

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 518**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007 E 07730491 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1997881**

54 Título: **Vacuna contra la tuberculosis**

30 Prioridad:

24.03.2006 ES 200600761

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

11.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)
C/ BALTASAR GRACIÁN 1, ENTLO.
50005 ZARAGOZA, ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN MONTAÑÉS, CARLOS;
GICQUEL, BRIGITTE;
PEREZ HERRAN, ESTHER;
GONZALO ASENSIO, JESUS y
ARBUÉS ARRIBAS, AINHOA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 433 518 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

Vacuna contra la tuberculosis

La presente invención hace referencia a un microorganismo aislado perteneciente al género del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizado porque comprende la inactivación del gen Rv0757 que confiere un fenotipo PhoP- y la inactivación del gen Rv2930 (fadD26) que impide la producción de DIM (fenotipo DIM-). Adicionalmente, la presente invención comprende el uso de dicho microorganismo para la elaboración de una vacuna para la inmunización o prevención de la tuberculosis.

Antecedentes de la invención

El uso de vacunas para prevenir la tuberculosis en humanos ha demostrado ser un formidable desafío durante cerca de un siglo. BCG, derivada de *M. bovis*, es hoy en día la única vacuna en uso contra la tuberculosis y es la vacuna más utilizada en todo el mundo. El desarrollo y administración generalizada de la vacuna BCG desde comienzos de los años 1920 representó un importante avance, con la expectativa de poder erradicar la tuberculosis del mundo. No obstante, las promesas iniciales no se lograron y, a partir de los resultados de un gran número de ensayos de eficacia, es evidente que la vacuna BCG, en su forma actual, es de un uso limitado para el control de la enfermedad, particularmente en las formas respiratorias en adultos de áreas del tercer mundo donde la enfermedad es endémica [4]. Con un mejor conocimiento de la virulencia del *M. tuberculosis* y los modelos de respuestas inmunes que conducen a la generación de inmunidad protectora, hace posible desarrollar vacunas mejores que la BCG. La observación de que los mayores niveles de protección se logran cuando el huésped se vacuna con BCG sugiere que la viabilidad y la persistencia son propiedades fundamentales que se requieren para el éxito de una vacuna contra la tuberculosis. En la presente invención, utilizamos una cepa de *M. tuberculosis* con el gen Rv0757 (*phoP*) inactivado y una segunda mutación independiente de *phoP* que impide la síntesis de DIM, como prototipo de vacuna viva de una sola dosis, y demostramos que, además de ser más atenuada que la BCG en los ratones inmunocomprometidos SCID, impartía niveles de protección comparables a los conferidos por BCG en ratones y una protección superior a BCG en cobayas.

El gen *phoP* junto con el *phoR* forma parte de un sistema de dos componentes que muestra un elevado grado de semejanza con otros sistemas de dos componentes que controlan la transcripción de genes clave de la virulencia en patógenos intracelulares. Controla además la expresión de otros muchos genes que no intervienen directamente en la virulencia [19]. La eliminación de los genes de la virulencia no parece ser, *per se*, el único método para la atenuación del *M. tuberculosis*. Se demostró que un mutante auxotrófico de pantotenato del *M. tuberculosis*, incapaz de una síntesis *de novo* del ácido pantoténico, persistía en ratones SCID, sin poder provocar la enfermedad [17]. Los auxótrofos de leucina individuales resultan también fuertemente atenuados e incapaces de replicación *in vivo* en ratones SCID [28]. Así pues, se admite en la actualidad generalmente el principio de que las cepas de vacunas basadas en el *M. tuberculosis* pueden ser atenuadas con éxito, mientras que se retienen los genes que se suprimen en la BCG de *M. bovis*.

En el pasado, la investigación de vacunas con eficacia superior a BCG se basaba en la noción de que la pérdida de virulencia de la BCG era en sí misma un factor que contribuía a su falta de eficacia protectora completa [32]. Se razonó, pues, que nuevos mutantes atenuados de *M. tuberculosis*, con menor virulencia, podrían resultar más efectivos como vacunas. No obstante, un reciente trabajo ha demostrado que la infección natural con *M. tuberculosis* y la vacunación con BCG no difieren en su capacidad para producir inmunidad protectora contra la tuberculosis [34]. Esto plantea las cuestiones de si es o no posible mejorar la BCG por atenuación racional de *M. tuberculosis*. Martin C. et al. Vaccine, April 2006, Vol. 24, No. 17, páginas 3408-3419 muestra que una cepa mutante de *Mycobacterium tuberculosis* que tiene el gen *pop* inactivado, se encuentra atenuada en comparación con la cepa parental, que se encuentra más atenuada que la cepa CGG y que proporciona niveles de protección comparables a aquellos conferidos por BGG en ratones y mayor protección que BGG en cobayas.

Infante E. et al., Clin. Exp. Immunol. 2005, Vol. 141, No. 1, páginas 21-28 muestra que un mutante de *Mycobacterium tuberculosis* que tenga el gen fadD26 inactivado y en consecuencia una alteración en la síntesis de DIM se encuentra atenuado, y que induce un mayor nivel de protección contra una cepa virulenta de *M. tuberculosis* que la cepa BGG. En este contexto, la observación de que la cepa mutante de *M. tuberculosis* de la presente invención con la combinación de 2 mutaciones independientes 1.- en la síntesis de la proteína PhoP y 2.- en la síntesis de DIM resulta más atenuada que BCG en el modelo de ratón SCID, incluso cuando se aplicaba a una dosis 10 veces superior a las de BGG, y el mayor grado de protección que BCG en el modelo de cobaya es particularmente sorprendente y relevante.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención, hace referencia a un microorganismo aislado perteneciente al género complejo *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizado porque comprende la inactivación del gen Rv 0757 (*phoP*) y

una segunda mutación independiente de *phoP* que elimine la producción de DIM, que se encuentra en el gen Rv2930 (*fadD26*), que consiste en la delección del gen *fadD26*, que es esencial para la síntesis de DIM.

5 Un segundo aspecto de la presente invención hace referencia al uso del microorganismo aislado de la presente invención para la elaboración de una vacuna para la prevención de la tuberculosis en animales, y aún más preferentemente para la prevención de la tuberculosis en humanos, así como otros usos que actualmente tienen las vacunas contra la tuberculosis en el tratamiento de enfermedades en humanos como puede ser el cáncer de vejiga.

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención la expresión "cepa SO2 de *M. tuberculosis*" se utilizará para hacer referencia al microorganismo aislado de la cepa de *M. tuberculosis* que se ha inactivado mediante el gen Rv0757 construida a partir de la cepa clínica de *M. tuberculosis* MT103 por la inserción de un marcador de resistencia a kanamicina en el sitio *BclI* del gen Rv0757 de *M. tuberculosis*, utilizando recombinación homóloga según el método descrito por Pelicic et al (1997) (Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10955-10960), y que adicionalmente comprende la inactivación del gen *fadD26* que elimine la producción de DIM (phthiocerol dimycocerosatos). Por lo tanto, dicha cepa de la invención presenta dos mutaciones independientes en vacunas vivas atenuadas derivadas de *M. tuberculosis* no afectando la mutación independiente de *phoP* a las propiedades de la vacuna derivadas de la inactivación de dicho gen. En el ejemplo 9 se describe como construir un microorganismo aislado del género *Mycobacterium* con la doble mutación independiente que proporciona un fenotipo igual que la descrita para la cepa SO2 de *M. tuberculosis*.

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como vacuna a aquellos fármacos que al ser administrados producen defensas frente a la enfermedad que se quiere prevenir.

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como BCG a la actual vacuna en uso contra la tuberculosis desde 1921. Se trata de una vacuna viva atenuada derivada de una cepa de *M. bovis* que tras subcultivarse en el laboratorio perdió su virulencia y hoy sabemos que tiene más de cien de genes eliminados (5).

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención se utilizará H37Rv para hacer referencia a una cepa de *M. tuberculosis* patógena que ha sido secuenciada, en donde Cole, et al. hacen referencia a estos genes como Rv (Ref Cole et al 1998 Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544).

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como MT103 a un aislamiento clínico de *M. tuberculosis* (Referencia 15 Camacho et al.)

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como cepa DIM- a aquella cepa del complejo *M. tuberculosis* que no es capaz de sintetizar phthiocerol dimycocerosatos, que son importantes lípidos relacionados con la patogenicidad de *M. tuberculosis*. En la figura 11 se utiliza la cepa 1A29 que consiste en la cepa MT103 que tiene inactivado el gen Rv2930 (*fadD26*) por el transposón 1096 descrito en ref 15 (Camacho et al. 1999 Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34: 257-267)

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como SO2+ pSO5 a la cepa de *M. tuberculosis* SO2 en la que la mutación en Rv0757 se complementa con el gen Rv0757 por la transformación de un plásmido replicativo con el gen *phoP* de micobacterias, pero no es capaz de complementar la síntesis de DIM, siendo su fenotipo *phoP*+ DIM-.

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como *M. tuberculosis phoP*- a la cepa de *M. tuberculosis* que ha sido inactivada mediante el gen Rv0757 por delección entre los sitios *EcoRV*-*BspEI* siendo su fenotipo *phoP*- DIM+.

De aquí en adelante en el contexto de la presente invención nos referiremos como Rv2930 (*fadD26*) al gen que se encuentra en el inicio del operón encargado de la síntesis los phthiocerol dimycocerosatos (Referencia 15 Camacho et al. 1999) y la eliminación de este gen en *M. tuberculosis* confiere un fenotipo estable DIM -.

Descripción de las figuras

Fig. 1 Análisis Western blot. Imagen Western blot de extractos proteicos extracelulares de MT103, de la cepa SO2 de la presente invención y BCG Pasteur, utilizando anticuerpos policlonales obtenidos contra PhoP y ESAT-6. La cepa MT103 tiene un fenotipo ESAT6 + y *phoP*+, la cepa SO2 tiene un fenotipo *PhoP*- y ESAT6 + y la cepa de la vacuna BCG es *PhoP*+ y ESAT6 -.

- 5 Fig. 2 Atenuación de la cepa SO2 de la presente invención en ratones SCID. a, Curva de supervivencia de ratones SCID infectados (n=10) a través de aerosol, con 20 CFU de SO2, SO2 complementado con pSO5 (SO2 + pSO5) y MT103. Las medias de días de supervivencia fueron superiores a 245 días (SO2), 62.1±5,88 (SO2 + pSO5) y 36.7±0,67 (MT 103). Los ratones infectados por aerosol con la cepa SO2 sobreviven los 245 días del experimento mientras los infectados por MT103 y la cepa SO2 complementada con *phoP* mueren antes del día 62 b, Curvas de supervivencia de ratones SCID (n=7) infectados por inyección intravenosa con 5,4 x 10⁶ CFU de SO2 y 2 x 10⁵ CFU de BCG Pasteur. Esto demuestra que el nivel atenuación de la cepa SO2 es mayor que la BCG, la vacuna que actualmente se utiliza en humanos contra la tuberculosis.
- 10 Fig. 3 Respuestas inmunes celulares en ratones vacunados con la cepa SO2 de la presente invención y BCG. Ratones Balb/c fueron vacunados por vía subcutánea con 8x10³ CFU de BCG (Phipps) o 2,5 x 10³ CFU de la cepa SO2 de la presente invención. Los resultados se presentan como porcentaje de las poblaciones totales de CD4+/CD8+ en bazo a intervalos de tiempo después de la vacunación y como porcentaje de células que expresan IFN-γ de la población total de CD4+/CD8+ después de estimulación con antígeno completo de *M. tuberculosis*. * denota diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los puntos de tiempo indicados (p < 0,005). Los resultados de inmunidad celular muestran que el número de linfocitos CD4+ en los animales vacunados con la cepa SO2 es mayor en los días 14, 30, 45 y 60 y la producción de IFNγ específica contra los antígenos de *M. tuberculosis* es significativa los días 45 y 60 respecto a los ratones vacunados con BCG. El número de linfocitos CD8+ en los animales vacunados con la cepa SO2 es mayor a los días 45 y 60 y la producción de IFNγ específica contra los antígenos de *M. tuberculosis* es significativa el día 14 respecto a los ratones vacunados con BCG.
- 15 Fig. 4 Eficacia protectora de SO2 de la presente invención comparada con BCG en ratones Balb/c vacunados. Número de CFU recuperadas de los pulmones (a) y bazos (b) de ratones Balb/c vacunados con la cepa SO2 de la presente invención y BCG, infectados por vía intravenosa con H37Rv de *M. tuberculosis*. La reducción de CFUs en pulmón y bazo en ratones vacunados con SO2 es similar a la obtenida con los vacunados con BCG, y demuestra una protección significativa respecto a los ratones no vacunados.
- 20 Fig. 5 Eficacia protectora en cobayas vacunados con la cepa SO2 de la presente invención y BCG frente dosis bajas de *M. tuberculosis* H37Rv. Números medios de log₁₀ CFU / ml en los pulmones (a) y los bazos (b) de cobayas vacunadas y de control con solución salina infectados con dosis bajas de *M. tuberculosis* H37Rv. Los datos representan los CFU medios de todos los animales (n=6) sacrificados al cabo de 4 semanas. Las barras de error indican la desviación estándar. La reducción de CFU en pulmón y bazo de cobayas infectadas con *M. tuberculosis* a dosis bajas y vacunadas con SO2, es similar a la obtenida en los vacunados con BCG y significativa respecto a los ratones no vacunados.
- 25 Fig. 6 Eficacia protectora en cobayas vacunados con la cepa SO2 de la presente invención y BCG frente a la infección con dosis elevadas de *M. tuberculosis* H37Rv. a, Dado que los experimentos de protección en ratón y en cobaya infectados a bajas dosis mostraban una clara protección en los ratones vacunados con SO2 y BCG pero no diferencias entre BCG y SO2, se utilizó un modelo de cobaya con infección a altas dosis. Curva de supervivencia de cobayas después de infección por aerosol con H37Rv de *M. tuberculosis*. b, La extensión de la enfermedad pulmonar y la infección diseminada, medida por la consolidación pulmonar total. Los valores de cada animal individual sacrificado en el punto final humano se indican con una "x". La línea discontinua indica el valor medio en porcentaje del grupo (# en SO2 corresponde a dos animales). c, baja resolución (x30) de imágenes de secciones representativas de lóbulos pulmonares tomadas de cobayas de cada uno de los grupos de tratamiento. La barra representa 1 mm. d, Recuentos medios de CFU en el bazo y pulmones de cobayas vacunados y no vacunados. Este experimento demuestra que en modelo cobaya a dosis altas de infección con *M. tuberculosis*, las cobayas vacunadas con SO2 sobreviven significativamente más que BCG y además producen menos lesiones en el pulmón y reducen el número de CFU en bazo y pulmón frente a la actual vacuna BCG.
- 30 Fig. 7 La atenuación de infección con SO2 de la presente invención en ratón BalbC por vía intravenosa no se restaura complementando con *phoP*. Estudio de la infección en ratón Balb/C por vía intravenosa de 105 CFUs de la cepa SO2 (*phoP*-DIM-) comparada con la cepa silvestre MT103 y la cepa complementada con *phoP* (SO2 + pSO5). Se observa una reducción de colonias (CFU) tanto en bazo (7a spleen) como en pulmón (7b lung), medidas a las 3 y 6 semanas. Los niveles de CFU de la cepa salvaje no se restauran en la cepa complementada. Estos experimentos en ratón inmunocompetente indican que la sorprendente atenuación podría deberse a una segunda mutación adicional no restaurada por la complementación *phoP*.
- 35 Fig. 8. La cepa SO2 de la presente invención no produce DIM y la síntesis de DIM es independiente de la mutación *phoP*. Análisis de lípidos de diferentes cepas de *M. tuberculosis* por cromatografía en capa fina. 8 a Puede observarse la producción de DIM en la cepa MT103, mientras que la cepa SO2 y la complementación con el gen *phoP* (SO2 pSO5) no producen DIM. Esto muestra que con SO2 la ausencia de DIM es independiente de *phoP*. 8 b muestra la cepa MT103 y la cepa MT103 que inactiva sólo el gen *phoP* (MT103 Δ*phoP*::*hyg*) y las 2 son capaces de sintetizar DIM lo que confirma que la producción de DIM es independiente de la mutación *phoP*.
- 40
- 45
- 50
- 55

Fig 9. Construcción de los plásmidos para la inactivación del gen *fadD26*.

