por Endo-Glu durante una noche. Los fragmentos que corresponden al campo de unión a la heparina han sido purificados mediante HPLC. Las masas de los fragmentos que proceden de la HBHA recombinante no metilada (A), de la HBHA recombinante metilada químicamente durante 6 minutos (B), 31 minutos (C) y 120 minutos (D) han sido analizadas mediante espectrometría de masas.

35 - Figura 4: análisis en SDS-PAGE y en inmunotransferencia de la HBHA recombinante (1), de la HBHA recombinante metilada químicamente durante 6 minutos (2), 31 minutos (3) y 120 minutos (4), y de la HBHA nativa (5). Los análisis de inmunotransferencia han sido realizados con la ayuda de dos anticuerpos monoclonales 3921 E4 y 4057D2 (Rouse *et al.*, 1991, *supra*).

40 - Figura 5: medición de la respuesta inmunitaria celular inducida por la inyección de diferentes preparaciones. Las células esplénicas de cuatro ratones por grupo han sido cultivadas diez semanas después de la primera inmunización. Las células han sido no estimuladas (NS) o estimuladas (S) durante 72h con HBHA nativa (2 µg/ml). La concentración en IFN-γ ha sido determinada a continuación en los sobrenadantes de cultivo.

45 La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente, dada a título puramente ilustrativo. Se entiende que la presente invención no está limitada de ninguna manera a los ejemplos que figuran en dicha descripción detallada.

## 50 Descripción detallada de la invención

### I - Material y métodos

#### I-1- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

55 Se han cultivado las cepas de *M. bovis* BCG 1173P2 (OMS), *M. tuberculosis* MT103 y *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 en medio Sauton (Menozzi *et al.*, 1996, *supra*). La cepa *E. coli* BL21 (DE3)(pET-*hbhA*) (Pethe *et al.*, 2000, *supra*) ha sido cultivada en medio LB adicionado con 30 µg/ml de kanamicina.

#### I-2- Purificación de la HBHA

60 Las HBHA nativas y recombinantes han sido aisladas tal como se describe en (Menozzi *et al.*, 1996, *supra*; Pethe *et al.*, 2000, *supra*). La etapa final de purificación ha sido realizada mediante HPLC en fase inversa (Beckman Gold System) con la ayuda de una columna de tipo nucleosil-C18 equilibrada con 0,05% de ácido trifluoroacético. La elución se ha efectuado por medio de un gradiente lineal de 0 a 80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 65 0,05%.

I-3- Análisis de los péptidos o proteínas mediante espectrometría de masas

Las muestras (0,1 a 10 picomoles) han sido preparadas mediante el método de "gota seca".

5 Tratándose de péptidos, un volumen de disolución de 0,5 µl ha sido mezclado con el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico disuelto extemporáneamente, en una cantidad de 10 mg/ml en una disolución que contiene 50% de CH<sub>3</sub>CN y 0,1% de ácido trifluoroacético. Después del depósito sobre la placa de análisis, se han secado las muestras. Los análisis por espectrometría de masas han sido realizados por medio de un aparato de tipo MALDI-TOF Voyager-DE-STR (Applied BioSystems, Foster City, CA). Los depósitos que contienen unos péptidos de menos  
10 de 3.000 Da han sido analizados con la ayuda de los parámetros de ajuste siguientes: modos positivo y reflector, voltaje de aceleración de 20 kV, tensión de rejilla de 61%, temporización de extracción de 90 ns, y umbral de masa inferior de 500 Da. Para los péptidos cuya masa está comprendida entre 3000 y 10.000 Da, los parámetros de ajustes son: modos positivo y reflector, voltaje de aceleración de 25 kV, tensión de rejilla de 65%, temporización de extracción de 250 ns, y límite de masa inferior de 1.000 Da. Los espectros han sido calibrados de manera externa a  
15 partir de los iones monoisotópicos [M+H<sup>+</sup>] de diferentes péptidos.

Tratándose de proteínas, una muestra de 0,5 µl ha sido mezclada en ácido sinapínico disuelto extemporáneamente, en una cantidad de 10 mg/ml en una disolución que contiene 50% de CH<sub>3</sub>CN y 0,1% de ácido trifluoroacético. Después del depósito y del secado, los análisis por espectrometría de masas han sido realizados utilizando los  
20 parámetros de ajuste siguientes: modos positivo y lineal, voltaje de aceleración de 25 kV, tensión de rejilla de 92%, temporización de extracción de 750 ns, y umbral de masas inferior de 1000 Da. Los espectros han sido calibrados de manera externa a partir de las masas medias de los iones [M+H<sup>+</sup>] de la tiorredoxina de *E. coli* y de la apomioglobina equina (Applied BioSystems).

I-4- Digestión de las proteínas por Endo-Glu y separación de los péptidos

Se ha digerido 1 nanomol de HBHA liofilizada o de HBHA recombinante purificada mediante cromatografía sobre heparina-sefarosa seguida de una HPLC en fase inversa, durante una noche en presencia de 5% de Endo-Glu (Roche) en 100 mM de tampón fosfato (pH 8,0). Después de la digestión enzimática, los péptidos resultantes han  
30 sido separados mediante HPLC en fase inversa con la ayuda de una columna de tipo UltraSphere ODS de Beckman (2 x 200 mm) en un gradiente de elución lineal de 0 a 60% de acetonitrilo preparado en 0,1% de ácido trifluoroacético.

