(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 528 197**

(51) Int. CI.:

A61K 39/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2008 E 08832386 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2207567**

(54) Título: **Formulación inmunogénica**

(30) Prioridad:

20.09.2007 CL 27102007

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2015

(73) Titular/es:

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE (50.0%)
AVDA. LIBERTADOR BERNARDO O'HIGGINS, 340
SANTIAGO, CL y
BESTPHARMA S.A. (50.0%)

(72) Inventor/es:

KALERGIS PARRA, ALEXIS, MIKES;
GONZALEZ MUNOZ, PABLO, ALBERTO y
BUENO RAMIREZ, SUSAN, MARCELA

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Formulación Inmunogénica

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona al área de la inmunología y está particularmente relacionada con una formulación inmunogénica para ser utilizada para preparar una vacuna contra el virus respiratorio sincicial (VRS). Dicha formulación comprende al menos una cepa viva recombinante atenuada de *Mycobacterium*, preferentemente la cepa Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), recombinante para una o más proteínas o fragmentos inmunogénicos de VRS, estabilizada en una solución tampón salina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en una formulación inmunogénica que induce protección contra la infección causada por el virus respiratorio sincicial (VRS) y/o atenúa la patología causada por este virus en mamíferos. La formulación inmunogénica de la presente invención puede ser utilizada para preparar vacunas y contiene unidades formadoras de colonia (CFU) (por ejemplo entre $1x10^4$-$1x10^9$ CFU por dosis) de cepas vivas recombinantes atenuadas de *Mycobacterium*, preferentemente la cepa Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que expresan de manera recombinante o heteróloga una o más proteínas o fragmentos inmunogénicos de VRS, y que se encuentran conservadas, previo a su uso, liofilizadas (conservadas en el rango de temperaturas entre 4°C y 25°C) o en una solución salina estabilizadora (conservadas en el rango de temperaturas entre -80°C y 4°C). Por ejemplo, la formulación inmunogénica resuspendida en solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico, 1 ml de H_2O para inyección) y conservada a 4°C, la formulación inmunogénica en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% conservada a -80ºC o la formulación inmunogénica resuspendida en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) liofilizada conservada en el rango de temperaturas entre 4°C y 25°C.

Las bacterias *Mycobacterium* recombinantes atenuadas de la formulación inmunogénica de la presente invención contienen uno o más genes que codifican para al menos una proteína, o fragmento inmunogénico de VRS del subtipos VRS A o VRS B o de ambos. Estas proteínas, o fragmentos inmunogénicos de VRS corresponden a las proteínas NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 (ORF1), M2 (ORF2), L, F o G de VRS y se encuentran insertos en el genoma bacteriano o en plásmidos extracromosomales, en una o varias copias, y su expresión está comandada por promotores endógenos o exógenos de BCG, constitutivos o inducibles. Estas proteínas, o fragmentos inmunogénicos de VRS pueden ser expresados por BCG u otras cepas atenuadas de *Mycobacterium*, de forma soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o como proteínas unidas a la membrana celular.

La formulación inmunogénica que se divulga en la presente invención puede ser utilizada en conjunto con formulaciones inmunogénicas que contienen otras cepas atenuadas de *Mycobacterium* o BCG y que difieren en las proteínas inmunogénicas de VRS que expresan, así como en la ubicación de los genes (inserta en el genoma o extracromosomal), el número de copias del gen de la proteína, el promotor que induce la expresión de la proteína, o la destinación de la proteína o fragmentos inmunogénicos de VRS (soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o proteínas unidas a membrana celular).

Las bacterias *Mycobacterium* atenuadas de la formulación inmunogénica anteriormente descrita provienen de un cultivo de bacteria *Mycobacterium* en fase de crecimiento exponencial o estacionario, correspondiendo a densidad óptica a 600 nm entre 0,5 y 1,5, en solución salina tampón (PBS-Tween 80 0,02%, o Solución diluida Sauton SSI).

La formulación inmunogénica anteriormente descrita puede ser aplicada al individuo de forma subcutánea, percutánea o subdérmica, en conjunto con una solución salina tampón o fisiológica, como por ejemplo Solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico, 1 ml de H_2O para inyección).

La formulación inmunogénica anteriormente descrita puede ser usada para vacunar a individuos que hayan o no tenido contacto previo con el virus respiratorio sincicial, con el fin de conferir protección contra el VRS.