Fig 10. Construcción de los plásmidos para la inactivación del gen *phoP*.

Fig 11. Estudio de la atenuación en ratones: Curva de supervivencia de ratones Balb/C inoculados por vía intratraqueal para estudiar la atenuación de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*. H37Rv y MT103 corresponden a cepas de *M. tuberculosis* sin mutaciones y todos los ratones mueren antes de la 10ª semana con la cepa de *M. tuberculosis* DIM- (1A29) a las 20 semanas sobreviven el 50% de los ratones. Todos los animales inoculados con SO2 (mutante *phoP*- y DIM-) sobreviven las 20 semanas del experimento.

Fig. 12. Curva de supervivencia y peso en cobaya para estudio de la toxicidad de SO2, con 50 veces la dosis de vacuna. Para mostrar que SO2 no es tóxico fueron inoculadas seis cobayas con 50 veces la dosis de vacuna. La supervivencia fue del 100% a los 6 meses de duración del experimento. En todos los animales se observó un aumento de peso durante los 6 meses, indicando la no toxicidad de la cepa SO2 (Y= peso en gramos y semana de infección. X= tiempo en semanas).

Fig 13. Tasa de supervivencia de cobayas vacunadas tras infección con *M. tuberculosis*. Estudio de protección en cobayas, supervivencia después de 300 días: Curva de supervivencia de cobayas sin vacunar (salino), vacunadas con la vacuna actual BCG, con una cepa de *M. tuberculosis phoP*- o con SO2 (mutante *phoP*- y DIM-). Tras la vacunación por vía subcutánea los animales son infectados con una cepa de *M. tuberculosis* virulenta (H37Rv) a dosis altas para estudiar la supervivencia. A los 60 días las 6 cobayas no vacunadas mueren mientras los grupos vacunados con SO2, *phoP*- y BCG sobreviven. A los 300 días de la infección 3 cobayas vacunadas con BCG y *phoP*- mueren, en comparación con únicamente una del grupo vacunado con SO2, lo que indica que la protección del mutante *phoP* es similar a la actual vacuna BCG mientras la vacunación con SO2, el doble mutante *phoP*- y DIM-, protege mejor en el modelo cobaya.

Fig 14. Estudio de protección en cobayas, tasa de supervivencia a los 400 días: Continuación del experimento de la figura 13. Las 6 cobayas no vacunadas murieron a los 60 días. A los 400 días de la infección sobreviven 3 cobayas del grupo vacunado con SO2 (fig 14a) mientras solo 1 cobaya vacunada con BCG (fig 14a y Fig 14 b) y *phoP*- (fig 14b) sobreviven, indicando nuevamente que la protección del mutante *phoP* es similar a BCG, mientras que la vacunación con SO2, el doble mutante *phoP*- y DIM protege mejor a los 400 días del experimento

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención hace referencia a un microorganismo aislado perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* caracterizado por que comprende la inactivación del gen Rv0757 que confiere un fenotipo PhoP- y la inactivación del gen *fad D26* que impide la producción de DIM (fenotipo DIM-). Adicionalmente, la presente invención comprende el uso de dicho microorganismo para la elaboración de una vacuna para la prevención de la tuberculosis, y la vacuna *per se*.

A lo largo de la presente invención, se muestra cómo cepas aisladas del género *Mycobacterium phoP*- DIM- presentan unas características que les hacen especialmente aptas para su utilización como vacunas, tanto por el nivel de atenuación que adquieren como por el nivel de protección que confieren.

Con la finalidad de demostrar la atenuación se inocularon ratones inmunodeprimidos SCID por aerosol con la cepa SO2 (*phoP*- DIM-). Dichos ratones sobreviven (fig 2a) significativamente más que los ratones infectados por la cepa salvaje. Adicionalmente, esta atenuación es complementada con *phoP* en la cepa SO2 + pSO5 (*phoP*+ DIM-) (Fig. 8a).

Además, cuando los estudios de atenuación se realizan en ratones inmunocompetentes Balb/C por vía intravenosa (fig 7), se muestra una clara atenuación de SO2 respecto a la cepa salvaje MT103, pero sorprendentemente esta atenuación no se complementa con *phoP* al resultar la cepa SO2 + pSO5 (*phoP*+ DIM-) tan virulenta para el ratón inmunocompetente como la cepa salvaje. Estudios de supervivencia en ratón Balb/C comparando la cepa SO2 (DIM-, *phoP*-) con una cepa solo DIM- demuestran una supervivencia sorprendentemente mayor para SO2 (fig 11).

Estudios comparativos de supervivencia de SO2 y BCG, en ratones SCID infectados por vía intravenosa, demuestran que el nivel atenuación de la cepa SO2 es mayor que la vacuna que actualmente se utiliza en humanos contra la tuberculosis BCG (fig 2b). Estudios de toxicidad en cobayas con 50 veces la dosis de vacuna que se realizan como control de calidad de los lotes de vacuna BCG, demuestran que en los 6 meses de estudio las cobayas aumentan su peso y no presentan lesiones histológicas no visibles macroscópicamente ni al microscopio compatibles con tuberculosis, con lo que confirman la atenuación y no toxicidad de SO2 (fig 12). Esta sorprendente atenuación y falta de toxicidad es debida al fenotipo PhoP- DIM- y además estas mutaciones mantienen la sensibilidad a los fármacos antituberculosos, lo que permitiría un tratamiento convencional.

En la presente invención se muestra como en los experimentos de vacunación realizados en los ratones Balb/c, los niveles de protección conferidos por la cepa SO2 de *M. tuberculosis* de la presente invención y la BCG fueron similares tanto en los pulmones como en el bazo hasta cuatro semanas después de la infección. Si comparamos las proporciones relativas de células CD4+ y CD8+ de los bazos de ratones vacunados, en los ratones vacunados con la cepa SO2 de la presente invención se encontró un porcentaje mayor de células tanto CD4+ como CD8+, en comparación con los ratones vacunados con BCG. Además, cuando se estimulaban estas células con antígenos derivados de filtrado de cultivos, se midió un porcentaje significativamente superior de CD4+/IFN- γ + en los ratones vacunados con la cepa SO2 de la presente invención a los 45 y 60 días después de la vacunación. Aunque no es significativa en cada punto de tiempo, se midió una tendencia similar para las CD8+/IFN- γ + en los ratones vacunados con la cepa SO2 de la presente invención. Los datos sugieren que la vacunación con la cepa SO2 de la presente invención da como resultado una mejor activación de las células T, en comparación con la vacunación con BCG, medido mediante la síntesis de IFN- γ . Dado que la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis* depende en general de la generación de una respuesta inmune celular del tipo TH₁ caracterizada por la secreción de IFN- γ a partir de las células T específicas del antígeno, podemos concluir que los niveles relativamente elevados de activación de las células T inducidos por la cepa SO2 de la presente invención contribuye a su capacidad para conferir una potente respuesta protectora.

Adicionalmente, con el uso de diversos sistemas y de modelos de ensayo y una variedad de condiciones, hemos podido demostrar la capacidad relativa del modelo ratón para estudiar las diferencias de protección de BCG en comparación con SO2. Se demostró que las dos vacunas SO2 (phoP- DIM-) y BCG protegen en el modelo de ratón.

Se emprendió una estrategia para comparar las vacunas en un ensayo más relevante y progresivamente más exigente con cobayas. Este enfoque sistemático a la comparación de vacunas podría representar un punto de partida útil para identificar las mejores vacunas candidatas que deberían llevar a nuevos ensayos. Se acepta, en general, que la cobaya es más susceptible a la infección por tuberculosis y, en consecuencia, podría ser un modelo más relevante para esta enfermedad [30]. En comparación con los ratones, la cobaya tiene la ventaja de que la patología de la enfermedad es similar a la que se observa en la tuberculosis humana y sirve, por consiguiente, como modelo apropiado para probar la eficacia de una vacuna. En un reciente estudio de vacuna aplicada en aerosol, con un doble mutante auxotrófico de pantotenato y leucina del *M. tuberculosis*, se obtuvieron niveles de protección equivalentes a la BCG de *M. bovis* en los pulmones y en el bazo de cobayas vacunados, con una difusión reducida de la infección al bazo inducida por ambas vacunas, cinco semanas después de la aplicación en aerosol de *M. tuberculosis* [34]. En otro estudio que utilizó BCG recombinante que expresaba ESAT-6, sólo se observaron en el bazo [6] niveles de protección superiores a la BCG de *M. bovis*, sugiriendo que la mejora de la protección se limita a su capacidad para impedir la difusión de la infección desde el pulmón.

Para llevar a cabo la presente infección se inocularon cobayas con una baja dosis de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo los niveles de protección conferidos por la vacunación con la cepa SO2 de la presente invención y BCG similares, tanto en los pulmones como en el bazo hasta 4 semanas después de la infección. Ambas vacunas proporcionaron una protección sumamente eficiente, reduciendo los CFUs en los pulmones y bazos en aproximadamente 2 log., en comparación con los grupos de control que recibieron solución salina. No obstante, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de vacunas. Con un período tan breve después de la infección, podemos suponer que sería difícil demostrar la mayor eficacia de una nueva vacuna respecto a la BCG. Esto se debe a que, en este momento, los CFU (unidad formadora de colonias) de los órganos de animales vacunados con BCG, son tan bajos que el ensayo no tiene el poder diferenciador que demuestre una reducción adicional significativa de los CFU. En otros estudios de supervivencia con cobayas, se ha demostrado que, si bien la vacunación con BCG proporciona una protección estadísticamente significativa, en comparación con controles no vacunados (o vacunas no efectivas), esta protección sólo es parcial incluso contra el ataque a baja dosis con *M. tuberculosis*. En los estudios de aplicación de dosis bajas realizados durante 60 a 80 semanas después de la infección, algunos controles con BCG no protegieron a ninguno de las cobayas [35], mientras que otros protegieron a un porcentaje reducido (de un 20 a un 30%) de los animales [36] [37]. Por el contrario, una dosis elevada de aplicación puede dar como resultado una enfermedad más grave de la utilizada habitualmente para evaluar la eficacia protectora de las vacunas para la TB.

Para llevar a cabo la presente invención utilizamos infección por aerosol con una dosis relativamente elevada de *M. tuberculosis* H37Rv y el período de estudio fue ampliado hasta 180 días. Hicimos esto para generar un nivel más exigente de desafío que pudiera demostrar la potencial eficacia protectora de la cepa SO2 de la presente invención, y facilitar al mismo tiempo un nivel de discriminación en comparación con la BCG. En términos de supervivencia, los animales del grupo vacunado con BCG quedaron significativamente protegidos en comparación con los controles no vacunados, y demostraron un nivel global de protección similar al observado en otros estudios, a pesar de la dosis relativamente elevada de infección utilizada en nuestro estudio. Además, encontramos también un aumento estadísticamente significativo de la eficacia protectora de la cepa SO2 (phoP- DIM-) de la presente invención en comparación con la BCG, medida por varios indicadores, que incluían una prolongación de la supervivencia y el grado de consolidación de las lesiones pulmonares. Esta forma menos grave de enfermedad podría haber llevado directamente a la mayor supervivencia de los animales vacunados con la cepa SO2 de la presente invención.

Los resultados descritos en la presente invención demuestran que la cepa SO2 y por tanto un microorganismo perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* con fenotipo *phoP*- DIM-, es una vacuna más eficaz que BCG de acuerdo con una serie de criterios. Es más atenuada que la BCG en los ratones SCID, proporciona a ratones una inmunidad protectora al menos tan buena como la BCG y genera respuestas de inmunidad celular más potentes.

5 Adicionalmente, en experimentos de protección realizados en cobayas contra una infección a dosis elevadas de H37Rv, la cepa con fenotipo DIM- *phoP*- da como resultado un 100% de supervivencia a las cobayas en circunstancias en las que la BCG sólo consigue un 33% de supervivencia. Esta protección va asociada a una disminución de la gravedad de la enfermedad y de la carga bacteriana.

10 Con objeto de comprobar si el nivel de protección de SO2 (*phoP*- DIM-) era debido a la mutación *phoP* o podría deberse a la mutación adicional en DIM se realizó un nuevo experimento de vacunación en cobayas a alta dosis de infección. Grupos de 6 animales fueron vacunados con BCG, con SO2 (*PhoP*- DIM-) y con *M. tuberculosis phoP*- DIM+ y 6 animales utilizados como control no fueron vacunados. El experimento tuvo una duración de 400 días.

15 En este nuevo experimento las cobayas no vacunadas murieron antes del día 70. A los 300 días de la infección 3 cobayas vacunadas con BCG y *phoP*- DIM+ mueren mientras que solo lo hace uno del grupo vacunado con SO2 lo que indica que la protección del mutante *phoP*- DIM+ es similar a la actual vacuna BCG, mientras la vacunación con SO2, el doble mutante *phoP*- y DIM-, protege mejor en el modelo cobaya (Fig 13). A los 400 días sobreviven 3 cobayas del grupo vacunado con SO2 (fig 14a) mientras solo 1 cobaya vacunada con BCG (fig 14a y Fig 14 b) y *phoP*- DIM+ (fig 14b) sobrevive, lo que indica que la protección del mutante *phoP*- DIM+ es similar a BCG mientras la vacunación con SO2 el doble mutante *phoP*- y DIM-, protege mejor a los 400 días del experimento, siendo atribuido el efecto sorprendente de protección mayor que BCG no sólo a la mutación *phoP*- sino a la doble mutación de SO2 *phoP*- DIM-.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención hace referencia a un microorganismo aislado perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* caracterizado porque comprende la inactivación o delección:

a. del gen *phoP* y

25 b. del gen *fadD26* que evita la producción de DIM.

En una realización preferente de la invención el microorganismo aislado de la invención, se caracteriza porque la inactivación del gen *phoP* se realiza mediante la inactivación o delección del gen Rv0757. En una realización más preferente de la invención, el microorganismo aislado de la invención se caracteriza porque la inactivación de la producción de DIM se realiza mediante la delección o inactivación del gen Rv2930 (*fadD26*).

30 En una realización aún más preferente de la invención, el microorganismo aislado de la invención, se caracteriza porque comprende la delección o inactivación de los genes Rv2930 y Rv0757.

En otro modo de realización de la invención, el microorganismo aislado de la invención se caracteriza porque la especie del género *Mycobacterium* pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

35 Un segundo aspecto de la invención, hace referencia al proceso de elaboración del microorganismo aislado de la invención que comprende:

a. La inactivación o delección del gen *phoP*, de manera preferente la inactivación o delección del gen Rv0757 y

b. La inactivación o delección de un segundo gen que evita la producción de DIM, que es el gen Rv2930 (*fadD26*).

40 Un tercer aspecto de la invención hace referencia a una vacuna (de aquí en adelante vacuna de la invención) para inmunizar un individuo frente a los síntomas causados por la tuberculosis, en donde dicha vacuna comprende al menos un microorganismo aislado de la invención.

En una realización preferente de la invención, la vacuna además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.

45 Un cuarto aspecto de la invención hace referencia al proceso de elaboración de un medicamento, preferiblemente una vacuna, que comprende la incorporación de un microorganismo aislado de la invención en una dosis terapéuticamente efectiva a un medio adecuado para la administración en humanos o en animales y opcionalmente, adicionar excipientes farmacológicamente adecuados para la fabricación de vacunas.

Dicho medicamento es adecuado para el tratamiento del cáncer de vejiga, para el tratamiento o prevención de la tuberculosis, o como vector o adyuvante. De manera preferente, para inmunizar un individuo frente a los síntomas causados por la tuberculosis.