I-5- Análisis de los aminoácidos y determinación de las secuencias

Con el fin de efectuar un análisis de la composición en aminoácidos completa, la HBHA nativa purificada por HPLC ha sido hidrolizada bajo calentamiento a 110°C en una disolución de HCl 6N durante 14 a 16h. La composición en aminoácidos ha sido determinada con la ayuda de un analizador de tipo Gold System de Beckman. La secuencia peptídica amino-terminal ha sido determinada gracias al método automatizado de degradación de Edman por medio  
40 de un aparato de líquido pulsado (Procise 492, Applied BioSystems) equipado de un analizador de aminoácidos 120A. Para cada etapa de determinación de secuencia, las muestras comprendían 10 a 20 µl, lo que correspondía a una cantidad de péptido comprendida entre 250 y 500 picomoles.

I-6- Metilación química de los residuos lisina

El procedimiento de metilación química de los residuos lisinas de la HBHA recombinante ha sido inspirado por la bibliografía (Means, 1977, *supra*). En resumen, la HBHA recombinante purificada sobre columna de heparina-sefarosa ha sido dializada durante 1h a 4°C contra 250 volúmenes de tampón de borato a 100 mM (pH 9,0). Después de la diálisis, unas muestras de 3 ml de disolución de proteína a 1 mg/ml han sido transferidas en unos  
50 tubos de vidrio cerrados que contienen 70 µl de disolución recientemente preparada de NaBH<sub>4</sub> a 40 mg/ml y 6 µl de disolución de formaldehído a 37% (formalina, Sigma, St. Louis). Los tubos han sido mantenidos en hielo. Unas muestras de 200 µl han sido extraídas cada diez minutos con el fin de verificar mediante inmunotransferencia y análisis mediante espectrometría de masas la integridad de la reacción de metilación.

I-7- Ensayo de metilación enzimática de la HBHA recombinante

Se han centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos 100 ml de cultivos de *M. smegmatis* o *M. bovis* BCG, a una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,5. El precipitado se ha resuspendido en 10 ml de tampón Hepes a 50 mM (pH 7,4) que contiene 1 mM de AEBSF (Pefabloc Sc., Roche) y 15% (v/v) de glicerol (tampón A). Las células han sufrido después una sonicación continua durante 10 minutos a 4°C con la ayuda de un sonicador de tipo Branson, estando la potencia suministrada a la salida ajustada a 5. El lisado de células totales se ha centrifugado a 4°C, a 20.000 x g durante 15 minutos. Con el fin de realizar unos ensayos de metilación, se han mezclado 300 µl de lisado total clarificado a 1 mg de proteína por ml con 40 µl de [metil-<sup>14</sup>C]AdoMet (60 mCi/mmoi, Amersham Pharmacia Biotech), 100 µl de HBHA recombinante purificada sobre columna heparina a 0,5 mg/ml, 5 µl de MgCl<sub>2</sub>  
65 1M y 55 µl de tampón A. Los ensayos de metilación han sido realizados a 25°C. Unas muestras de 100 µl han sido extraídas a lo largo del tiempo con el fin de verificar mediante autorradiografía el nivel de metilación de la HBHA

recombinante.

#### I-8- Animales

5 Los estudios han sido realizados sobre unos ratones BALB/c hembras de ocho semanas de edad (Iffa Credo, Francia). Para las infecciones por *M. tuberculosis*, los ratones han sido transferidos a un confinamiento de tipo P3.

#### I-9- Inmunización

10 Los ratones han sido inmunizados tres veces con dos semanas de intervalo por vía subcutánea en la base de la cola, con 5 µg de HBHA nativa por dosis, emulsionadas o no en una disolución de dimetildioctadecilamonio (DDA, 150 µl/dosis, Sigma) y el lípido A monofosforilado (MPL, 25 µl/dosis, Sigma). En el momento de la primera inyección, un grupo de ratones ha recibido una inyección de BCG (cepa Paris, 5.10<sup>5</sup> CFU) por vía subcutánea. Los ratones han sido infectados diez semanas después de la primera inmunización.

15 Se realiza el mismo experimento sustituyendo, en las dosis que sirven para la inmunización, la HBHA nativa por (i) la HBHA recombinante no metilada, y (ii) la HBHA recombinante metilada.

#### I-10- Infecciones experimentales

20 A partir del momento en el que la DO<sub>600</sub> alcanzaba 0,5, los cultivos de *M. tuberculosis* eran aclarados una vez en un medio Sauton, suspendidos en Sauton adicionado con 30% de glicerol, y después alicuotados para ser finalmente congelados a -80°C. Previamente a las infecciones, se descongeló un alícuota, y se determinó el número de CFU. Los ratones han sido infectados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola mediante un inóculo de 10<sup>5</sup> CFU de *M. tuberculosis* suspendidos en un tampón de fosfato (PBS, pH 7,4), en un volumen final de 200 µl. Cuatro ratones por grupo han sido sacrificados después de diez semanas. El número de bacterias ha sido determinado en el bazo, el hígado y los pulmones de cada ratón infectado, colocando las diluciones de los órganos triturados en un medio 7H11.

30 Los órganos de ratones vacunados por el BCG han sido colocados sobre unas cajas 7H11 que contienen 2 µg/ml de hidrazida del ácido 2-tiofen-carboxílico, con el fin de inhibir el crecimiento de los BCG residuales. Las colonias se completaron después de dos semanas de incubación a 37°C. La eficacia de la protección ha sido expresada en log<sub>10</sub> de reducción del número de bacterias presentes en los órganos de los ratones inmunizados en comparación con la enumeración relativa al grupo que había recibido el adyuvante solo. Los resultados han sido obtenidos a partir de grupos de cuatro ratones.