Antecedentes de la invención

El Virus Respiratorio Sincicial (VRS) es el principal agente causante de infecciones agudas del tracto respiratorio en lactantes de todo el mundo. Según la OMS, este virus infecta a 64 millones de personas anualmente, de los cuales

160.000 muere (www.who.int). La infección por este virus provoca una amplia gama de cuadros clínicos, que pueden ser leves como rinitis o mucho más severos, como neumonías o bronquiolitis, observándose los cuadros más graves en niños lactantes, prematuros, niños con cardiopatías congénitas y en inmunodeprimidos.

La infección causada por este virus es sumamente frecuente y recurrente, ya que prácticamente el 100% de los niños mayores de tres años han presentado por lo menos un episodio de infección por VRS. Debido a que esta infección no deja una memoria inmunológica completa (Hall, C. B., E. E. Walsh, C. E. Long, and K. C. Schnabel. 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. In *J Infect Dis*, Vol. 163, p. 693) las reinfecciones son frecuentes, disminuyendo su severidad a medida que aumenta la edad del paciente.

La situación de salud generada por la infección por VRS genera un alto impacto económico para los países afectados. Estudios realizados en países desarrollados estiman que el costo individual de esta infección es de sobre 3.000 euros, con un límite superior de hasta 8.400 euros.

El VRS es un virus RNA de hebra simple negativa no segmentada, con envoltura lipídica y perteneciente a la familia de los paramyxoviridae, género pneumovirus (Wertz, G. W., and R. M. Moudy. 2004. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. In *Pediatr Infect Dis J*, Vol. 23, p. S19). El VRS posee un genoma de aproximadamente 15 kb, que codifica para un total de 11 proteínas. Cinco de estas proteínas poseen funciones estructurales, correspondiendo a las glicoproteínas de transmembrana F, G y SH, la proteína de nucleocápside N y la proteína de matriz M. Las otras cuatro proteínas, M2-1, M2-2, P y L, están involucradas en la replicación viral y transcripción. Las dos proteínas restantes, denominadas NS1 y NS2, no son estructurales y al parecer están involucradas en virulencia.

El VRS que infecta al humano posee diferentes cepas o subgrupos, siendo los subgrupos A y B aquellos que predominan en la población. La principal diferencia antigénica entre los subgrupos corresponde a la proteína G, que sólo conserva un 40-44% de los aminoácidos entre los distintos subgrupos (Sullender, W. M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. In *Clin Microbiol Rev*, Vol. 13, p. 1).

La primera vacuna contra VRS fue probada en los años sesenta y consistió en el virus completo inactivado con formalina (RSV-FI), que se administró intramuscularmente en presencia del adyuvante alum. A diferencia de lo esperado, esta inmunización produjo un cuadro respiratorio mucho más severo en los niños vacunados tras la infección por VRS, que llevó a la hospitalización del 80% de los vacunados y la muerte de dos de ellos. El cuadro respiratorio-pulmonar que presentaron los vacunados se caracterizó por una inusual infiltración de eosinófilos y neutrófilos, junto con un título alto de anticuerpos fijadores de complemento. Análisis de los tejidos pulmonares de niños vacunados con RSV-FI que murieron debido a la infección por VRS muestran el depósito de complemento, complejos inmunes y la presencia de eosinófilos en las regiones peribronquiales. Junto con esto, estudios en modelos animales demuestran que la vacunación con RSV-FI produce una respuesta inmune de tipo Th2, basada en linfocitos T CD4+, que posee las mismas características que aquella observada en animales que han sido inmunizados con la proteína G o que reciben los linfocitos T CD4+ específicos para esta glicoproteína previo a la infección con VRS. Por esta razón, para formular una vacuna eficaz y segura contra VRS ha sido necesario el estudio acabado de la respuesta inmune generada contra las diferentes proteínas de este virus, con el fin de identificar aquellas que permitan generar una respuesta inmune de tipo Th1, basada en linfocitos T secretores de interferón-gamma (IFN-γ) y citotóxicos.