5 Un quinto aspecto de la invención hace referencia al uso del microorganismo aislado de la invención, para la elaboración de la vacuna de la invención, para la prevención y/o tratamiento de la tuberculosis en humanos o animales.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no implican la exclusión de otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para una persona experta en el arte, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

15 1.1.- *Extracción de la proteína e inmunoblotting.* Se obtuvieron anticuerpos policlonales contra la proteína PhoP que recibieron cuatro dosis de PhoP (0,5 mg), en las semanas 0, 4, 8, 12 y 16, respectivamente. Los anticuerpos anti-PhoP fueron detectados por el ensayo ELISA (ZEU-Immunotec Zaragoza, España). Los anticuerpos monoclonales contra ESAT-6 fueron facilitados amablemente por S. Cole [24]. Se prepararon extractos proteínicos de micobacterias libres de células a partir de cultivos precoces en fase-log que crecieron en caldo Middlebrook 7H9-ADC, siguiendo los procedimientos habituales [25]. Los extractos proteínicos de *M. tuberculosis* se filtraron a través de un filtro Millex-GP con un tamaño de poros de 0,22 μm (Millipore, Bedford, MA). Se recogió el filtrado del cultivo del *M. tuberculosis* H37Rv cultivado durante 5-6 semanas y las proteínas de filtrado se precipitaron con un 45% (p/v) de sulfato amónico. Se efectuó el análisis Western Blot siguiendo los procedimientos habituales. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo de cabra marcados con peroxidasa de rábano (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

25 1.2.- *Infección de ratones SCID con M. tuberculosis.* Los trabajos con ratones SCID se desarrollaron bajo el control del Comité de Atención a los Animales del Hospital Universitario "Germans Trias i Pujol", de acuerdo con las Leyes de la Unión Europea sobre protección de animales experimentales. Se obtuvieron ratones libres de patógenos específicos (*spf*) de la cepa SCID CB-17/Icr Ico de Charles River (Bagnex Cedex, Francia). Para infección por aerosol, los ratones se colocaron en la cámara de exposición de un aparato de infección transmitida por el aire (Glas-col Inc., Terre Haute, IN, EE.UU.). El compartimento del nebulizador se llenó con 7 ml de una suspensión de *M. tuberculosis* a fin de proporcionar una captación aproximada de 20 bacilos viables dentro de los pulmones. Se utilizaron diez ratones por cada grupo experimental. Para infección intravenosa, grupos de 7 ratones se infectaron con 200 μl de PBS que contenían dosis equivalentes a 2×10^5 , 2×10^4 y 2×10^3 de BCG viable y 5.4×10^6 , 5.4×10^5 y 5.4×10^4 de la cepa *M. tuberculosis phoP* viable a través de una vena lateral de la cola. La importancia en las diferencias de los tiempos de supervivencia entre ratones tratados se determinó con el uso del test de Mantel-Haenszel. Se efectuaron recuentos de viabilidad en diluciones en serie del homogeneizado, colocándose sobre agar Middlebrook 7H11 + OADC y examinándose su crecimiento al cabo de 3 semanas. Para análisis histológico, los tejidos se fijaron en solución salina tamponada con formol y se fijaron en parafina. Se cortaron secciones de cinco μm de grosor, coloreándose con el colorante de Ziehl-Neelsen.

40 1.3.- *Determinación de la activación de la inmunidad celular en ratones Balb/c después de vacunación subcutánea con SO2 de la presente invención y BCG.* Se sacrificaron grupos de cuatro ratones Balb/C en los días 7, 14, 21, 28, 45 y 60 post-vacunación subcutánea con 8×10^3 CFU de BCG (Phipps) o $2,5 \times 10^3$ CFU de la cepa SO2 de la presente invención. Se recogieron los bazo y se colocaron en 2 ml de medio RPMI y suero fetal de ternera al 10% (GIBCO. Invitrogen Corporation), que contenía 0,5 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington, NJ, EE.UU.), y 2U/ml de ADNasa (GIBCO), y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, con un 5% de CO2. A continuación se pasaron a través de un tamiz celular de 70 μm (Falcon, Becton Dickinson 70 μm Nailon 35-2350), se trituraron con el émbolo de una jeringuilla y se enjuagaron con medio. Se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y se eliminaron los glóbulos rojos con tampón para lisis [26]. Después de centrifugación y lavado con medio RPMI, las células se resuspendieron en tampón FACS (PBS 1X, pH 7,2, 1% BSA), y se contaron. El marcaje de la superficie celular se realizó a través de incubación de 10^6 células con 100 μl de anticuerpos monoclonales contra CD4-FITC o CD8-FITC, diluidos a razón 1:20 en PBS que contenía un 1% de BSA y un 0,1% de azida sódica durante 20 min a 4 °C, y se analizaron con un citómetro FACScan. La cepa *M. tuberculosis* H37Rv se cultivó en medio 7H9 de Middlebrook (Difco Laboratories) complementado con OADC (Difco Laboratories). Al cabo de 1 mes de cultivo, se separó la masa bacteriana y se recogió el filtrado del cultivo. Los antígenos de dicho filtrado se precipitaron con un 45% (p/v) de sulfato amónico, se lavaron y se volvieron a disolver en PBS. Para estimular las células, 1×10^6 células del bazo se volvieron a suspender en 100 μl de medio RPMI por pocillo de cultivo, y se incubaron con 10 μg de antígenos de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, suspendidos en 100 μl de PBS durante 72 horas a 37 °C con un 5% de CO2.

Las células y el medio de cultivo se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y, después de contar y comprobar la viabilidad, $2,5 \times 10^5$ células por tubo se marcaron en la superficie de las células CD4+ o CD8+ tal como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, las células se volvieron a suspender y se incubaron durante 20 min a 4 °C en 0,1% de saponina disuelta en PBS. La IFN- γ intracelular se detectó por incubación de la célula durante 20 min a 4 °C en la oscuridad, con 100 μ l de una dilución al 1/20 de anti-IFN- γ monoclonal marcada con ficoeritrina (PE). Las células se fijaron con 100 μ l de paraformaldehído al 4% diluido en PBS. Las muestras se analizaron a los 20 minutos utilizando un citómetro FACScan. Los controles de los isotipos fueron Ab-FITC (dilución 1:20) +Ab-PE (dilución 1:20).

1.4.- *Eficacia protectora de SO2 de la presente invención en los ratones Balb/c.* Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas en el Laboratorio de Alta Seguridad P3 de la Instalación de Animales del Instituto Pasteur de París, de acuerdo con las directivas de la Unión Europea para la protección de animales experimentales. Grupos de ratones Balb/c (7 por grupo) fueron vacunados por vía subcutánea en la base de la cola, con 10^7 CFUs de la cepa SO2 de la presente invención o BCG (Pasteur). A las 8 semanas después de la vacunación, se aplicaron a todos los ratones, por vía intravenosa, $2,5 \times 10^5$ CFU de *M. tuberculosis* H37Rv. Cuatro semanas después de la inyección, fueron sacrificados los ratones. Se efectuaron recuentos de viabilidad en diluciones en serie del homogeneizado, cultivado en caldo Middlebrook 7H11 + agar OADC, y se examinó a las 3 semanas el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv de la cepa SO2 de la presente invención sobre la base del fenotipo de resistencia a la kanamicina de esta última cepa.

1.5.- *Eficacia protectora de SO2 de la presente invención en cobayas.* El trabajo experimental con cobayas se desarrolló de acuerdo con las Leyes del RU para experimentación con animales, siendo aprobado por un comité local de ética de la Administración de Protección Sanitaria, Porton Down, RU. Se obtuvieron cobayas Dunkin-Hartley hembras de proveedores comerciales acreditados (Ministerio del Interior del RU) (David Hall, Burton-on-Trent, RU o Harlan Ltd UK, Bicester, RU), y se criaron con un aislamiento completo. Los resultados presentados en la figura 6 muestran que la cepa SO2 confiere una mayor protección que BCG. Los resultados presentados en la figura 13 y 14 muestran que esta protección sorprendente del mutante SO2 es debida a su doble fenotipo DIM-/PhoP-.

1.6.- *Aplicación de dosis baja.* Grupos de 6 cobayas fueron vacunados por vía subcutánea en la nuca con 250 μ l de: 5×10^4 CFU de BCG Pasteur; 5×10^4 CFU de SO2 de la presente invención; o bien solución salina. Los animales se mantuvieron en reposo durante un período de 12 semanas antes del ataque con aerosol, utilizándose un aparato de Henderson contenido tal como se ha descrito anteriormente [27]. Se generaron aerosoles de partículas finas de *M. tuberculosis* H37Rv, con un diámetro medio de 2 μ m, (rango de diámetro: de 0,5–7 μ m), utilizando un nebulizador de Collison, aplicado directamente al hocico del animal. El aerosol se generó a partir de una suspensión en agua que contenía 2×10^6 CFU/ml a fin de obtener una dosis inhalada retenida calculada de aproximadamente 10–50 CFU/pulmón. Cuatro semanas después de la aplicación se evaluó la protección. Los animales se sacrificaron por sobredosis peritoneal de pentobarbital sódico. Se retiró asépticamente tejido del bazo y pulmón (los lóbulos craneal izquierdo y medio, lóbulo medio derecho y lóbulos caudales derechos), y se colocaron en recipientes estériles. El material se almacenó a – 20° C, y se preparó a continuación a fin de contar el número de bacterias. Los tejidos se homogeneizaron en 10 ml (pulmón) o 5 ml (bazo) de agua estéril desionizada, utilizando un sistema macerador de cuchillas giratorias (Ystral). Se realizaron recuentos de células viables en diluciones en serie del homogeneizado, cultivadas en Middlebrook 7H11 + agar OADC, y se examinaron a las 3 semanas el crecimiento del *M. tuberculosis*. Los datos fueron transformados en \log_{10} para su análisis y los números de *M. tuberculosis* viables de cada grupo de vacuna se compararon con el grupo de control con solución salina por el test de la “t” de Student.

1.7.- *Ensayo de protección en cobayas tras infección de dosis elevada de M. tuberculosis.* Grupos de 6 cobayas se vacunaron por vía subcutánea con 5×10^4 CFU de SO2 de la presente invención o BCG (Danish 1331) 10 semanas antes de la aplicación de aerosol con *M. tuberculosis*. La aplicación del aerosol se realizó como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizándose una suspensión de 5×10^7 CFU/ml a fin de proporcionar a los pulmones alrededor de 500 CFU. Después de la aplicación, los animales fueron alojados al nivel de contención 3 (del ACDP), se controlaron regularmente los cambios de peso y se sacrificaron humanamente 180 días después de la aplicación o en el punto final humano (20% de pérdida de peso corporal máximo). La recogida *post mortem* y el tratamiento de las muestras se realizaron como se ha descrito anteriormente, a excepción de que la consolidación pulmonar se midió con el uso de análisis por imágenes de secciones de tejido pulmonar fijado en formalina, coloreado con Hematoxylina y Eosina (H+E). La supervivencia de los animales se comparó con el uso de los cálculos de supervivencia de Kaplan Meier, utilizándose el análisis de distribución Log Rank para identificar las diferencias estadísticamente significativas. Los datos sobre CFU y consolidación de las lesiones se analizaron por el ANOVA, utilizando comparaciones en pares de Fisher, a fin de comparar los valores medios de los grupos.

Ejemplo 2. Caracterización del *M. tuberculosis* phoP.

La prueba de la intervención del gen *phoP* en la regulación global de los circuitos genéticos de las micobacterias se obtuvo por la observación de los cambios en el tamaño del bacilo y las propiedades de formación de cordones de las células en crecimiento que alojaban el gen *phoP* inactivado. Dadas las propiedades clave de los antígenos secretados como determinantes la protección contra la tuberculosis, deseábamos determinar si los efectos

pleiotrópicos de la mutación del gen *phoP* se extendían hasta influir en la síntesis del principal antígeno inmunodominante: el ESAT-6. En la cepa SO2, la BCG y la MT103 se efectuó el análisis *Western blot*, con el uso de anticuerpos obtenidos contra la proteína PhoP y ESAT-6. Los resultados demostraron claramente que la proteína PhoP se expresaba constitutivamente en las cepas MT103 del *M. tuberculosis* y de BCG, mientras que aparecía totalmente ausente en la cepa SO2 de la presente invención. Por el contrario, los niveles de expresión del ESAT-6 en el sobrenadante de cultivos de la cepa SO2 fueron similares a los detectados en la cepa parental MT103 y, como era de esperar, no se detectó la proteína ESAT-6 en BCG.

Ejemplo 3. Supervivencia de ratones infectados con las cepas de la presente invención y BCG.

La supervivencia de los ratones SCID inmuno-comprometidos se evaluó después de infección por medio aerosol (alrededor de 20 CFU) con la cepa MT103, la SO2 y la SO2 complementada con el gen *phoP* (SO2 + pSO5) [23]. Todos los ratones infectados con la SO2 sobrevivieron durante más de 245 días. Por el contrario, todos los ratones SCID infectados con la MT103 o la SO2-pSO5 del *M. tuberculosis* complementada habían muerto a los 62 días después de la infección, lo que indica una recuperación de la virulencia de la cepa complementada (Fig. 2a).

La atenuación de la cepa SO2 se comparó igualmente con el BCG en ratones SCID después de administración por vía intravenosa. A grupos de ratones SCID se les inoculó una serie de dosis (2×10^5 , 2×10^4 y 2×10^3 CFU) de BCG Pasteur o de la cepa SO2 ($5,4 \times 10^6$, $5,4 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^4$ CFU) a través de una vena lateral de la cola. La coloración histológica de los macrófagos alveolares infectados de un subgrupo de ratones sacrificados tres semanas después de la infección, reveló un menor número de bacilos ácido-alcohol resistentes en los pulmones de ratones infectados con la cepa SO2 del *M. tuberculosis*, comparados con el BCG. Todos los ratones inoculados con las dosis mayores de BCG (2×10^5 CFU) habían muerto 92 días después de la infección (tiempo medio de supervivencia: $89 \pm 3,5$ días) (Fig. 2b). Por el contrario, todos los ratones infectados con la dosis más alta de SO2 ($5,4 \times 10^6$ CFU) sobrevivían al cabo de 120 días (Fig. 2b). En el momento de la muerte, las cargas bacterianas de los pulmones de ratones infectados con BCG, 2×10^5 CFU, eran al menos 100 veces superiores, si se comparaban con los ratones infectados con SO2 con $5,4 \times 10^6$ CFU.

Ejemplo 4 Respuestas cuantitativas de CD4+ y CD8+ de ratones Balb/c vacunados

Con el fin de comparar la activación de la inmunidad celular inducida por vacunación con SO2 de la presente invención y BCG, los días 7, 14, 30, 45 y 60 después de la vacunación se recogieron suspensiones de células del bazo de grupos de al menos cuatro ratones Balb/c vacunados por vía subcutánea con la cepa SO2 de la presente invención y BCG Phipps, y se determinaron las proporciones relativas de células CD4+ y CD8+ por citofluorometría (Fig. 3). La vacunación con SO2 indujo un número significativamente superior de células CD4+ a los 14 días de la vacunación, en comparación con la vacunación con BCG, y un número significativamente superior de células CD8+ al cabo de 45 días. Estos esplenocitos se estimularon con antígenos totales derivados de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. A los 3 días, las poblaciones de linfocitos se analizaron por citometría de flujo, combinándose anticuerpos específicos para la detección de las células CD4+/CD8+ y la síntesis intracelular de IFN- γ . La vacunación con SO2 indujo una proporción significativamente superior de células productoras de CD4+/IFN- γ a los 45 días de la vacunación, comparado con el BCG (Fig. 3). A partir de un determinado punto en el tiempo, la proporción de células que produjeron CD8+/ IFN- γ fue siempre superior en el grupo de SO2 (significativamente diferente el día 14).

Ejemplo 5 Inmunidad protectora generada por SO2 de la presente invención en ratones Balb/c.

Una vez comprobado que la cepa SO2 de la presente invención quedaba atenuada en los ratones SCID, nos interesaba determinar si la disminución de virulencia observada confería algún tipo de propiedad protectora a la cepa mutante. Vacunamos subcutáneamente a ratones Balb/c con la cepa SO2 de la presente invención o con BCG (Pasteur). Ocho semanas después de la vacunación, a todos los ratones se les inyectó por vía intravenosa $2,5 \times 10^5$ CFU de *M. tuberculosis* H37Rv. Los ratones se sacrificaron a las 4 semanas después de la inyección. Se determinaron los niveles de protección evaluándose los números de *M. tuberculosis* H37Rv viables recuperados de los pulmones y el bazo de ambos grupos de ratones (Fig. 4). Ambas vacunas confirieron niveles similares pero significativos de protección, si se comparaban con los controles tratados con solución salina ($p < 0,05$). La inhibición del crecimiento del *M. tuberculosis* H37Rv se registró tanto en los pulmones como en el bazo, con reducciones de aproximadamente $1,5 \log_{10}$ y $1,3 \log_{10}$ CFU, respectivamente.

Ejemplo 6 Inmunidad protectora de SO2 de la presente invención en cobayas.