#### I-11- Cultivos de linfocitos y determinación del IFN-γ

40 Los linfocitos de los bazos han sido purificados tal como se describe en (Andersen *et al.* 1991. Infect. Immun. 59: 1558-1563). Los linfocitos de cuatro ratones por experimento han sido cultivados en unas placas de 96 pocillos (NUNC) que contienen 2.10<sup>5</sup> células/pocillo, en 200 µl de RPMI 1640 (Gibco, Francia) suplementado por 50 µM de 2-mercaptoetanol (Merck, Alemania), 50 µg/ml de penicilina-estreptomina (Gibco), 1 mM de glutamax (Gibco) y 10% de suero fetal de ternera (Roche).

45 La concanavalina A a 5 µg/ml ha sido utilizada como control positivo de viabilidad celular. La HBHA nativa ha sido utilizada a una concentración final de 5 µg/ml. Los sobrenadantes han sido recuperados 72 horas después del principio de la estimulación con el fin de determinar la IFN-γ. La IFN-γ ha sido detectada mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ utilizados han sido obtenidos a partir de los clones R4-6A2 (Pharmingen, USA) para la captura, y SMG1-2 (Pharmingen) para la detección.

50

## **II - Resultados y ejemplos**

### II-1- Caracterización de la modificación post-traducciona de la HBHA nativa

55 El análisis por espectrometría de masas ha revelado que la HBHA recombinante tenía un peso molecular (PM) de 21340, lo que corresponde al PM deducido de la secuencia nucleotídica que codifica HBHA micobacteriana (gen *hbhA* o también Rv0475 en *M. tuberculosis* H37Rv) (Menozzi *et al.*, 1998, *supra*). En cambio, el PM de la HBHA nativa era de 21610, es decir un PM de 270 superior al de la HBHA recombinante. En consecuencia, la HBHA producida por las micobacterias sufrían una modificación, la cual no se encontraba a nivel de la proteína recombinante producida por *E. coli*. Con el fin de definir la naturaleza exacta de esta modificación, las HBHA nativa y recombinante han sido sometidas a una hidrólisis por Endo-Glu, y la masa de los péptidos obtenidos ha sido determinada por espectrometría de masas. La única diferencia entre las HBHA nativa y recombinante se ha identificado a nivel del campo carboxi-terminal de dichas proteínas. La masa de este campo era de 4.342 Da para la HBHA nativa, y de sólo 4.076 Da para la HBHA recombinante. Esta diferencia de aproximadamente 270 Da correspondía a la diferencia de masa medida entre las proteínas HBHA enteras. Asimismo, la o las modificaciones post-traduccionales de la HBHA nativa han podido ser localizadas en el campo C-terminal. Además, el espectro de

65

masas que corresponde a dicho campo estaba constituido por un solo pico para la HBHA recombinante, mientras que contaba con cinco picos para la HBHA nativa, estando estos picos separados entre sí por 14 Da (figura 1).

#### II-2- Determinación de la modificación post-traducciona de la HBHA nativa

Con vistas a la identificación precisa de los aminoácidos modificados, la secuencia del campo de unión a la heparina se ha determinado mediante el método de degradación de Edman, según los procedimientos habituales. Este estudio reveló que sólo las lisinas estaban modificadas. Además, de los quince residuos lisinas presentes en el campo C-terminal de la HBHA, sólo dos presentaban el tiempo de retención de la lisina estándar. Los otros trece residuos tenían unos tiempos de retención que corresponden a los estándares glutamina y/o arginina. En un primer momento, puesto que (i) el análisis por espectrometría de masas reveló que había un incremento de 14 Da entre los diferentes fragmentos de la HBHA nativa, y (ii) sólo las lisinas estaban modificadas, la hipótesis emitida fue que las lisinas del campo C-terminal podrían ser metiladas, dando unas mono-, di- o también trimetil-lisinas. Esta hipótesis sin embargo sólo resultó en parte exacta, en la medida en la que no se ha identificado ninguna trimetil-lisina en la HBHA nativa. Esta verificación se ha efectuado por medio de estándares de calibrado que corresponden a unas mono-, di- y trimetil-lisinas, respectivamente. Las lisinas modificadas tenían unos tiempos de retención de acuerdo con los de la mono- y de la dimetil-lisina, pero no con los de la trimetil-lisina (figura 2).

Un análisis de los aminoácidos, incluyendo la mono-, di- y trimetil-lisina a título de estándares, ha confirmado este resultado.

#### II-3- Metilación química de la HBHA recombinante

La HBHA recombinante ha sido metilada químicamente y después sometida al análisis por espectrometría de masas. Tal como se indica en la figura 3, la masa del péptido que corresponde al campo C-terminal de la HBHA recombinante aumentaba a medida que progresaba la metilación química.

Además, el grado de metilación influía en la reactividad de los péptidos con los anticuerpos monoclonales 3921 E4 y 4057D2 (Rouse *et al.*, 1991, *supra*) (figura 4). Tal como se ha descrito anteriormente (Menozzi *et al.*, 1998, *supra*), la HBHA recombinante no era reconocida por el anticuerpo 4057D2, mientras que lo era débilmente para el anticuerpo 3921 E4. En cambio, tal como se indica en la figura 4, el grado de metilación de la HBHA recombinante afectaba de manera diferente su afinidad para estos dos anticuerpos, lo que muestra que la metilación de una proteína podía desempeñar un papel importante en su antigenicidad.