Las investigaciones en curso sobre vacunas contra VRS se han enfocado en el análisis y desarrollo de sub-unidades virales, tales como las proteínas F (Munoz, F. M., P. A. Piedra, and W. P. Glezen. 2003. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus purified fusion protein-2 vaccine in pregnant women. In *Vaccine*, Vol. 21, p. 3465), M2 (Jin, H., X. Cheng, H. Z. Zhou, S. Li, and A. Seddiqui. 2000. Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. In *J Virol*, Vol. 74, p. 74) y también de algunos segmentos conservados de la proteína G. Por otra parte, también se ha estudiado la generación de vacunas basadas en cepas mutantes de VRS, como aquellas sensibles a temperatura, con deleciones de algunos genes o recombinantes para citoquinas como GM-CSF. Algunas de estas vacunas han sido probadas en ensayos clínicos de fase I y II, con resultados variables. Otro tipo de vacuna tentativa contra VRS es el caso de vacunas basadas en las proteínas F y G, que se administran con adyuvantes como ISCOMs. La inmunización con este tipo de vacunas produce una aumentada infiltración de eosinófilos en el tejido pulmonar frente a una nueva infección viral (Chen, M., K. F. Hu, B. Rozell, C. Orvell, B. Morein, and P. Liljestrom. 2002. Vaccination with recombinant alphavirus or immune-stimulating complex antigen against respiratory syncytial virus. In *J Immunol*, Vol. 169, p. 3208), que aumenta el daño en el tejido pulmonar.

El sistema inmune del lactante se caracteriza por desarrollar preferentemente respuestas inmunes del tipo Th2, posiblemente por la inmadurez del sistema inmune durante los primeros seis meses de vida. No obstante, si se estimula de forma adecuada éste puede montar una respuesta de tipo Th1. Para formular una vacuna eficaz y segura contra VRS ha sido necesario el estudio acabado de la respuesta inmune generada contra las diferentes proteínas de este virus, con el fin de identificar aquellas que permitan generar una respuesta inmune de tipo Th1,

basada en linfocitos T citotóxicos. El uso de vectores bacterianos para la expresión heteróloga de antígenos virales tienen la ventaja de que pueden ser utilizados como vectores vivos atenuados, ya que poseen intactas sus capacidades de invasión y son reconocidamente no-patogénicos. Una ventaja adicional que poseen ciertos vectores bacterianos utilizados para la expresión de antígenos heterólogos es su reconocida capacidad de inducir inmunidades de tipo Th1, lo cual resulta sumamente atractivo para el caso de desarrollo de vacunas contra VRS (Etchart, N., B. Baaten, S. R. Andersen, L. Hyland, S. Y. Wong, and S. Hou. 2006. Intranasal immunisation with inactivated RSV and bacterial adjuvants induces mucosal protection and abrogates eosinophilia upon challenge. In *Eur J Immunol*, Vol. 36, p. 1136). El Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) es una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada que es utilizada como vacuna en los recién nacidos contra *Mycobacterium tuberculosis.* Desde la aprobación de BCG como vacuna contra la tuberculosis, ésta ha sido aplicada a más de 3,3 billones de personas en todo el mundo. Su uso masivo se ha visto facilitado por varias características ventajosas de esta bacteria, como su gran termoestabilidad en la forma liofilizada. Además, la inmunización de niños recién nacidos con esta bacteria no es riesgosa y sólo produce efectos colaterales mínimos. BCG es altamente inmunogénica y con sólo una dosis es posible generar una respuesta inmune que se mantiene por largos períodos. De modo importante BCG induce una potente respuesta inmune de tipo Th1 tanto en adultos como niños. Este fenómeno en los neonatos se evidencia por la respuesta inmune de tipo celular que se genera frente a antígenos de *M. tuberculosis* (PPD), respuesta que logra mantenerse durante períodos prolongados.

Hasta la fecha se han logrado expresar exitosamente varios antígenos bacterianos, parasitarios y virales en este sistema bacteriano, que al ser evaluados en modelos animales han demostrado ser capaces de generar inmunidad humoral y celular contra estos antígenos. Además, BCG tiene la particularidad de no ser neutralizado por anticuerpos presentes en la leche materna, por lo que puede ser utilizado como inductor de inmunidad en niños lactantes. La presente invención corresponde a una formulación inmunológica que contiene una o varias cepas recombinantes atenuadas de bacteria *Mycobacterium*, preferentemente la cepa BCG, para proteínas del VRS y puede ser usada en la preparación de vacunas contra este virus.