Los resultados obtenidos en los experimentos de vacunación de ratones indicaron que la atenuación de la cepa SO2 de la presente invención le otorgaba características de vacuna similares a BCG Pasteur. No obstante, se admite por lo general que las cobayas constituyen un modelo más relevante de tuberculosis humana, con muchas semejanzas en cuanto al avance y patología de la enfermedad. Así pues, este modelo animal es un sistema más apropiado para evaluar la eficacia de una vacuna. Con el fin de investigar la eficacia protectora de la cepa SO2 de la presente

invención, realizamos experimentos que incluían la aplicación a animales vacunados de aerosol a dosis bajas (10-50 CFU) y a dosis elevadas (500 CFU). Grupos de seis cobayas fueron vacunadas por vía subcutánea con SO₂ de la presente invención o con BCG. Diez semanas después de la vacunación, a todas las cobayas se les administraron dosis inhaladas de *M. tuberculosis* H37Rv.

5 Los animales que recibieron la dosis menor fueron sacrificados a las 4 semanas, y se contaron las cargas bacterianas en pulmones y bazo. La eficacia protectora se determinó comparándose los números de *M. tuberculosis* H37Rv viables recuperados de los órganos de cobayas en cada grupo de tratamiento. En este experimento, la reducción de las CFU en pulmones y bazo fue significativamente diferente entre los animales de control no vacunados y los vacunados con BCG o SO₂ de *M. tuberculosis* (p=0,005). No obstante, entre los grupos vacunados no se halló diferencia significativa alguna (Fig. 5).

10 Las cobayas que recibieron la dosis elevada fueron sacrificadas 180 días después de la aplicación o cuando se apreció 20% de pérdida de peso corporal. Se determinaron los niveles de protección comparándose los tiempos de supervivencia de las cobayas de cada grupo de tratamiento. El avance del desarrollo de las lesiones se estudió igualmente en las cobayas vacunadas /infectadas, y se comparó con el observado en los animales no vacunados / infectados. Durante la fase del experimento posterior a la inhalación, se sacrificaron todas las cobayas no vacunadas y cuatro de las cobayas vacunadas con BCG en el punto final humano, antes del punto final de tiempo (180 días) debido a enfermedad grave y progresiva (Fig. 6a). Por el contrario, todas las cobayas vacunadas con la cepa SO₂ de la presente invención sobrevivieron mientras duró el estudio. Las cobayas vacunados con la cepa SO₂ de la presente invención sobrevivieron significativamente más que las vacunados con BCG (p = 0,018), las cuales, a su vez, sobrevivieron significativamente más tiempo que las cobayas de control, tratadas con solución salina (p = 0,0049). Además, las cobayas vacunadas con la cepa SO₂ aumentaron de peso y no presentaron ningún signo visible ni clínico de enfermedad.

15 La extensión de la enfermedad pulmonar, medida por la consolidación pulmonar total, fue también diferente entre los grupos de tratamiento. El nivel más alto de avance de la enfermedad se observó, como era de prever, en las cobayas no vacunados, midiéndose en este grupo de animales un porcentaje medio de consolidación del 76% (Fig. 6b, 6c). La coalescencia de granulomas fue también pronunciada en las cobayas vacunadas con BCG, con una consolidación media del 70% medida en los pulmones. Por el contrario, se observó una menor consolidación (aproximadamente el 50%) en las cobayas vacunados con SO₂ de la presente invención, siendo esta consolidación significativamente reducida (p<0.05) tanto con los animales no vacunados como con los vacunados con BCG (Fig. 6c). Esta disminución de la gravedad de la enfermedad se reflejó igualmente en los recuentos bacterianos de homogeneizados de pulmón y bazo. En los grupos vacunados se observó una diferencia en los niveles de inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en ambos órganos. Los números de CFU recuperados de las cobayas vacunadas con SO₂ se redujeron en más de $1 \times \log_{10}$, en comparación con los de cobayas vacunados con BCG, y esta reducción fue estadísticamente significativa (p <0,05) en el bazo (Fig 6d). Estos datos demostraron que en la cepa SO₂ de la presente invención fue mejor que la BCG a la hora de conferir una mayor supervivencia a las cobayas infectadas, reduciendo la gravedad de la enfermedad en los pulmones y evitando que la infección se extendiera al bazo.

Ejemplo 7 Atenuación de SO₂ de la presente invención es debida a la doble mutación PhoP- DIM-.

40 Los estudios de infección en ratón Balb/C por vía intravenosa de la cepa SO₂ (phoP-DIM-) en comparación con la cepa silvestre MT103 y la cepa complementada con phoP (SO₂ + pSO5) mostraron que la atenuación de infección con SO₂ en ratón BalbC por vía intravenosa no se restaura al complementar con phoP. La reducción de colonias (CFU) tanto en bazo (7a bazo) como en pulmón (7b pulmón), medidas a las 3 y 6 semanas, no se restauran en la cepa complementada siendo no virulenta en ratón inmunocompetente, sugiriendo estos experimentos que la sorprendente atenuación podría deberse a una segunda mutación adicional (figura 7).

45 Los estudios de los lípidos de diferentes cepas de *M. tuberculosis* por cromatografía en capa fina mostraron que la cepa SO₂ no produce DIM y este hecho es independiente de la mutación phoP (figura 8).

50 Para demostrar que SO₂ no es tóxico seis cobayas fueron inoculadas con 50 veces la dosis de vacuna. La supervivencia fue del 100% a los 6 meses de duración del experimento. En todos los animales se observó un aumento de peso durante los 6 meses, indicando la no toxicidad de la cepa SO₂ (Y= peso en gramos y semana de infección. X= tiempo en semanas) Fig 12.

55 También se estudió la sensibilidad a fármacos antituberculosos. Se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) de los fármacos antituberculosis Etambutol, Isoniacida, Rifampicina y Estreptomycin frente a las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, MT103 (tipo silvestre) como control y la cepa SO₂. Los valores (microgramos/ml) indican que tras la inactivación de gen *phoP* la cepa candidata a vacuna SO₂ conserva la sensibilidad a los fármacos más frecuentes utilizados clínicamente contra la tuberculosis.

	Etambutol	Isoniacida	Rifampicina	Estreptomina
H37Rv	2	0,5	< 0,004	<0,5
MT103	2	0,5	< 0,004	<0,5
SO2	2	0,25	< 0,004	<0,5

5 Los estudios de la atenuación en ratones BalbC inoculados por vía intratraqueal mostraron que con la cepa de *M. tuberculosis* DIM- (1A29) a las 20 semanas habían sobrevivido el 50% de los ratones. Todos los animales inoculados con SO2 (mutante *phoP*- y DIM-) sobrevivieron sorprendentemente durante las 20 semanas del experimento (figura 11).

Ejemplo 8 Protección de SO2 de la presente invención es debida a la doble mutación PhoP- DIM-.

10 Se estudió la protección en cobayas vacunados e infectados por aerosol con *M. tuberculosis* H37Rv. La supervivencia en cobayas a los 300 días. Tras la vacunación por vía subcutánea los animales son infectados con una cepa de *M. tuberculosis* virulenta (H37Rv) con dosis alta para estudiar la supervivencia. A los 60 días las 6 cobayas no vacunadas mueren, mientras los grupos vacunados con SO2, *phoP*- y BCG sobreviven. A los 300 días de la infección 3 cobayas vacunadas con BCG y *phoP*- mueren, en comparación con solo una del grupo vacunado con SO2, lo que indica que la protección del mutante *phoP* es similar a la actual vacuna BCG, mientras que la vacunación con SO2, el doble mutante *phoP*- y DIM protege mejor en el modelo cobaya (Figura 13).

15 Estos estudios de protección en cobayas tuvieron una duración de 400 días, sin embargo las 6 cobayas no vacunadas murieron a los 60 días. A los 400 días de la infección sobreviven 3 cobayas del grupo vacunado con SO2 (fig 14a), mientras que solo 1 cobaya vacunada con BCG (fig 14a y Fig 14 b) y *phoP*- (fig 14b) sobrevive, lo que indica nuevamente que la protección del mutante *phoP* es similar a BCG, mientras que la vacunación con SO2, el doble mutante *phoP*- y DIM protege sorprendentemente mejor a los 400 días del experimento.

20 Ejemplo 9. Construcción del candidato a vacuna contra la tuberculosis basado en la mutación por delección del gen *fadD26*.

Las cepas de *M. tuberculosis* utilizadas para la construcción del mutante por delección del gen *fadD26* (Δ *fadD26*) son SO2, que contiene el gen *phoP* inactivado mediante la inserción de un casete de resistencia a kanamicina, y la cepa clínica MT103.

25 1. Construcción de los plásmidos

1.1 Clonaje del gen *fadD26*, que está implicado en la síntesis de DIM. El gen *fadD26* fue amplificado por PCR, a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando los cebadores *fadD26Fw* (SEQ ID NO:1) y *fadD26Rv* (SEQ ID NO:2). El producto de PCR fue insertado en el vector pGEM-T Easy (Promega), para construir el plásmido pAZ1.

30 1.2 Delección del gen *fadD26* e inserción del casete de resistencia a higromicina. Un fragmento *Bam*HI-*Eco*RV de pWM27 (Málaga *et al.* 2003), que contiene el casete *res-Ωhyg-res* (los sitios *res*, reconocidos por la resolvasa $\gamma\delta$, permitirán en un segundo paso eliminar el marcador de resistencia), fue insertado entre los sitios *Bam*HI-*Eco*RV de *fadD26* en pAZ1 para construir pAZ3.

35 1.3 Construcción del vector suicida para la inactivación del gen por recombinación homóloga. El plásmido pAZ3 fue digerido con *Xho*I liberando el inserto *fadD26::Ωhyg* que se incorporó al vector pJQ200X, linealizado con la misma enzima. El plásmido final fue nombrado pAZ5.

2. Construcción de las cepas de *M. tuberculosis* DIM-

2.1 El plásmido pAZ5 fue introducido en las cepas de *M. tuberculosis* SO2 y MT103.

40 2.2 Selección de los recombinantes simples. Cultivo en higromicina (20 μ g/ml) de las bacterias que han incorporado el plásmido y comprobación por su resistencia a gentamicina (10 μ g/ml).

2.3 Selección de los dobles recombinantes. Cultivo en sacarosa 2% (Pelicic *et al.* 1997) e higromicina de los recombinantes simples y comprobación para su sensibilidad a gentamicina.

3. Eliminación del marcador de resistencia a antibiótico de la mutación $\Delta fadD26K$.

3.1 Para eliminar el casete $res-\Omega hyg-res$ y producir la mutación sin marcador de resistencia a antibiótico, el plásmido pWM19, que contiene la resolvasa $\gamma\delta$, se introduce y selecciona por resistencia a gentamicina. Posteriormente, el plásmido se elimina incubando a 39 °C en sacarosa 2% (Málaga *et al.* 2003).

5 Ejemplo 2.2.- La cepa de *M. tuberculosis* utilizada para la construcción del doble mutante por delección $\Delta phoP \Delta fadD26$ es MT103 $\Delta fadD26$.

4. Construcción de los plásmidos

10 4.1 Clonaje del gen *phoP*. El gen *phoP* fue amplificado por PCR, a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando los cebadores *phoPF* (SEQ ID NO:3) y *phoPR* (SEQ ID NO:4). El producto de PCR fue insertado en el vector pGEM-T Easy (Promega), para construir el plásmido pAZ11.

4.2 Delección del gen *phoP* e inserción del casete de resistencia a kanamicina. Un fragmento *BamHI-EcoRV* de pCG122 (Málaga *et al.* 2003), que contiene el casete $res-\Omega km-res$, fue insertado entre los sitios *BclI-EcoRV* de *phoP* en pAZ11 para construir pAZ13.

15 4.3 Construcción del vector suicida para la inactivación del gen por recombinación homóloga. El plásmido pAZ13 fue digerido con *XhoI* liberando el inserto *phoP::\Omega km* que se incorporó al vector pJQ200X, linealizado con la misma enzima. El plásmido final fue nombrado pAZ15.

5. Construcción de la cepa de *M. tuberculosis* doble mutante $\Delta phoP \Delta fadD26$. 5.1. El plásmido pAZ15 será introducido en la cepa de *M. tuberculosis* MT103 $\Delta fadD26$.

20 5.2 Selección de los recombinantes simples. Cultivo en kanamicina (20 $\mu g/ml$) de las bacterias que han incorporado el plásmido y comprobación para su resistencia a gentamicina (10 $\mu g/ml$).

5.3 Selección de los dobles recombinantes. Cultivo en sacarosa 2% (Pelicic *et al.* 1997) y kanamicina de los recombinantes simples y comprobación para su sensibilidad a gentamicina.

6. Eliminación del marcador de resistencia a antibiótico de la mutación $\Delta phoP$.

25 6.1 Para eliminar el casete $res-\Omega km-res$ y producir la mutación sin marcador de resistencia a antibiótico, el plásmido pWM19, que contiene la resolvasa $\gamma\delta$, será introducido y seleccionado por resistencia a higromicina (20 $\mu g/ml$). Posteriormente, el plásmido será eliminado incubando a 39 °C en sacarosa 2% (Málaga *et al.* 2003).

Referencias

- 1 WHO. Global Report tuberculosis. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. World Health Organization, Geneva, 2005. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html.
- 30 2 WHO/IUATLD. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Report no. 3: prevalence and trends. WHO/IUATLD. Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002. World Health Organization and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Geneva, 2004. http://www.who.int/tb/publications/who_htm_tb_2004_343/en/index.html.
- 3 Young, D.B. Building a better tuberculosis vaccine. *Nat Med* 2003, 9(5), 503-504.
- 35 4 Fine, P.E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995, 346(8986), 1339-1345.
- 5 Behr, M.A. BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2002, 2(2), 86-92.
- 6 Pym, A.S., Brodin, P., Majlessi, L. *et al.* Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003, 9(5), 533-539.
- 40 7 Young, D.B. Current tuberculosis vaccine development. *Clin Infect Dis* 2000, 30 Suppl 3, S254-256.
- 8 Orme, I.M. Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: A comprehensive review. *Vaccine* 2006, 24(1), 2-19.

- 9 Kaufmann, S.H. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000, 6(9), 955-960.
- 10 Britton, W.J. & Palendira, U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 2003, 81(1), 34-45.
- 11 Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R., Jr., Gicquel, B. & Guilhot, C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(20), 10955-10960.
- 5 12 Bardarov, S., Kriakov, J., Carriere, C. *et al.* Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(20), 10961-10966.
- 13 Clark-Curtiss, J.E. & Haydel, S.E. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003, 57, 517-549.
- 10 14 Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, 393(6685), 537-544.
- 15 15 Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B. & Guilhot, C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999, 34(2), 257-267.
- 16 Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M. & Jacobs, W.R., Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999, 402(6757), 79-83.
- 15 17 Sambandamurthy, V.K., Wang, X., Chen, B. *et al.* A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002, 8(10), 1171-1174.
- 18 Smith, D.A., Parish, T., Stoker, N.G. & Bancroft, G.J. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 2001, 69(2), 1142-1150.
- 20 19 Groisman, E.A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 2001, 183(6), 1835-1842.
- 20 Fields, P.I., Groisman, E.A. & Heffron, F. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 1989, 243(4894 Pt 1), 1059-1062.
- 21 Soto, C.Y., Menendez, M.C., Perez, E. *et al.* IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 2004, 42(1), 212-219.
- 25 22 Gonzalo Asensio, J., Maia, C., Ferrer, N.L. *et al.* The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2005.
- 23 Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B. & Martin, C. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 2001, 41(1), 179-187.
- 30 24 Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S.T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002, 46(3), 709-717.
- 25 Sambrook, J.a.R., DW. *Molecular Cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- 35 26 Arriaga, A.K., Orozco, E.H., Aguilar, L.D., Rook, G.A. & Hernandez Pando, R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002, 128(2), 229-237.
- 27 Williams, A., Davies, A., Marsh, P.D., Chambers, M.A. & Hewinson, R.G. Comparison of the protective efficacy of bacille calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Clin Infect Dis* 2000, 30 Suppl 3, S299-301.
- 40 28 Hondalus, M.K., Bardarov, S., Russell, R., Chan, J., Jacobs, W.R., Jr. & Bloom, B.R. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000, 68(5), 2888-2898.
- 29 Horwitz, M.A., Lee, B.W., Dillon, B.J. & Harth, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(5), 1530-1534.