#### II-4- Metilación enzimática de la HBHA recombinante

Con el fin de determinar si la metilación de las lisinas de la HBHA nativa se debía a una actividad enzimática, se ha puesto a punto un ensayo de metilación *in vitro* específico de la HBHA recombinante a partir de un lisado micobacteriano. Unos cultivos micobacterianos han sido lisados por sonicación. Los lisados totales, así como unas fracciones citoplásmicas y parietales, han sido utilizados como fuentes enzimáticas para intentar transferir unos grupos [<sup>14</sup>C] metílicos del donante [<sup>14</sup>C-metil]AdoMet hacia el receptor representado por la HBHA recombinante. La incubación de los lisados totales de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*, que contienen la [<sup>14</sup>C-metil]AdoMet, con la HBHA recombinante resultó en la incorporación de grupos [<sup>14</sup>C]metílicos en dicha HBHA (figura 2). En cambio, cuando los lisados se calentaban a 95°C, ya no eran capaces de catalizar la reacción de transmetilación. Así, la o las metiltransferasas micobacterianas responsables de la metilación de la HBHA eran termosensibles.

El aislamiento de la o de las metiltransferasas está previsto según diferentes enfoques.

En un primer caso, las proteínas presentes en un lisado micobacteriano son separadas mediante cromatografía intercambiadora de iones, HPLC o de afinidad, siguiendo las fracciones capaces de catalizar la reacción de transmetilación a partir de la [<sup>14</sup>C-metil]AdoMet sobre la HBHA recombinante. Dichos enriquecimientos continúan hasta obtener un intercambio en el que la o las metiltransferasas son suficientemente puras para determinar su secuencia. Así, haciendo referencia a la secuencia conocida del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998, *supra*), el o los genes que codifican la o las metiltransferasas se identifican y después se clonan según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

Un segundo enfoque consiste en buscar en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv los genes candidatos que codifican potencialmente unas metiltransferasas en base a una homología de secuencia con la secuencia de genes de metiltransferasas conocidos e identificados como tales en los bancos de datos. Así, se han seleccionado cinco genes candidatos, a saber Rv0208c, Rv0380, Rv1405, Rv1644 y Rv3579. Estos genes son clonados y expresados en *E. coli*. Los productos de dichos genes son después purificados y ensayados por su capacidad para metilar la HBHA recombinante a partir del donante de metilo AdoMet marcado radiactivamente.

## II-5- Producción de la HBHA por *M. smegmatis*

Se ha demostrado que *M. smegmatis* no expresaba la HBHA (Pethe *et al.*, 2001, *supra*). Sin embargo, era posible transferir unos grupos [<sup>14</sup>C]metílicos a partir de [<sup>14</sup>C-metil]AdoMet sobre la HBHA recombinante utilizando un lisado de este microorganismo (figura 2). Así, se sugería que *M. smegmatis* poseía la maquinaria enzimática responsable de la reacción de transmetilación de la HBHA. Con el objetivo de verificar esta hipótesis, la cepa *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>-155 ha sido transformada con un derivado del plásmido pRR3 que contiene el gen *hbhA* (Rv0475) que codifica la HBHA en *M. bovis* BCG, con el fin de obtener la cepa *M. smegmatis* (pRR-hbhA). La producción de HBHA ha sido analizada mediante transferencia Western. La HBHA producida por *M. smegmatis* (pRR-hbhA), denominada MS-HBHA, era reconocida por los anticuerpos monoclonales 3921 E4 y 4057D2, lo que sugiere firmemente que dicha MS-HBHA estaba modificada post-traduccionalmente a semejanza de la HBHA nativa de *M. bovis* BCG. La MS-HBHA ha sido purificada y sometida a una hidrólisis por Endo-Glu. El análisis por espectrometría de masas de los productos de digestión así obtenidos, así como la determinación de la secuencia peptídica del dominio C-terminal de la MS-HBHA, han mostrado que presentaba efectivamente el mismo tiempo de modificación post-traducciona que la HBHA de *M. bovis*. En consecuencia, *M. smegmatis* poseía una maquinaria enzimática capaz de catalizar la metilación de la HBHA recombinante.

En consecuencia, para realizar los experimentos de vacunación, la HBHA nativa fue alternativamente purificada a partir de la cepa transformada *M. smegmatis* (pRR-hbhA).

## II-6- Estudio de la HBHA nativa como antígeno protector

La respuesta inmunitaria generada por la HBHA nativa, así como su poder protector contra una infección por *M. tuberculosis*, han sido ensayados en el modelo murino.

Estos experimentos se realizan asimismo utilizando la HBHA recombinante, en sus formas no metilada y metilada.

El protocolo de inmunización se ha inspirado en la bibliografía (Brandt *et al.* 2000. Infect. Immun. 68: 791-795). Los adyuvantes DDA y MPL han sido respectivamente utilizados en una cantidad de 150 µg y 25 µg por dosis.

El grupo 1 ha sido vacunado con el adyuvante solo contenido en 200 µl de tampón PBS. El grupo 2 ha sido vacunado con 5 µg de HBHA nativa purificada y emulsionada en 200 µl de mezcla PBS-adyuvante. El grupo 3 ha sido vacunado con 5 µg de HBHA nativa sola, en disolución en 200 µl de PBS. Los ratones han recibido tres inyecciones de las diferentes preparaciones con dos semanas de intervalo. Un cuarto grupo (control positivo) ha sido vacunado con una dosis de 5.10<sup>5</sup> CFU de BCG.