Esta formulación pretende evitar o atenuar el daño pulmonar causado por una infección por VRS, gracias a la generación de una respuesta inmune eficiente y favorable para la eliminación del virus. Debido a que cepas atenuadas de *Mycobacterium*, como BCG, son potentes inductores de respuestas inmunes de tipo Th1, la respuesta inmune inducida por cepas recombinantes de BCG para VRS favorece una protección contra infecciones causadas por este virus.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 corresponde a un ensayo de inmuno-blot (Western Blot) para comprobar la expresión de la proteína N de VRS en una cepa de BCG. Esta cepa de *Mycobacterium* atenuada contiene el gen de la proteína N de VRS inserto en una copia en su genoma, bajo el control del promotor constitutivo *hsp60* y es expresado por la bacteria de forma constitutiva. La proteína se obtiene desde la fracción soluble de un extracto total de la bacteria. Se realizó una extracción de proteínas de múltiples clones de BCG transformadas con el plásmido pMV361-N y preservados en solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4)-Tween 80 0,05% Glicerol 20% a -80°C. Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti- N de VRS para detectar la presencia de la proteína; (+) corresponde al control positivo del ensayo, consiste en 0,25 µg de proteína N recombinante; (-) corresponde al control negativo del ensayo, consiste en 25 µg de proteínas de una cepa BCG que no ha sido transformada con pMV361-N; los carriles 1-5 corresponden a 25 µg de proteínas de clones de BCG transformados con pMV361-N. Se puede concluir que la proteína N de VRS se expresa exitosamente en BCG cuando el gen es insertado en su genoma, bajo el control de un promotor constitutivo.

La Figura 2 corresponde a un ensayo de inmuno-blot (Western Blot) para comprobar la expresión de la proteína M2 de VRS en una cepa de BCG conservada en solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4)-Tween 80 0,05%-Glicerol 20% a -80°C. Esta cepa de *Mycobacterium* atenuada BCG contiene el gen de la proteína M2 de VRS inserto en su genoma en una copia, bajo el control del promotor constitutivo *hsp60* y es expresado por la bacteria de forma constitutiva. La proteína se obtiene desde la fracción soluble de un extracto total de la bacteria. Se realizó una extracción de proteínas de clones de BCG transformadas con el plásmido pMV361-M2. Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti- M2 de VRS para detectar la presencia de la proteína. (+) corresponde al control positivo, consiste en 25 µg de un lisado total de células HEp-2 infectadas con VRS; (-) corresponde al control negativo, consiste en 25 µg de proteínas de BCG no transformada con pMV361-M2; los carriles 1-3 corresponden a 25 µg de proteína de clones de BCG transformados con pMV361-M2. Se puede concluir que la proteína M2 de VRS se expresa exitosamente en BCG cuando el gen es insertado en su genoma y se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo.

La Figura 3 muestra el porcentaje de células CD8+-CD69+ (A) y la secreción de IFN-γ de células provenientes del bazo de ratones BALB/c inmunizados con BCG en solución salina (PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, a 4°C) que expresa la proteína N. $5x10^5$ células provenientes del bazo de los animales sin inmunizar, inmunizados con $1x10^7$ PFU de VRS, inmunizados con BCG ($1x10^8$

CFU/ratón en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C) o inmunizados con BCG recombinante para la proteína N de VRS ($1x10^8$ CFU/ratón en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C) fueron estimuladas por 72 hrs con 0,5 µM de la proteína N de VRS. Posteriormente, se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para los marcadores CD8 y CD69 (A). Los sobrenadantes de las células fueron sometidos a ELISA para detectar la presencia de IFN-γ secretado (Hammerling, G. J., G. Schonrich, F. Momburg, N. Auphan, M. Malissen, Malissen, B, A. M. Schmitt-Verhulst, and B. Arnold. 1991. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. [Review] [45 refs]. In *Immunological Reviews*, Vol. 122, p. 47). **, valor de *p* 0,002, Test *t* student. Se puede concluir que la cepa BCG recombinante para la proteína N de VRS produce, en ratones inmunizados con esta formulación inmunogénica, una respuesta favorable por parte de linfocitos T. En respuesta a un desafío con proteína N recombinante, estos linfocitos T son activados, expresan marcadores de activación en su superficie ($CD69^+$) y secretan de IFN-γ al medio extracelular.