- 30 Baldwin, S.L., D'Souza, C., Roberts, A.D. *et al.* Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun* 1998, 66(6), 2951-2959.
- 5 31 Horwitz, M.A., Harth, G., Dillon, B.J. & Maslesa-Galic, S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(25), 13853-13858.
- 32 Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P. *et al.* Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome ADN microarray. *Science* 1999, 284(5419), 1520-1523.
- 10 33 Mollenkopf, H.J., Kursar, M. & Kaufmann, S.H. Immune Response to Postprimary Tuberculosis in Mice: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin Induce Equal Protection. *J Infect Dis* 2004, 190(3), 588-597.
- 34 Sampson, S.L., Dascher, C.C., Sambandamurthy, V.K. *et al.* Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infect Immun* 2004, 72(5), 3031-3037.
- 15 35 Horwitz, M.A. & Harth, G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2003, 71(4), 1672-1679.
- 36 Brandt, L., Skeiky, Y.A., Alderson, M.R. *et al.* The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infect Immun* 2004, 72(11), 6622-6632.
- 20 37 Wiegshaus, E.H., McMurray, D.N., Grover, A.A., Harding, G.E. & Smith, D.W. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. 3. Relevance of microbial enumeration to acquired resistance in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1970, 102(3), 422-429.
- 38 Williams, A., Hatch, G.J., Clark, S.O. *et al.* Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005, 85(1-2), 29-38.
- 25 39 McShane, H., Pathan, A.A., Sander, C.R. *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004, 10(11), 1240-1244.
- 40 Kamath, A.T., Fruth, U., Brennan, M.J. *et al.* New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine* 2005, 23(29), 3753-3761

LISTADO DE SECUENCIAS.

- 30 <110> Universidad de Zaragoza
- <120> Vacuna contra la tuberculosis
- <130> PCT1513.3
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.4
- 35 <210> 1
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 40 <221> misc_feature

<223> Cebador fadD26Fw
 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (1) .. (24)

5 <223> Cebador fadD26Fw
 <400> 1
 ctcgagttct ctatccgtgt attc 24
 <210> 2
 <211> 20

10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (1) .. (20)

15 <223> Cebador fadD26Rv
 <400> 2
 ctcgaggttg gtcttgacag 20
 <210> 3
 <211> 28

20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (1) .. (28)

25 <223> Cebador phoPF
 <400> 3
 aatctagatc aagcatcagc cgaggtac 28

ES 2 433 518 T3

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<400> 4

5 aatctagaga tcacccgaac gtagaacc 28

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo aislado perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* obtenido mediante la inactivación o la delección de:
 - a) el gen *phoP*; y
 - 5 b) un segundo gen que evita la producción de DIM, en donde dicho gen es el gen *fadD26*.
2. Microorganismo aislado según la primera reivindicación, en donde el *gen phoP* está inactivado.
3. Procedimiento para construir el microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende
 - a) la inactivación o delección del gen *phoP*; y
 - 10 b) la inactivación o delección de un segundo gen que evita la producción de DIM, en donde dicho gen es el gen *fadD26*.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en donde el gen *phoP* está inactivado.
5. Vacuna para la inmunización contra o para la prevención de síntomas causados por la tuberculosis, que comprende un microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15 6. Vacuna de acuerdo con la reivindicación anterior, que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. Proceso para la preparación de la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 para inmunizar contra o prevenir los síntomas causados por la tuberculosis, que comprende al menos:
 - a) Incorporar un microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 a un medio adecuado para su administración en humanos o animales en una dosis terapéuticamente efectiva y
 - 20 b) Opcionalmente adicionar excipientes farmacológicamente adecuados para la producción de vacunas.
8. Medicamento que comprende el microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
9. Medicamento que comprende el microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso como vacuna.
- 25 10. Medicamento según la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga.
11. Medicamento según la reivindicación 8 o 9 para su uso en el tratamiento o prevención de la tuberculosis.
12. Medicamento según la reivindicación 8 o 9 para su uso como vector o adyuvante.
13. Uso del microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para la elaboración de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, para la prevención o inmunización frente a la tuberculosis en
30 humanos o animales.