Se ha extraído sangre en el conjunto de los ratones de los diferentes grupos, diez días después de la última inyección de las preparaciones vacunales, con el fin de ensayar la producción de anticuerpos específicos de la HBHA nativa. Para cada grupo, las dosificaciones en IgG han sido realizadas sobre unas mezclas de sueros. El título en anticuerpos ha sido definido como correspondiente a la dilución máxima de los sueros dando un valor tres veces superior al blanco. La tabla 1 siguiente proporciona una medición de los títulos en IgG inducidos por la inyección de las diferentes preparaciones.

Tabla 1

	Grupo 1 Adyuvante	Grupo 2 HBHA+adyuvante	Grupo 3 HBHA	Grupo 4 BCG
IgG totales	< 10	73000	5000	< 50
IgG1	< 10	580000	24000	< 10
IgG2a	< 10	17000	800	< 20
IgG2b	< 10	8500	90	< 10
IgG3	< 10	750	150	< 10

Los resultados han mostrado que los ratones vacunados con la HBHA (grupos 2 y 3) producían unos porcentajes importantes de IgG1, y producían asimismo unas IgG2a, IgG2b, así como unas IgG3. Estos tipos de anticuerpos reflejaban la generación de una respuesta mixta TH1/TH2. La presencia del adyuvante (grupo 2) no modificaba el perfil de la respuesta con relación a la proteína HBHA sola (grupo 3). Sin embargo, dicho adyuvante permitía producir aproximadamente 10 veces más unas IgG diferentes (tabla 1).

Con el fin de ensayar la respuesta celular, se han sacrificado cuatro ratones por grupo diez semanas después de la primera inyección. Los linfocitos han sido recuperados y estimulados *in vitro* por la HBHA nativa. Después de la estimulación, se ha ensayado la producción de IFN-γ. Tal como se indica en la figura 5, sólo los linfocitos purificados a partir de ratones del grupo 2, vacunados con la HBHA nativa asociada al adyuvante, producían IFN-γ específico de dicha HBHA.

Por último, se han llevado a cabo unos experimentos con el objetivo de ensayar el poder protector de la HBHA

5 nativa contra una infección por *M. tuberculosis*. El grupo 3, vacunado por la HBHA sola, ha sido apartado en beneficio del grupo 2, debido a que la respuesta inmunitaria, tanto humoral (tabla 1) como celular (figura 5), había aparecido de mejor calidad a la luz de los resultados experimentales. Diez semanas después de la primera inyección de preparaciones vacunales, los ratones han sido infectados por vía intravenosa con  $10^5$  CFU de *M. tuberculosis*. Se han sacrificado cuatro ratones por grupo seis semanas después de la infección con el fin de enumerar el número de CFU presentes en los diferentes órganos de los ratones. La carga bacteriana ha sido determinada en el hígado, el bazo y los pulmones de los animales. La resistencia ha sido definida como la diferencia de carga bacteriana, expresada en  $\log_{10}$ , entre el grupo control 1, vacunado por el adyuvante solo, y los grupos 2 y 4, respectivamente vacunados por la HBHA asociada al adyuvante y por el BCG. La tabla 2 siguiente indica la eficacia de la protección inducida por las diferentes inmunizaciones.

Tabla 2

	Hígado		Bazo		Pulmones	
	CFU ( $\log_{10}$ )	Resistencia	CFU ( $\log_{10}$ )	Resistencia	CFU ( $\log_{10}$ )	Resistencia
Grupo 1 Adyuvante	5,60±0,20		5,85±0,21		5,27±0,25	
Grupo 2 HBHA+ adyuvante	4,66±0,35	0,94	5,00±0,04	0,85	4,34±0,17	0,93
Grupo 4 BCG	4,41±0,20	1,19	4,68±0,25	1,17	4,45±0,20	0,82

15 La enumeración de los CFU ha mostrado que la respuesta inmunitaria generada por la HBHA nativa era capaz de volver el ratón parcialmente resistente a una infección por *M. tuberculosis*. La resistencia observada era de hecho del mismo orden de magnitud, ya se tratase de la HBHA nativa o de la vacuna de referencia del estado de la técnica, a saber la BCG. En consecuencia, unas inyecciones de HBHA nativa protegían al ratón de una infección por *M. tuberculosis*, en unas proporciones cercanas a las de la vacuna BCG.

20 Este experimento se lleva a cabo utilizando las formas metilada y no metilada de la HBHA recombinante, con el fin de comparar el nivel y la eficacia de la protección inducida con los observados con la HBHA nativa. Así, la HBHA recombinante metilada, debido a que es inmunógena, genera en el animal una resistencia a una infección por *M. tuberculosis* tan eficaz como la inducida por la HBHA nativa.