La Figura 4 muestra una curva de variación de peso corporal de ratones BALB/c inmunizados con una cepa de BCG recombinante para la proteína N de VRS ($1x10^8$ CFU/ratón, en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C) o con una cepa de BCG recombinante para la proteína M2 de VRS ($1x10^8$ CFU/ratón, en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C). Ratones BALB/c sin vacunar (■), inmunizados con $1x10^7$ unidades formadoras de placa (PFU) de VRS inactivado con luz ultravioleta (ampolleta UV, 312 nm, potencia 8 watts) por 20 minutos (VRS-UV) (▲),inmunizados con una cepa de BCG silvestre (WT), que no expresa proteínas de VRS (▼) ($1x10^8$ CFU/ratón, en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C)., inmunizados con una cepa de BCG transformada con pMV361-N (□) ($1x10^8$ CFU/ratón, en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C) o inmunizados con una cepa de BCG transformada con pMV361-M2 (△) ($1x10^8$ CFU/ratón, en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, 4°C) fueron infectados intranasalmente con $1x10^7$ PFU de VRS, cepa 13018-8. Como control, se incluyó un grupo de ratones sin vacunar y sin infectar (●). La variación de peso corporal respecto al día 0 fue registrada diariamente, durante 4 días. **, valor de *p* 0,002, Test *t* student. Se puede concluir que la inmunización de ratones con una cepa BCG recombinante para la proteína N o M2 de VRS produce una respuesta favorable frente a la infección por VRS, ya que post-infección el peso corporal de estos ratones no varía significativamente cuando se compara con el de ratones no vacunados, en los cuales se observa una disminución de este.

La Figura 5 muestra cortes histológicos representativos de pulmones de ratones BALB/c inmunizados e infectados intranasalmente con $1x10^7$ PFU de VRS cepa 13018-8. (A-B), pulmones de ratones sin infectar; (C-D) pulmones de ratones sin inmunizar e infectados con VRS; (E-F), pulmones de ratones inmunizados con VRS e infectados con VRS; (G-H), ratones inmunizados con BCG recombinante para la proteína N de VRS ($1x10^8$ CFU/ratón en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, a 4°C) y ratones inmunizados con BCG recombinante para la proteína M2 de VRS ($1x10^8$ CFU/ratón en PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, Tween 80 0,02% pH 7,4, a 4°C). Los paneles de la derecha corresponden a microfotografías amplificadas 40x y los paneles de la izquierda corresponden a microfotografías amplificadas 100x, marcadas con un anticuerpo policlonal anti-VRS-HRP (USBiologicals) que muestra la presencia de proteínas virales en las células epiteliales pulmonares. Las células pulmonares infectadas se observan más oscuras (indicadas con flechas). Se puede concluir que ratones inmunizados con la cepa BCG recombinante para la proteína N de VRS desarrollan una respuesta favorable frente a la infección por VRS. Luego de una infección con VRS, puede observarse en una menor infiltración celular en los pulmones de ratones vacunados cuando se compara con animales no-vacunados. Además, se observa un menor número de células pulmonares infectadas con virus en los ratones vacunados con la cepa de BCG recombinante para la proteína N de VRS comparado con los controles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en una formulación inmunogénica que puede ser utilizada para la preparación de una vacuna que induce protección contra la infección causada por el virus respiratorio sincicial (VRS) y/o atenúa la patología causada por este virus en mamíferos. La formulación inmunogénica de la presente invención puede ser utilizada para preparar vacunas y contiene unidades formadoras de colonia (CFU) (por ejemplo entre $1x10^4$-$1x10^9$ CFU por dosis) de cepas vivas recombinantes atenuadas de *Mycobacterium*, preferentemente Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (por ejemplo las cepas BCG Danish o Pasteur, que expresan de manera recombinante o heteróloga una o más proteínas o fragmentos inmunogénicos de VRS, y que se encuentran previo a su uso conservadas de forma liofilizada o en una solución salina estabilizadora. Por ejemplo, la formulación inmunogénica conservada en solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico, en 1 ml de H_2O) a 4°C, la formulación inmunogénica conservada en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a -80°C o la formulación inmunogénica resuspendida en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato

monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) liofilizada y conservada en el rango de temperaturas entre 4°C y 25°C.