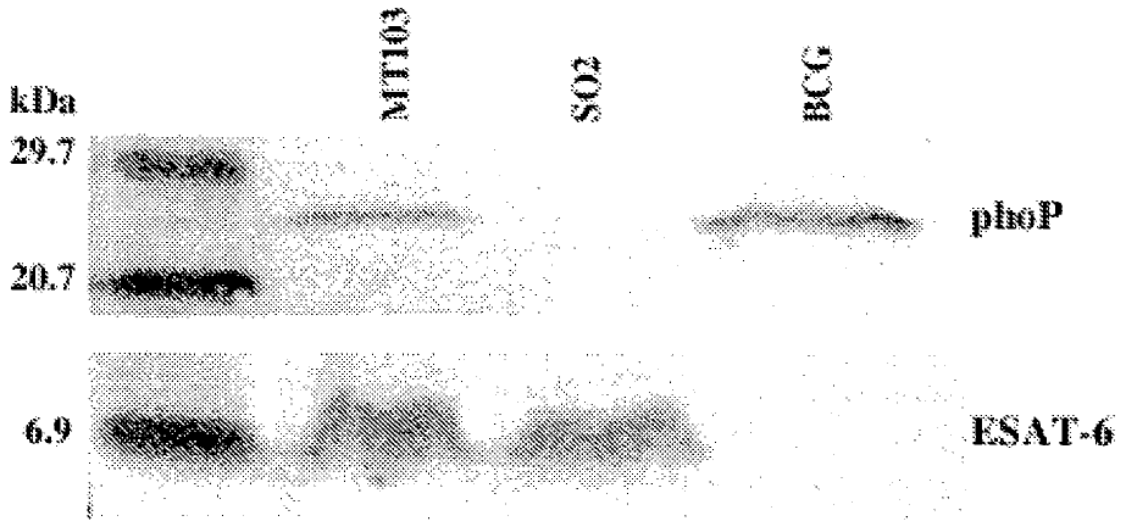


Fig. 1

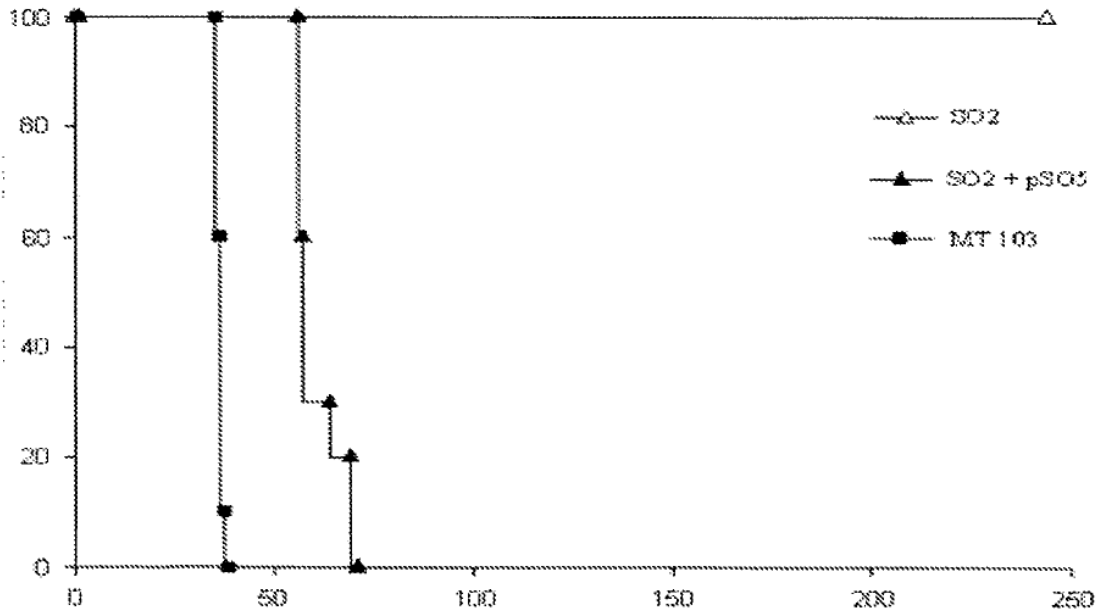


Fig. 2a

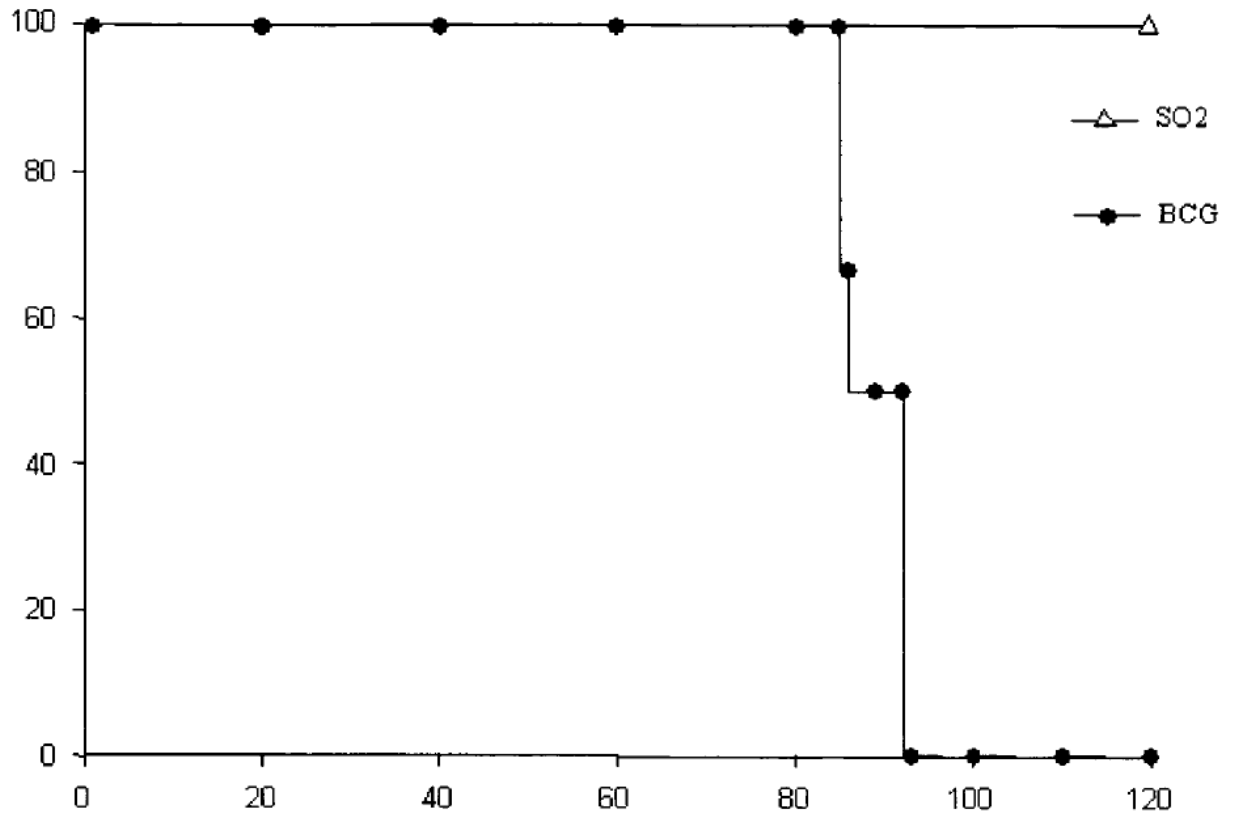


Fig. 2b

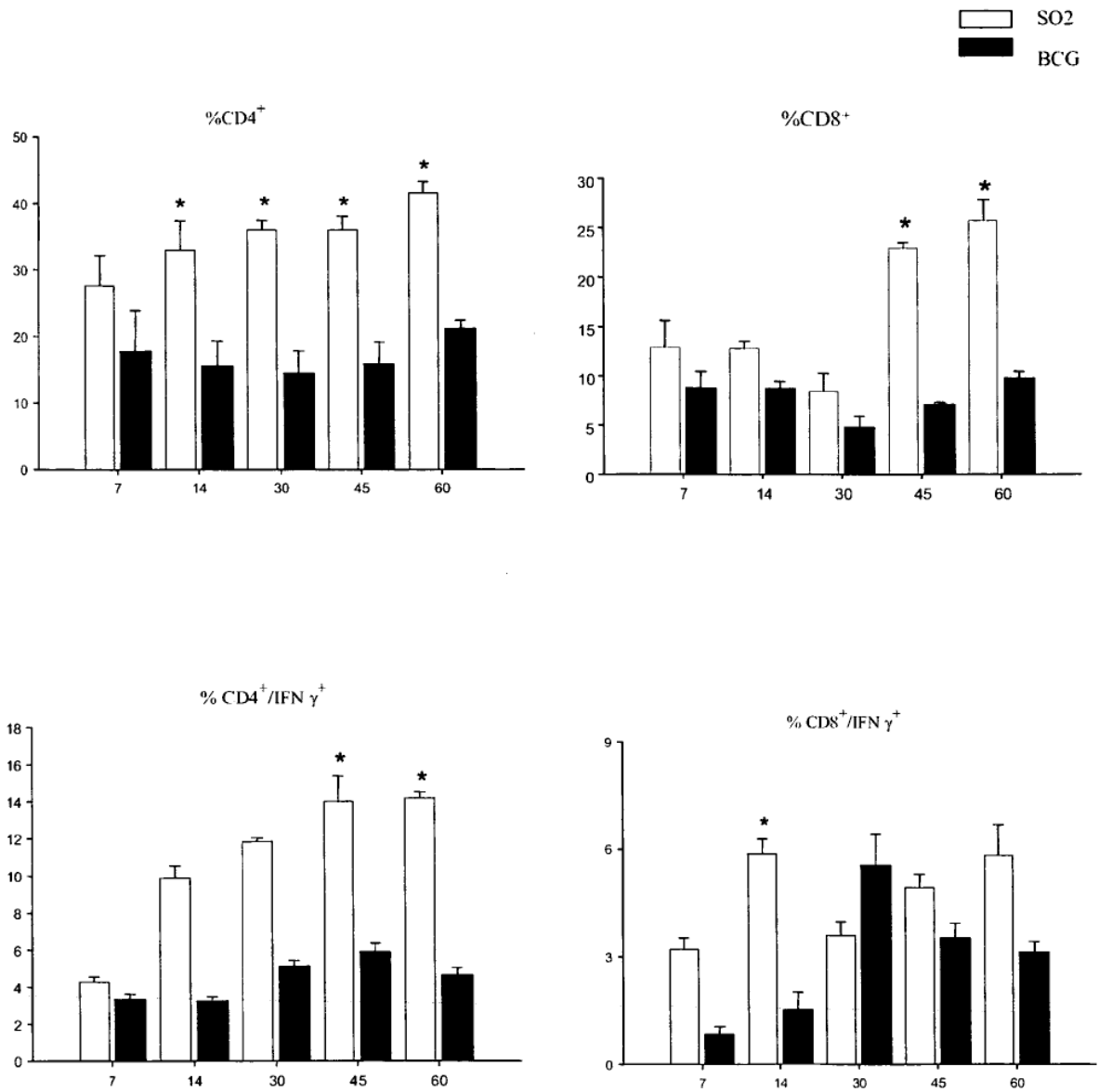


Fig. 3

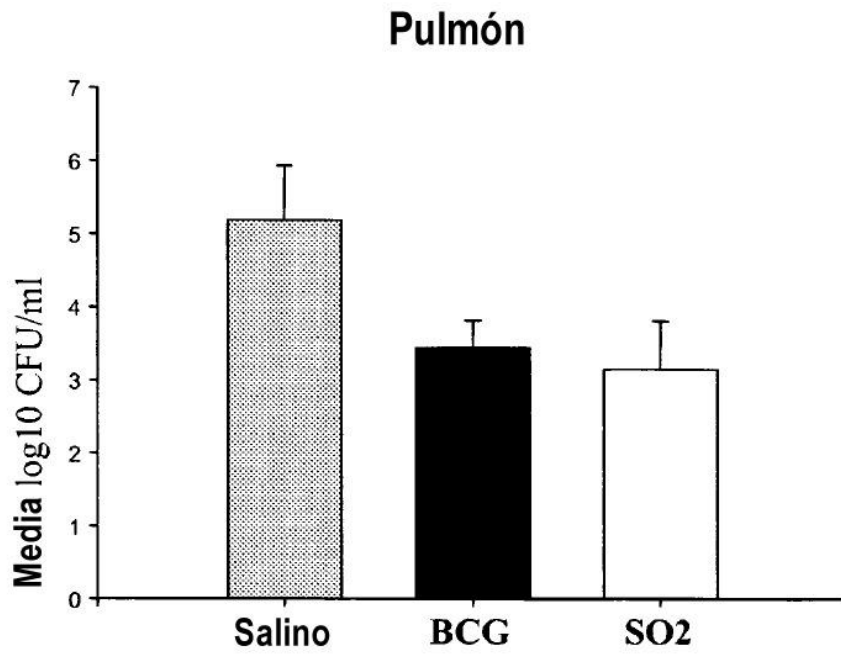


Fig. 4a

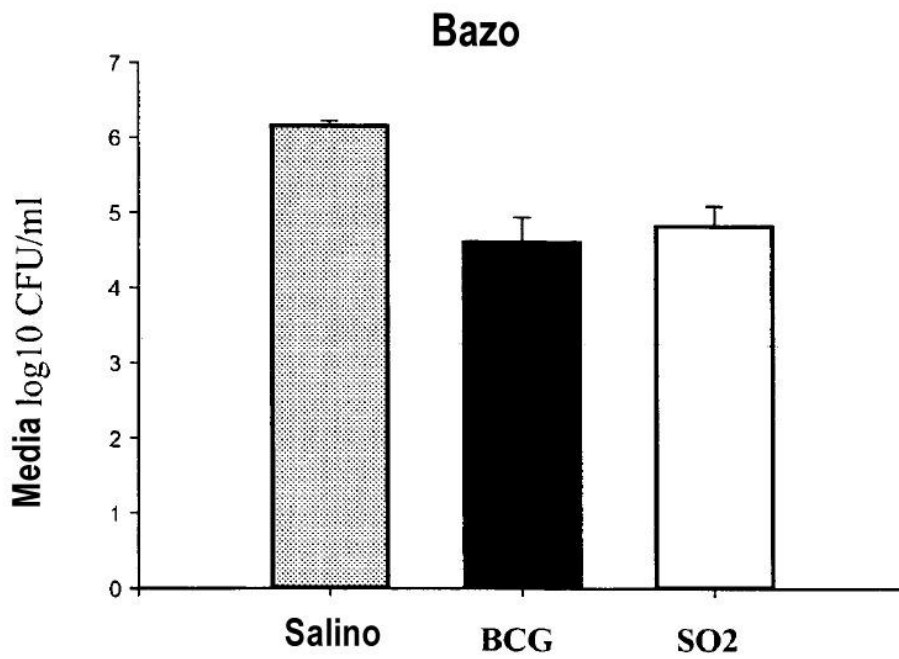


Fig. 4b

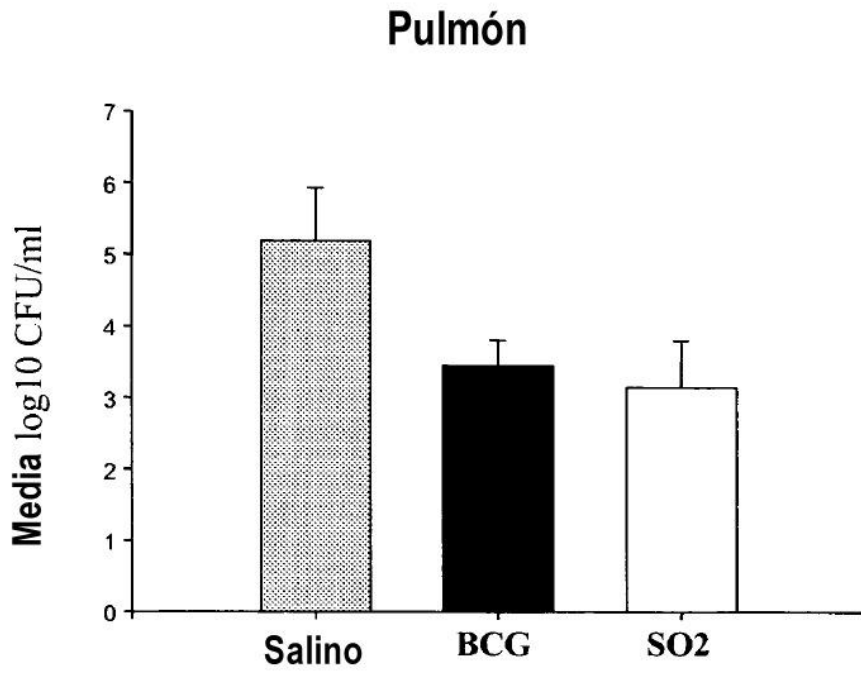


Fig. 5a

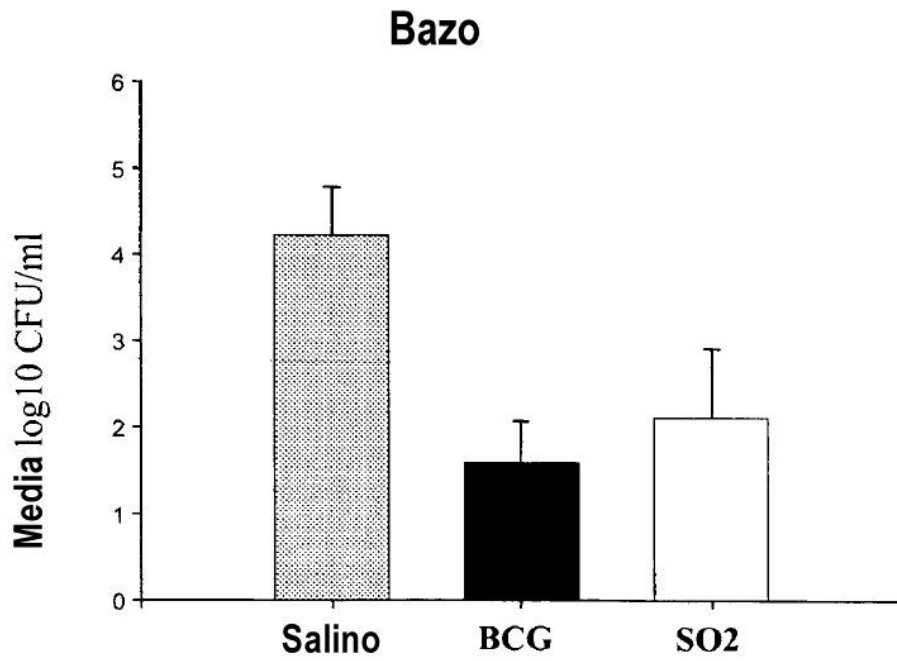


Fig. 5b

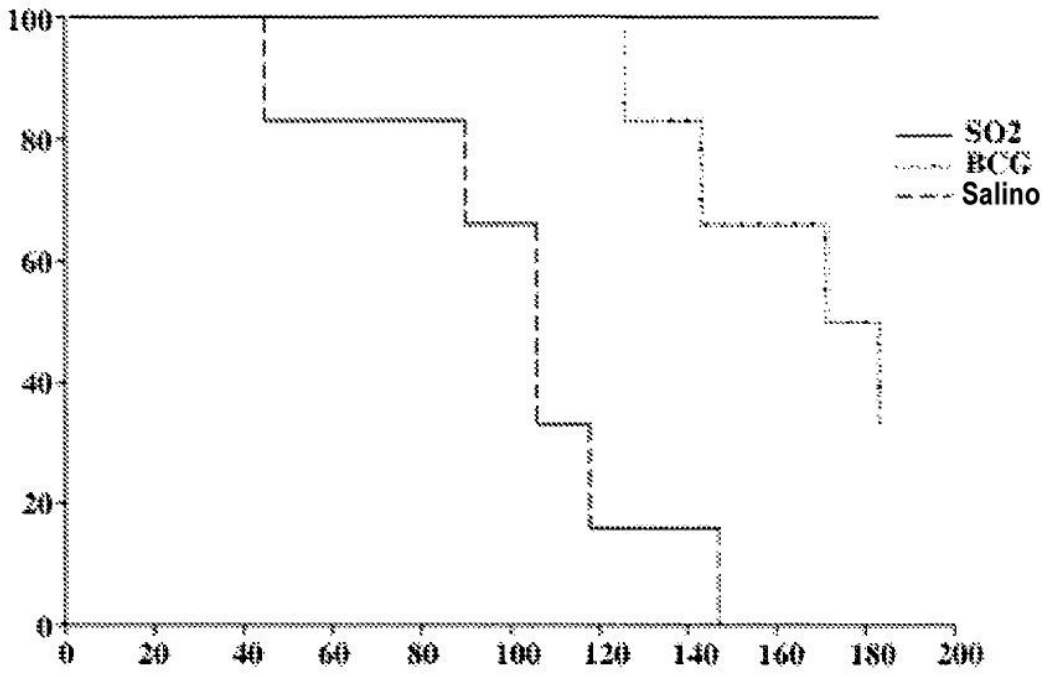


Fig. 6a