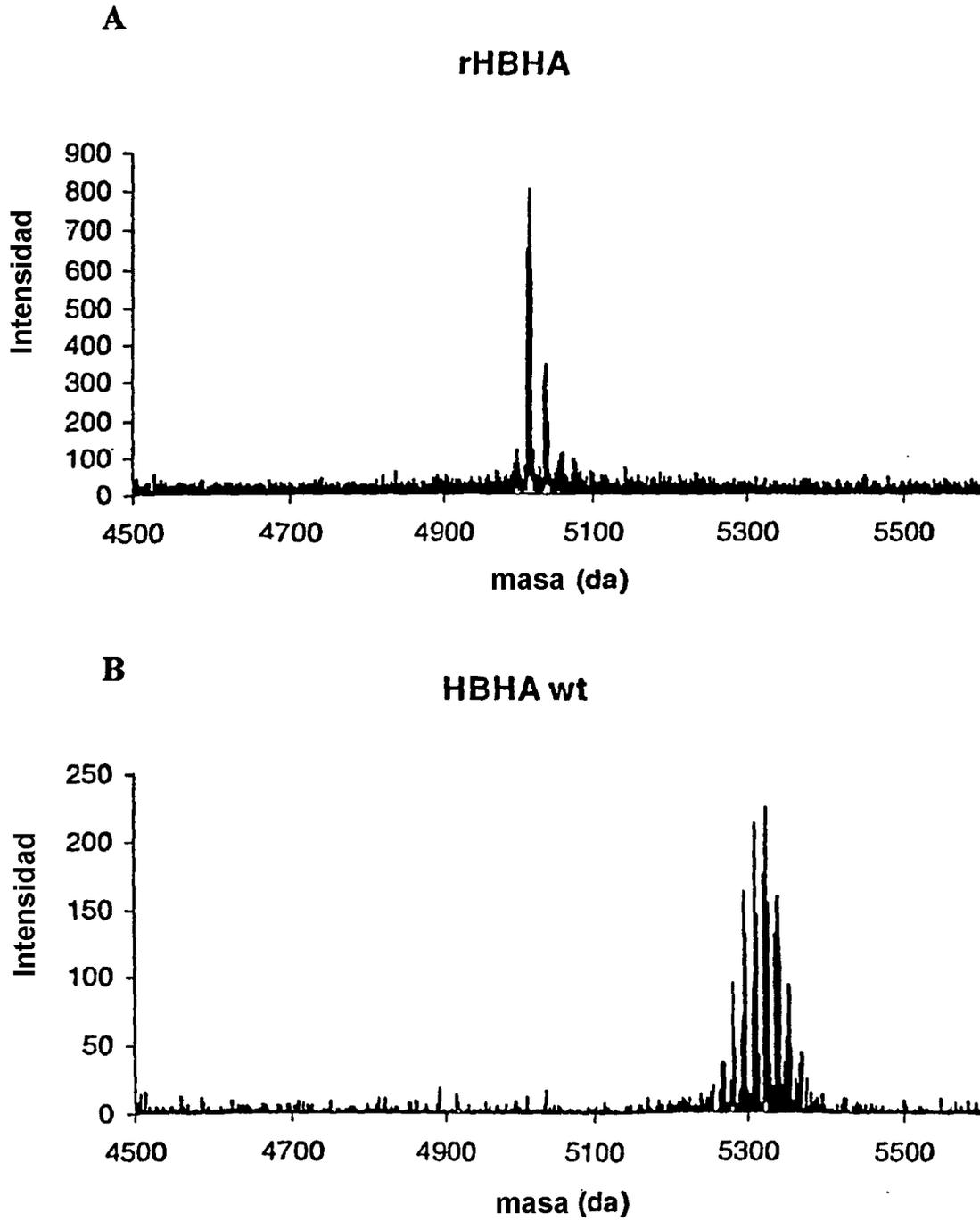
25 Así, uno de los objetos de la presente invención es una vacuna sub-unitaria destinada al tratamiento de las infecciones micobacterianas y que comprende, en su formulación, la HBHA nativa.

30 En el marco de la producción de composiciones vacunales a escala industrial, es estratégico utilizar unos organismos productores genéticamente recombinantes, frecuentemente más interesantes que los organismos productores salvajes porque los primeros son fáciles de transformar por las secuencias nucleotídicas de los segundos, que codifican la o las proteínas de interés, y porque son seleccionados juiciosamente, en particular por su inocuidad y sus parámetros de crecimiento fácilmente controlables, como en particular que no es necesario invertir en un material específico costoso. Por ello, un objeto preferido de la invención se refiere a una vacuna sub-unitaria destinada al tratamiento de las infecciones micobacterianas ventajosamente caracterizada porque comprende, en su formulación, la HBHA metilada en su versión recombinante, es decir producida por un hospedante celular recombinante meticulosamente seleccionado para responder a las exigencias industriales y sanitarias.

**REIVINDICACIONES**

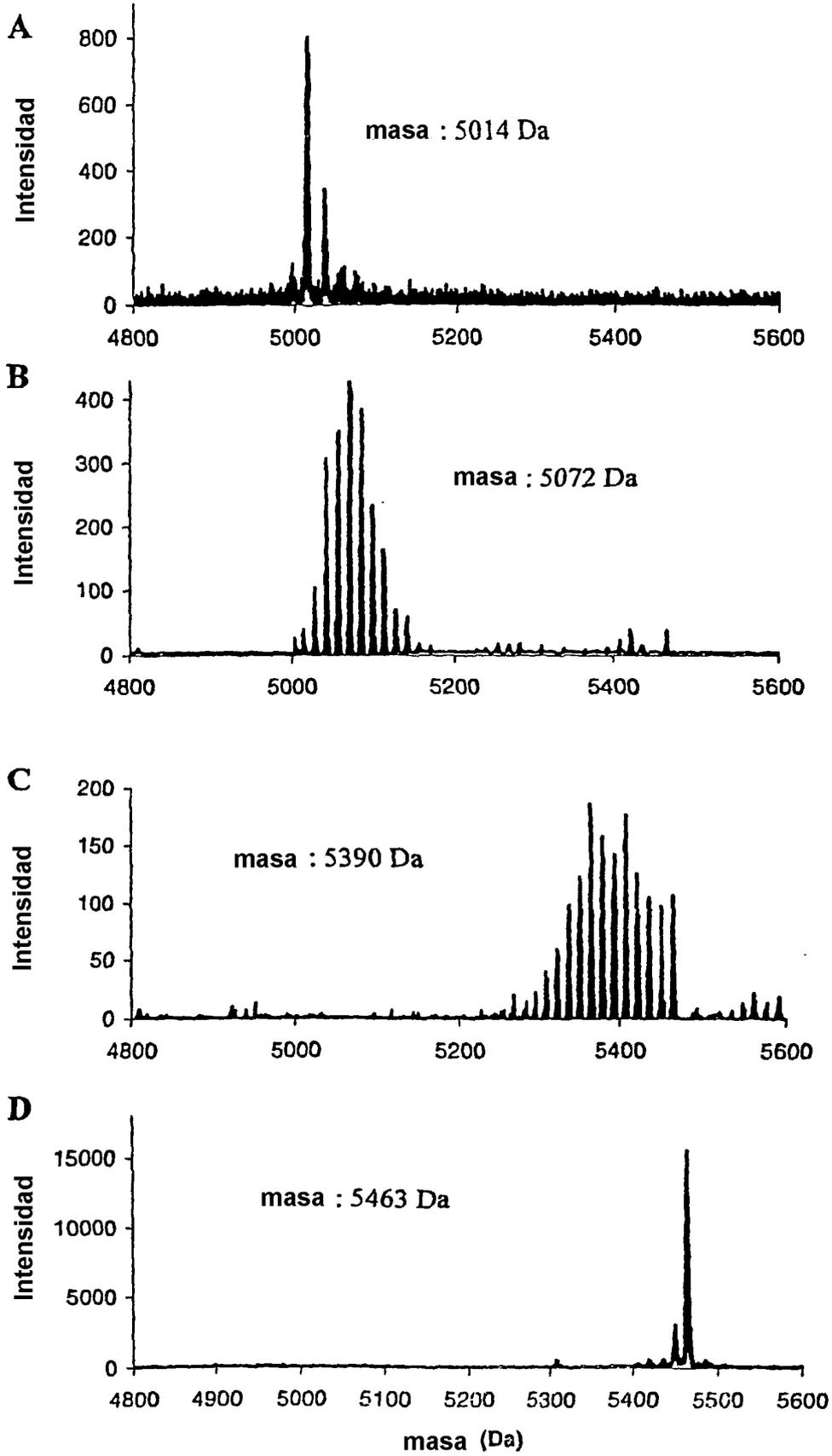
- 5 1. Péptido recombinante inmunógeno, caracterizado porque es una forma metilada del producto de expresión de una secuencia nucleotídica que codifica un antígeno micobacteriano de tipo hemaglutinina de unión a la heparina (HBHA) a nivel del campo de unión a la heparina de la HBHA de secuencia KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK.
2. Péptido recombinante inmunógeno según la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno micobacteriano de tipo hemaglutinina de unión a la heparina se obtiene a partir de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis*.
- 10 3. Péptido recombinante inmunógeno según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la secuencia nucleotídica codifica para una parte de la proteína HBHA que contiene por lo menos el campo de unión a la heparina de la HBHA.
- 15 4. Péptido recombinante inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los grupos metilos son llevados por unos residuos lisinas situados en el campo de unión a la heparina de la HBHA.
5. Péptido recombinante inmunógeno según la reivindicación 4, caracterizado porque los residuos lisinas son mono- o dimetilados.
- 20 6. Péptido recombinante inmunógeno según la reivindicación 4 ó 5, caracterizado porque los grupos metilos son llevados por la totalidad o parte de los residuos lisinas situados en el campo de unión a la heparina de la HBHA.
7. Péptido recombinante inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque los grupos metilos son llevados por todos los residuos lisinas situados en el campo de unión a la heparina de la HBHA.
- 25 8. Procedimiento de obtención de un péptido recombinante inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende por lo menos las etapas siguientes:
- 30 a) la producción mediante un hospedante celular recombinante, de una proteína HBHA recombinante;  
 b) la purificación de dicha proteína, y  
 c) su metilación post-traducciona;l;
- pudiendo el orden de las dos últimas etapas ser inverso.
- 35 9. Procedimiento de obtención según la reivindicación 8, caracterizado porque la proteína HBHA recombinante está constituida por su campo de unión a la heparina.
10. Procedimiento de obtención según la reivindicación 8 ó 9, caracterizado porque el hospedante celular recombinante es una bacteria.
- 40 11. Procedimiento de obtención según la reivindicación 10, caracterizado porque la bacteria es *M. smegmatis*.
12. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque la etapa de metilación se realiza por vía química.
- 45 13. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque la etapa de metilación se realiza por vía enzimática.
- 50 14. Procedimiento de obtención según la reivindicación 13, caracterizado porque la reacción de metilación se cataliza mediante por lo menos una metiltransferasa contenida en los extractos de proteínas totales de micobacterias.
- 55 15. Procedimiento de obtención según la reivindicación 14, caracterizado porque la por lo menos una metiltransferasa está contenida en los extractos de proteínas totales de *M. bovis* BCG o *M. smegmatis*.
16. Péptidos recombinantes inmunógenos metilados susceptibles de ser obtenidos mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15.
- 60 17. Uso de una forma metilada de la HBHA nativa, o de una forma metilada de la HBHA recombinante a nivel del campo de unión a la heparina de secuencia KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK, para la preparación de vacunas contra infecciones micobacterianas.
- 65 18. Uso según la reivindicación 17, para la preparación de vacunas contra infecciones por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