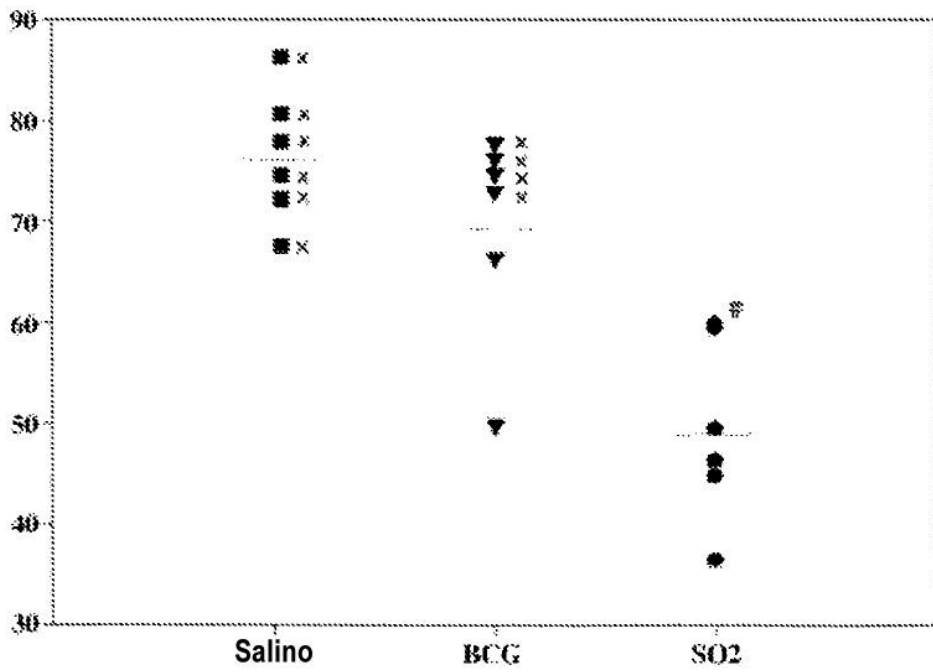


Fig. 6b

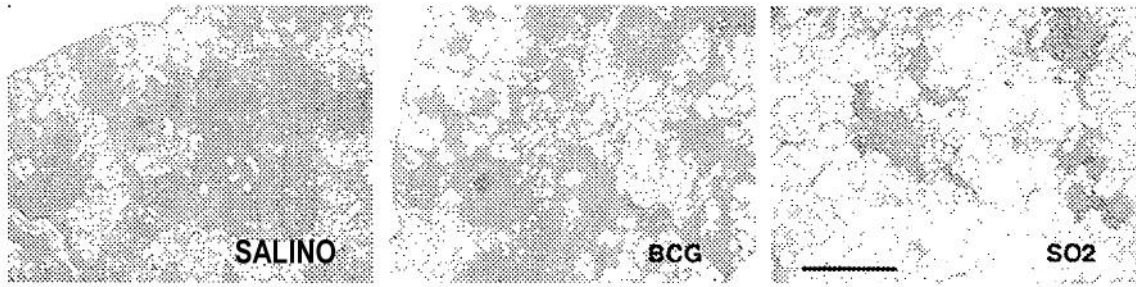


Fig. 6c

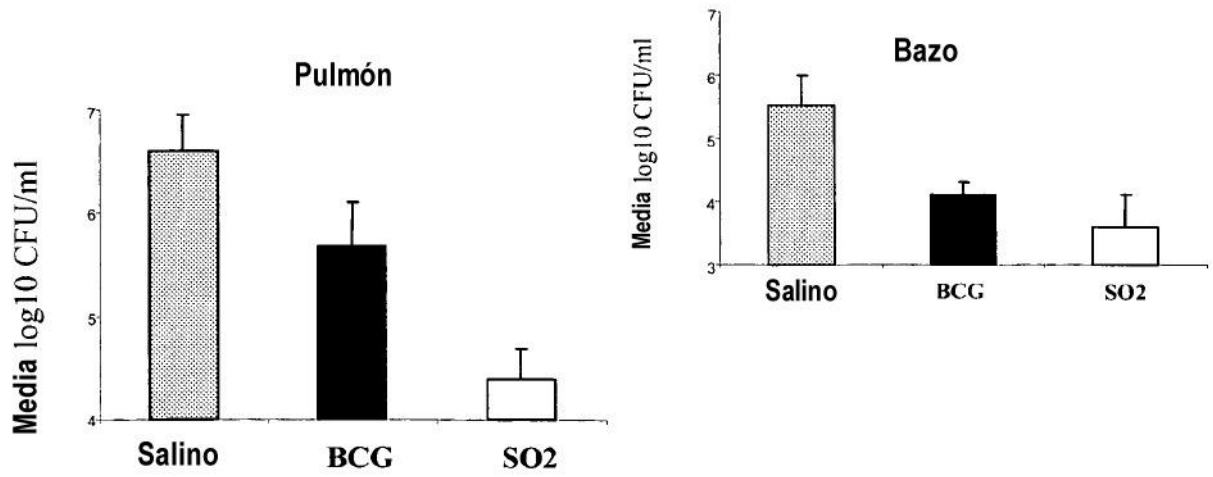


Fig. 6d

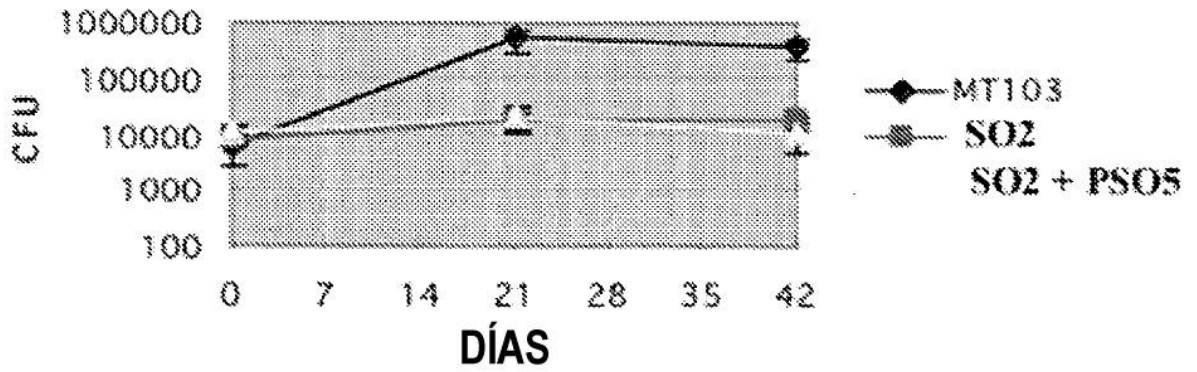


Fig. 7a

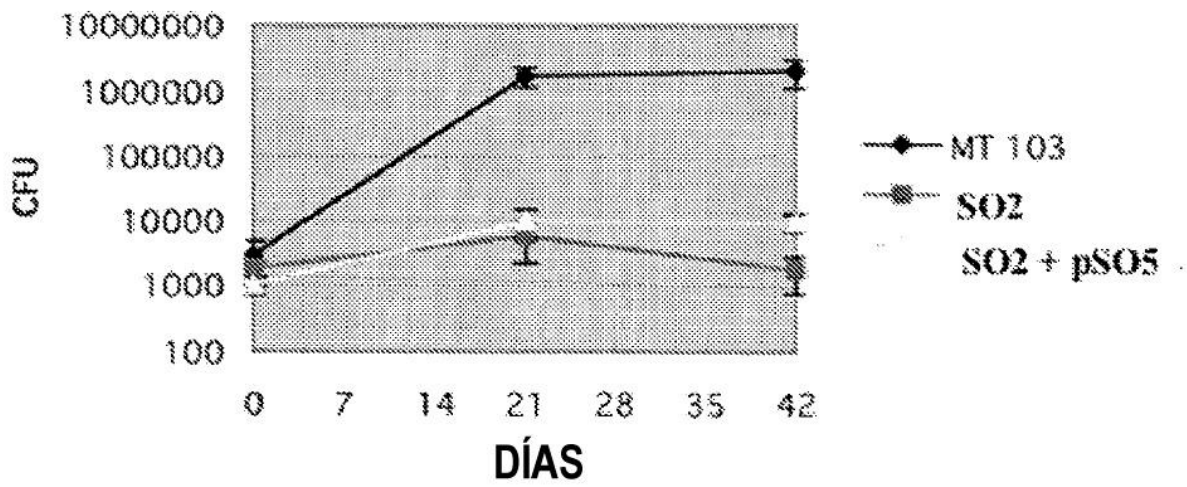


Fig. 7b

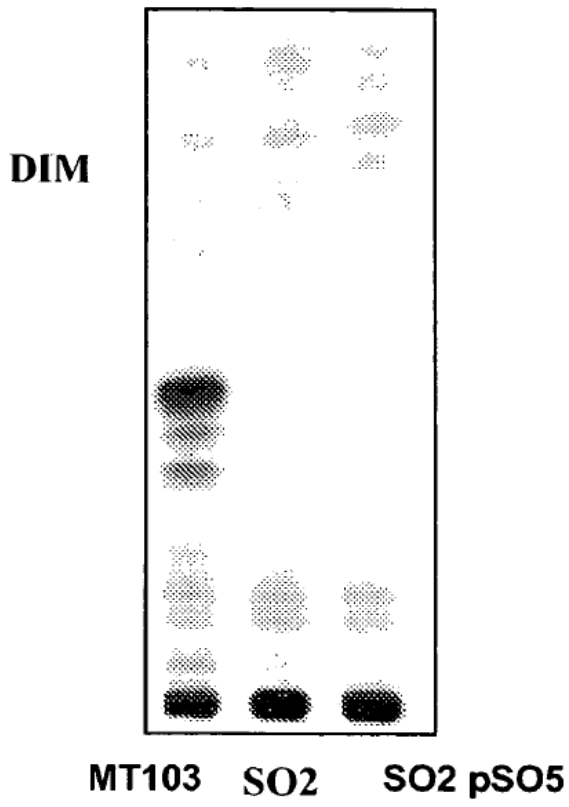


Fig. 8a

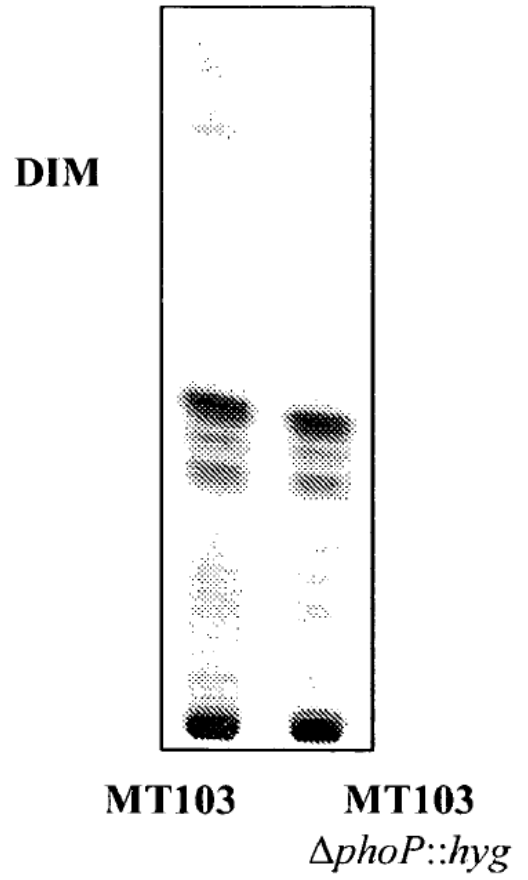


Fig. 8b

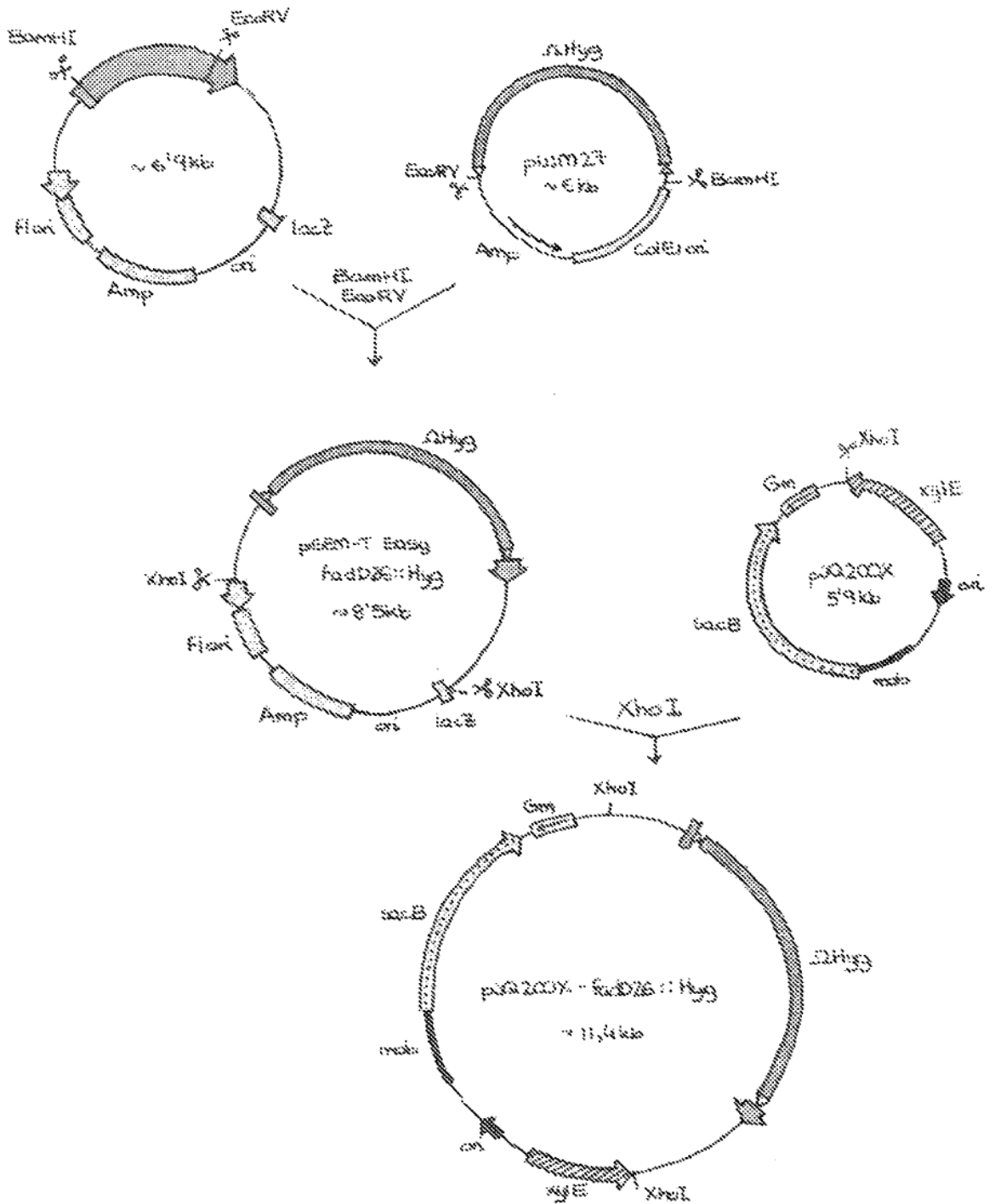


Fig. 9

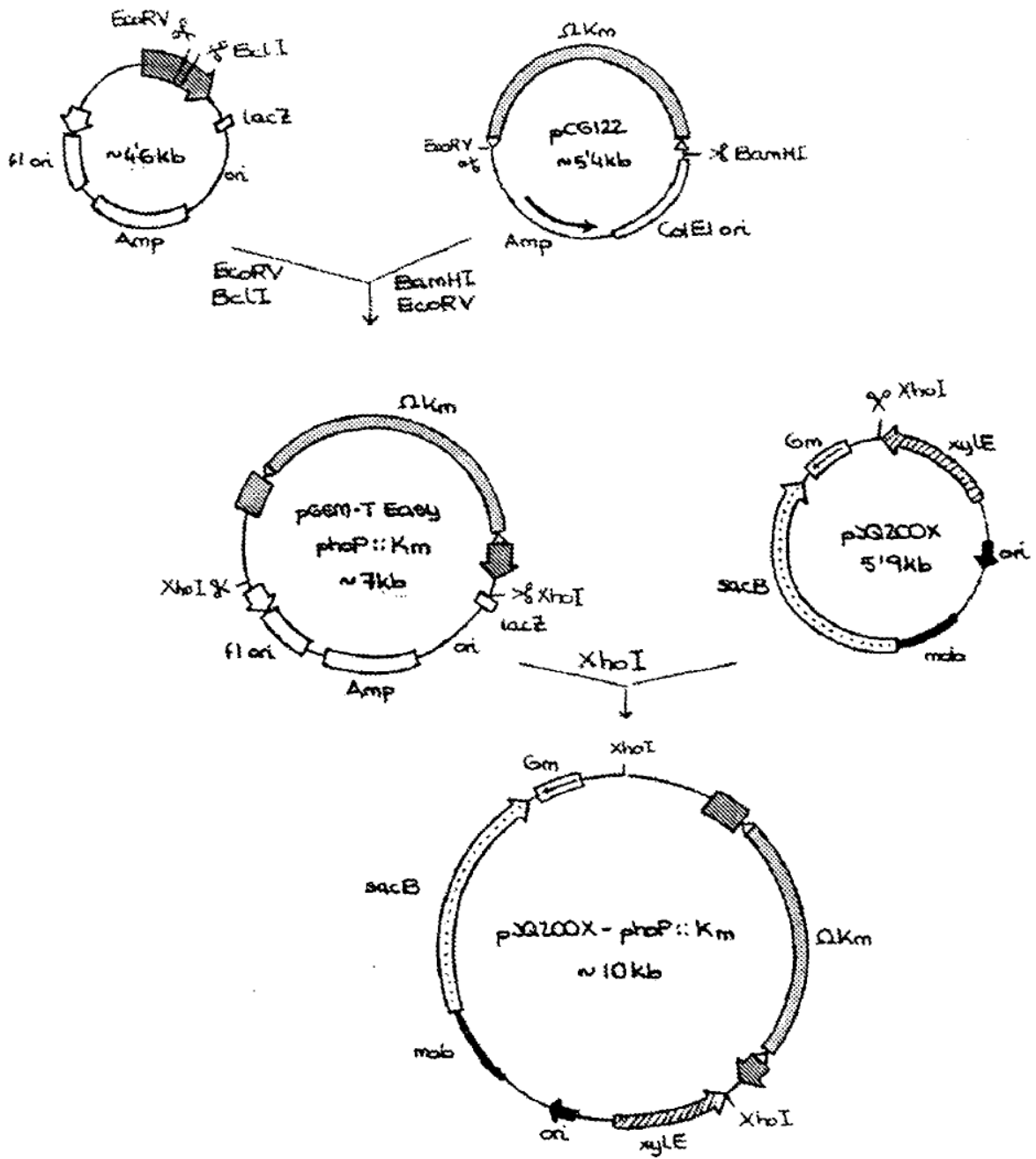


Fig. 10