19. Uso según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque la forma recombinante es un péptido recombinante inmunógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 5 20. Composición inmunógena, caracterizada porque comprende, como principio activo, una forma metilada de la HBHA nativa, o una forma metilada de la HBHA recombinante a nivel del campo de unión a la heparina de secuencia KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente compatible.
- 10 21. Composición inmunógena según la reivindicación 20, caracterizada porque la forma metilada está asociada a uno o varios adyuvantes.
- 15 22. Composición inmunógena según la reivindicación 20 ó 21, caracterizada porque comprende además unos excipientes farmacéuticamente compatibles, tales como el agua, un tampón salino, dextrosa, glicerol, etanol, o mezclas de los mismos.
- 20 23. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizada porque la forma metilada es la HBHA nativa.
- 25 24. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizada porque la forma metilada es un péptido recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 25. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, formulada para una administración por vía nasal, oral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, vaginal, rectal, ocular o auricular.
26. Composición inmunógena según la reivindicación 25, que comprende unos compuestos auxiliares seleccionados de entre unos agentes humectantes, emulsionantes o tampones.
27. Composición inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, caracterizada porque comprende entre 0,1 y 20 µg de proteína HBHA purificada por dosis.
28. Composición inmunógena según la reivindicación 27, caracterizada porque comprende 5 µg de proteína HBHA purificada por dosis.

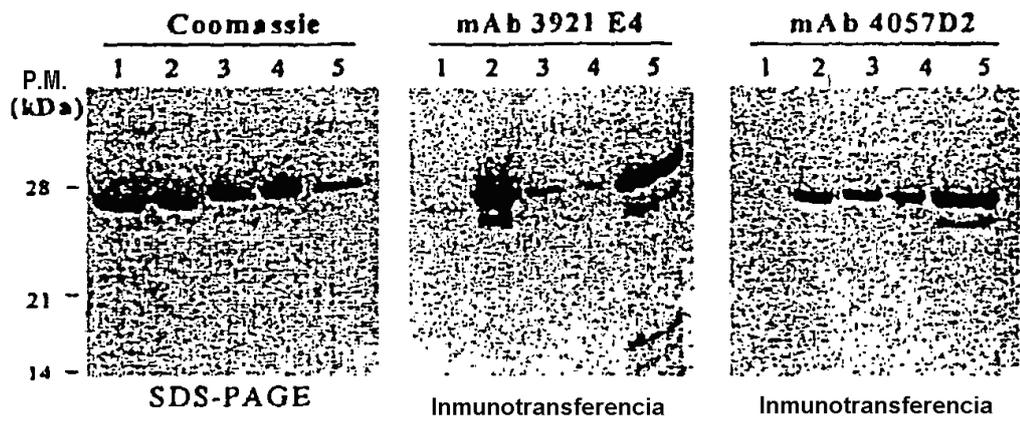


**Fig. 1**

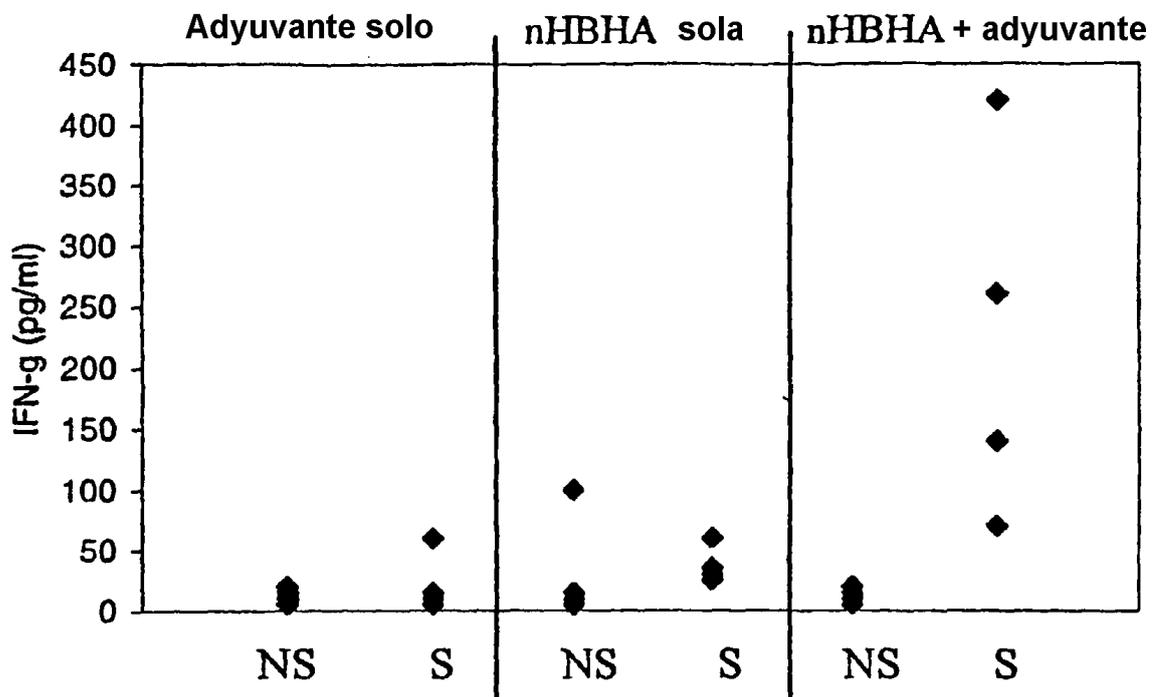




**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**