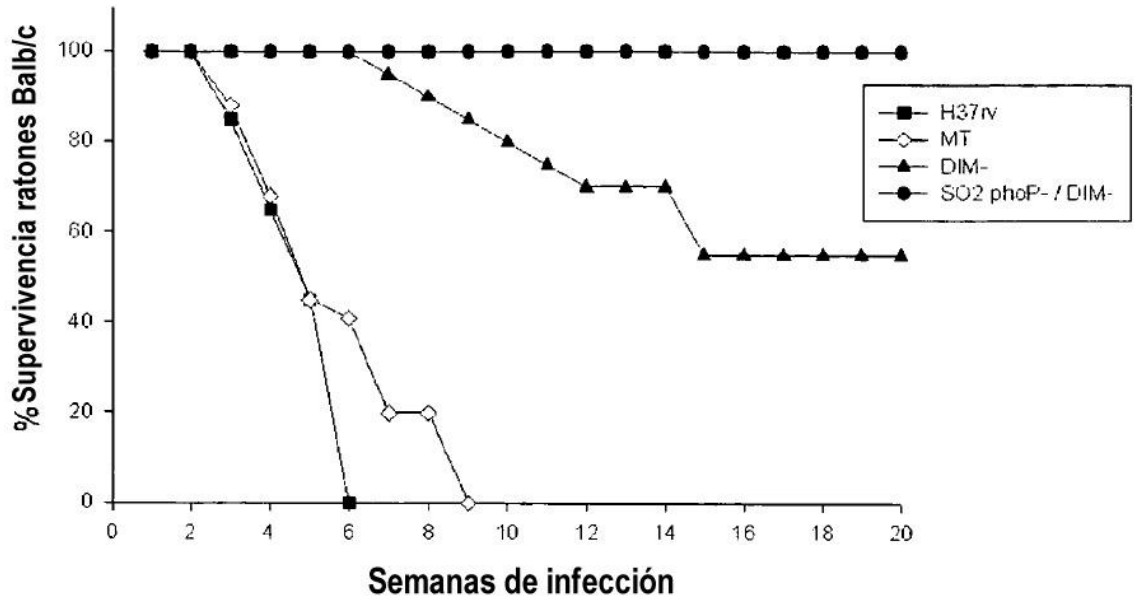


Fig. 11

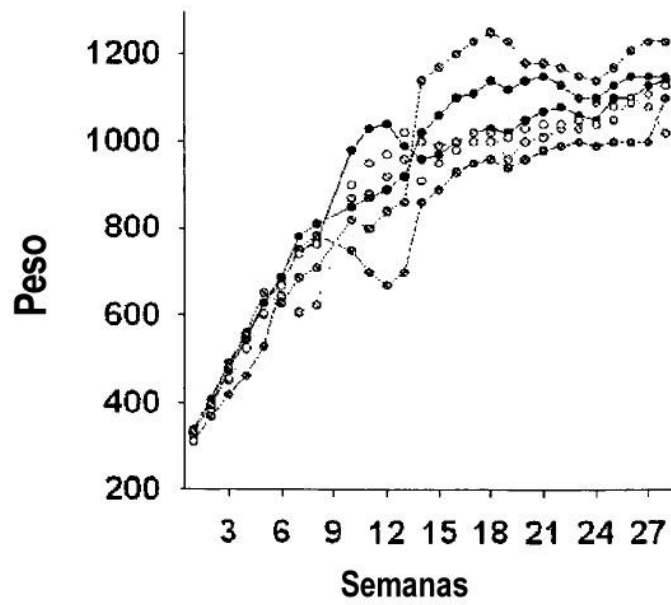


FIG.12

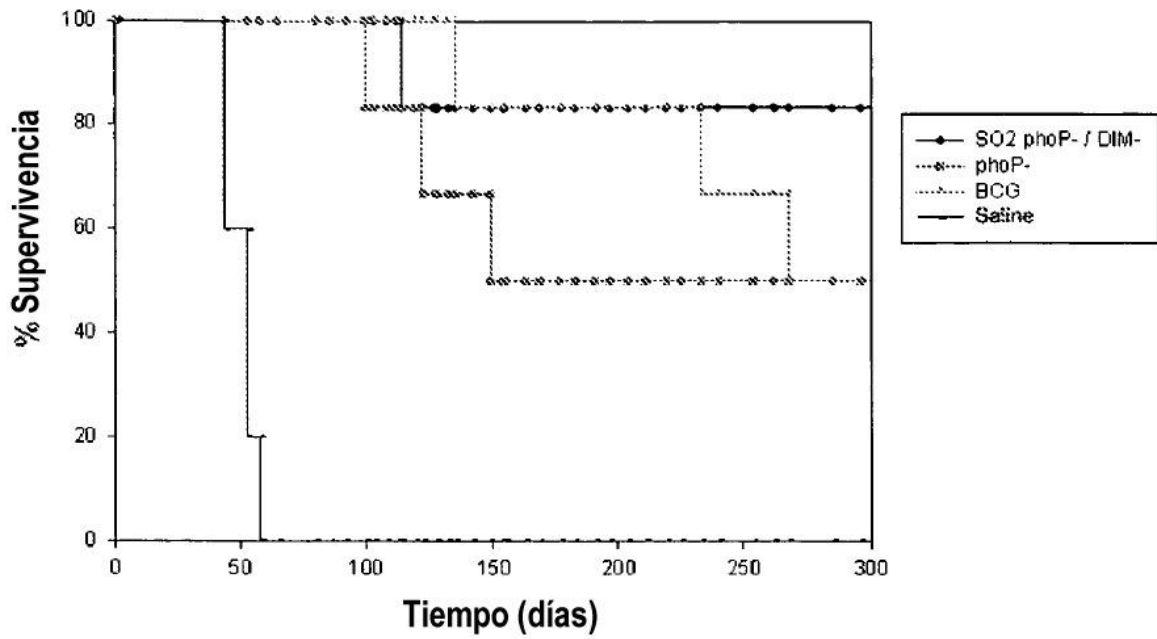


Fig. 13

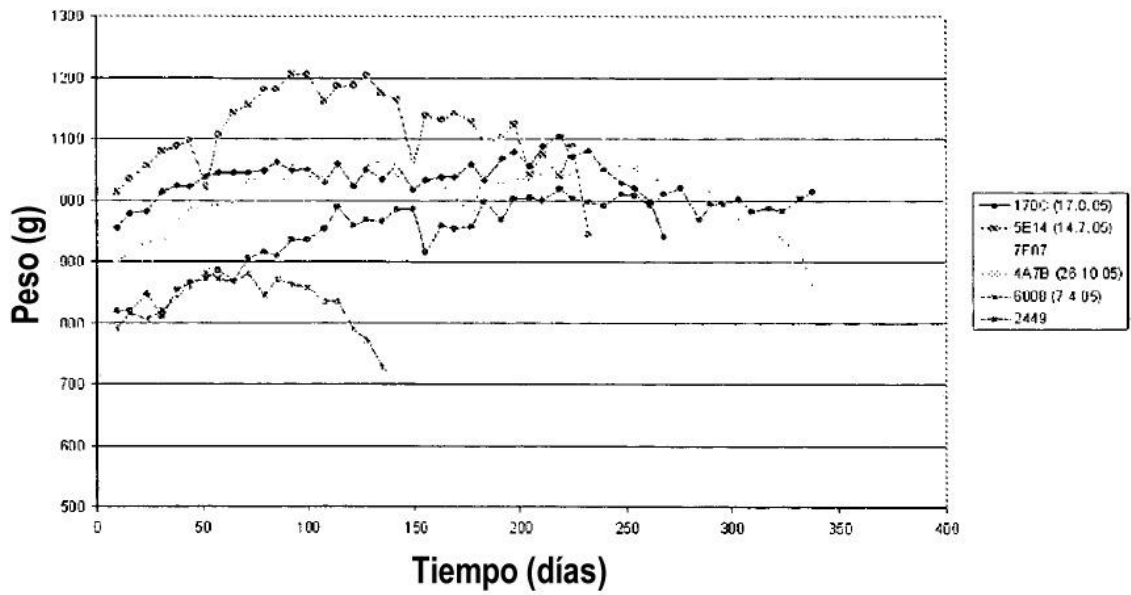


Fig. 14a₁

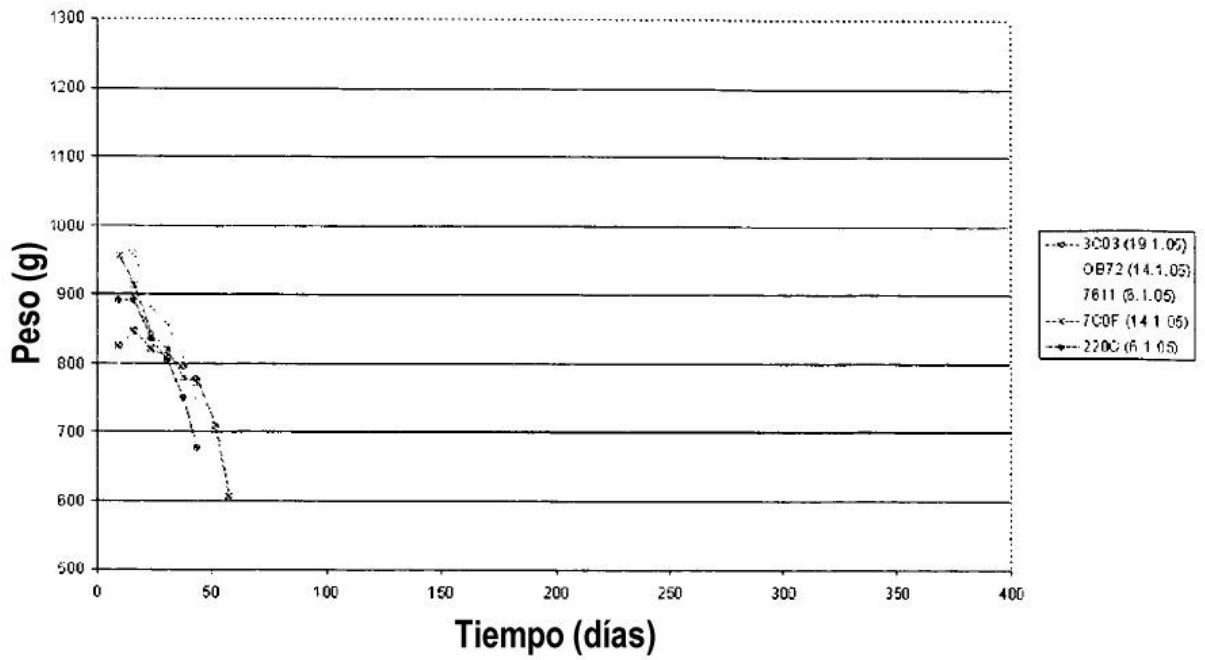


Fig. 14a₂

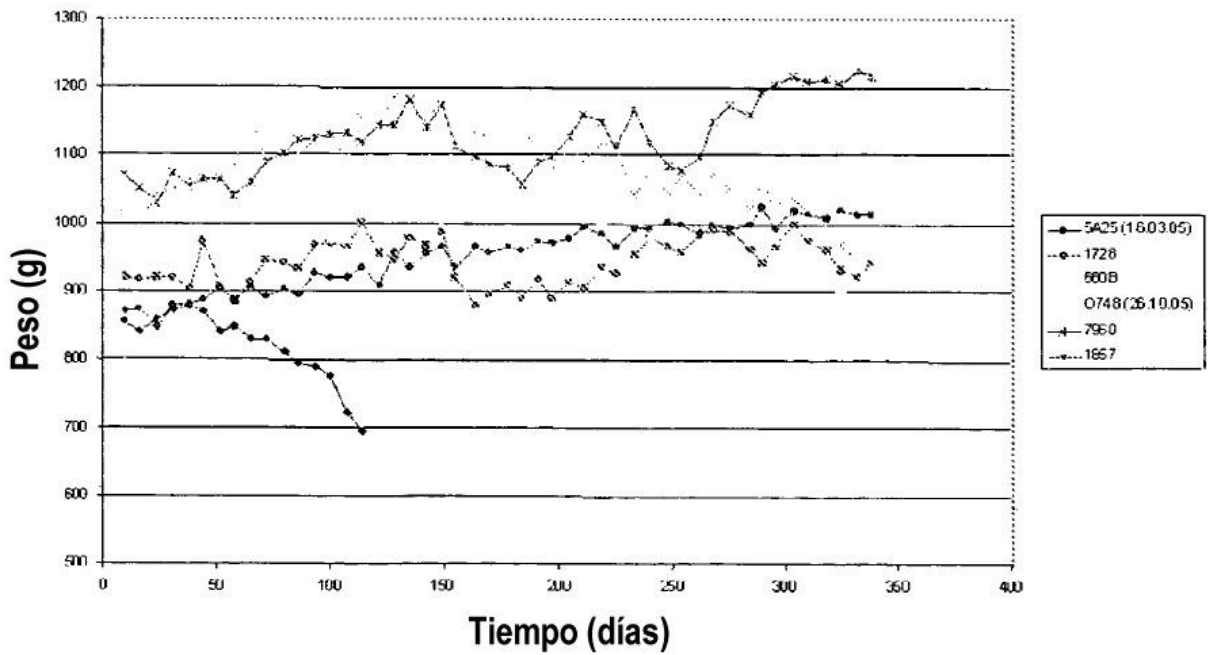


Fig. 14a₃

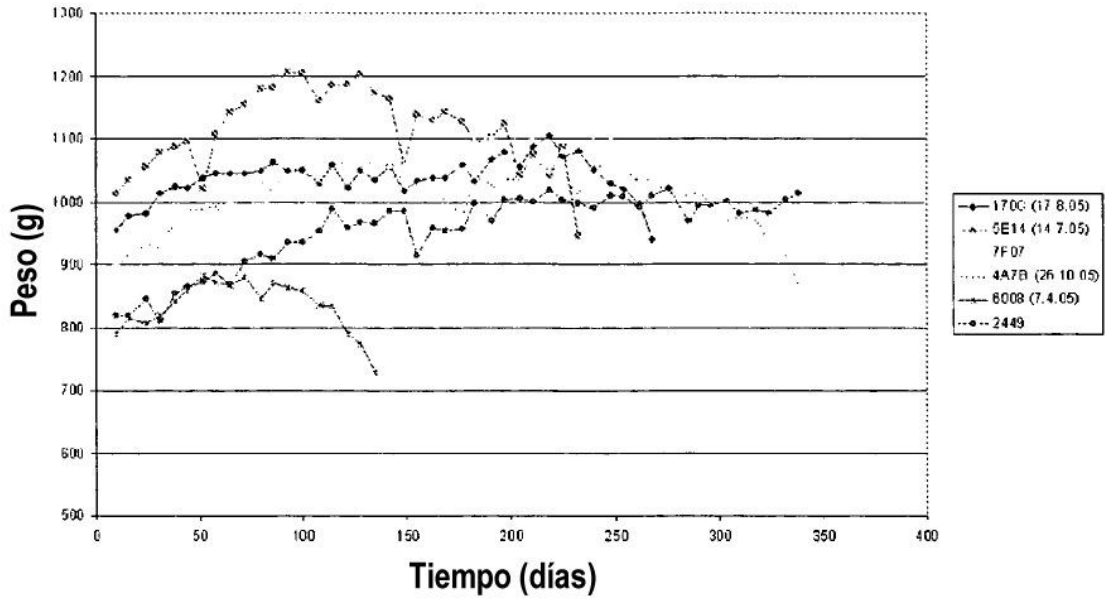


Fig. 14b₁

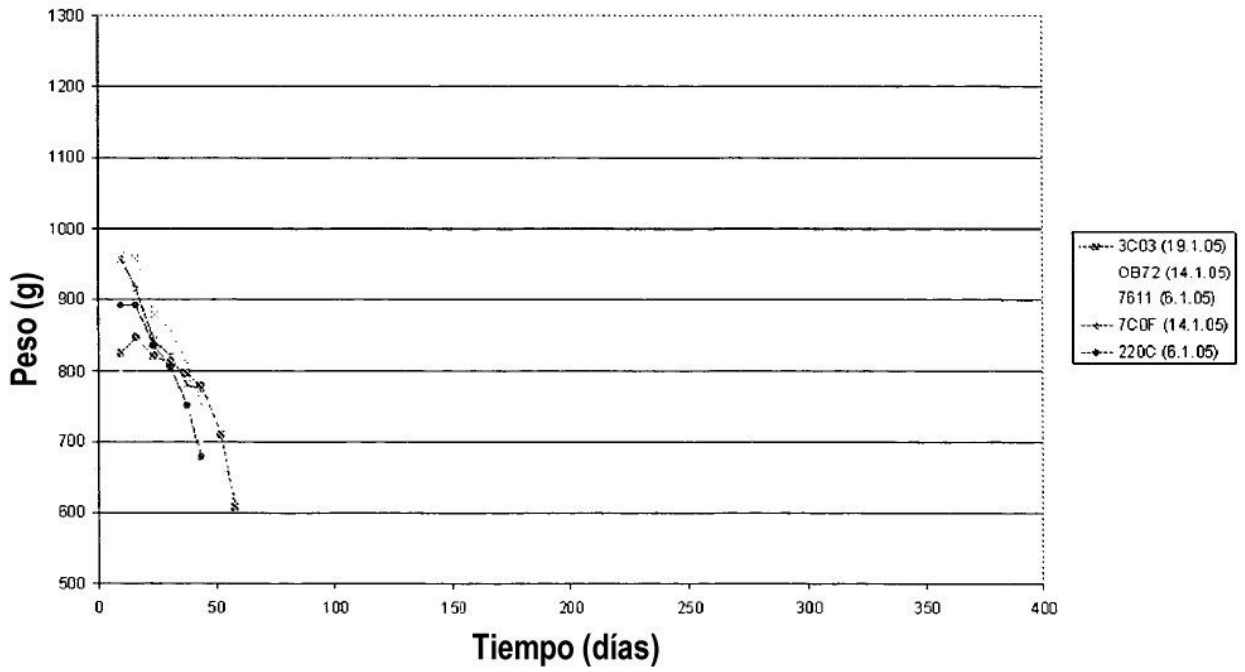


Fig. 14b₂

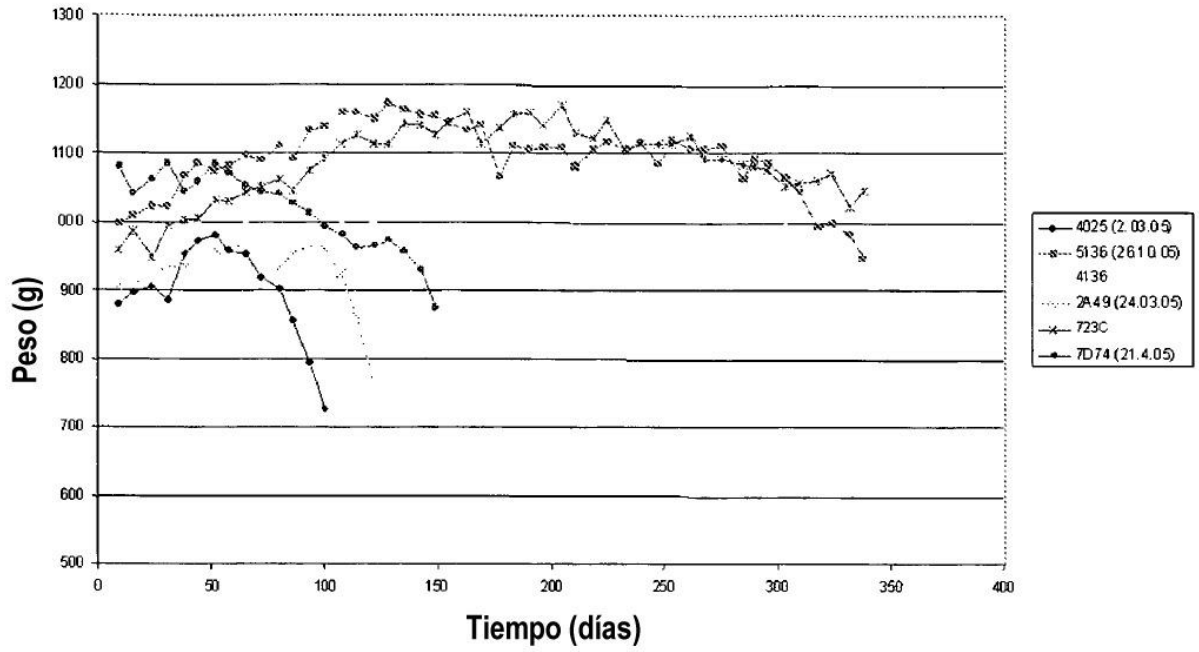


Fig. 14b₃