Las bacterias *Mycobacterium* recombinantes atenuadas de la formulación inmunogénica de la presente invención contienen genes que codifican para al menos una proteína, o fragmento inmunogénico de VRS del subtipos VRS A o VRS B o de ambos. El genoma del virus respiratorio sincicial ha sido descrito previamente en la base de datos GeneBank, números de acceso NC_001803 y NC_001781. Estas proteínas, o fragmentos inmunogénicos de VRS corresponden a las proteínas NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 (ORF1), M2 (ORF2), L, F o G de VRS y se encuentran en el plásmido pMV361, que se incorpora a la bacteria mediante electrotransformación según técnicas descritas previamente (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*), y el cual a su vez se integra en el genoma bacteriano por acción de integrasas de mycobacteriófagos (Kumar, D., B. S. Srivastava, and R. Srivastava. 1998. Genetic rearrangements leading to disruption of heterologous gene expression in mycobacteria: an observation with Escherichia coli beta-galactosidase in Mycobacterium smegmatis and its implication in vaccine development. In *Vaccine*, Vol. 16, p. 1212). También estos genes se pueden encontrar en plásmidos extracromosomales, como por ejemplo pMV261, que se incorpora al *Mycobacterium* por electrotransformación, según técnicas descritas previamente y que se mantiene de forma extracromosomal en la bacteria. Estos genes pueden estar en una o varias copias, y su expresión está comandada por promotores endógenos de BCG (por ejemplo el promotor del gen *hsp60* de BCG), constitutivos o inducibles (por ejemplo el promotor del gen *hsp60* y el promotor del gen *acr* respectivamente). Estas proteínas, o fragmentos inmunogénicos de VRS, pueden ser expresados por BCG u otras cepas atenuadas de *Mycobacterium*, de forma soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o como proteínas unidas a la membrana celular gracias a la fusión de los genes del virus respiratorio sincicial, o fragmentos inmunogénicos, con secuencias de DNA que codifican para péptidos que funcionan como señales de destinación de las proteínas a los diferentes compartimentos bacterianos (por ejemplo la secuencia N-terminal del gen para el alpha-antigen para secreción extracelular y la secuencia N-terminal del gen para la proteína de 19 kD para proteínas unidas a membrana).

Un aspecto preferible de la formulación inmunogénica de la presente invención es su uso conjunto con formulaciones inmunogénicas que contienen una o más cepas atenuadas de *Mycobacterium* o BCG y que difieren en las proteínas inmunogénicas de VRS que expresan, así como en la ubicación de los genes (inserta en el genoma o extracromosomal), el número de copias del gen de la proteína, el promotor que induce la expresión de la proteína, o la destinación de la proteína o fragmentos inmunogénicos de VRS (soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o proteínas unidas a membrana celular). Las bacterias *Mycobacterium* atenuadas de la formulación inmunogénica anteriormente descrita provienen de un cultivo de bacteria *Mycobacterium* (por ejemplo a 37°C en medio de cultivo suplementado con 4,9 gr/L de medio de cultivo Middlebrock 7H9, Difco, número de catálogo 0713-01-7, 1x de medio de enriquecimiento OADC Beckton Dickinson, número catálogo 212351, http://www.bd.com/ds/productCenter/212351.asp; 5% de Glicerol y 0,05% de Tween 80) en fase de crecimiento exponencial o estacionario, correspondiendo a densidad óptica a 600 nm entre 0,5 y 1,5, en solución salina tampón (PBS-Tween 80 0,02%, o Solución diluida Sauton SSI).

Otro aspecto preferible de la formulación inmunogénica de la invención es us administración al individuo de forma subcutánea, percutánea o subdérmica, en conjunto con una solución salina tampón o fisiológica (por ejemplo Solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico, 1 ml de H_2O para inyección).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de la generación y uso de cepas de BCG recombinantes para proteínas del virus respiratorio sincicial (VRS) son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el rango de producción o aplicación de la invención. Aunque en las siguientes descripciones se utilicen términos específicos, su uso es solo descriptivo y no limitante.

Ejemplo I: Formulación inmunogénica que consiste en 10^8 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen N de VRS subtipo A. El gen se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor endógeno constitutivo *hsp60* de BCG y la expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica puede encontrarse en una solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H_2O) a -80°C. También la formulación puede encontrarse en una solución de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentración final de 10^8 bacterias por 100 µl y conservadas a -80°C. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 25°C.

La cepa BCG Danish fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido pMV361/N, derivado del plásmido pMV361 (Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, and et al. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. In *Nature*, Vol. 351, p. 456), que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína N de VRS subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor endógeno y constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron (a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado) hasta OD_{600nm}=1, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentración final de 10^8 bacterias por 100 µl y se conservaron a -80°C. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 25°C. Por Western blot, con el uso de anticuerpos para la proteína N de VRS, puede observarse que esta cepa de BCG expresa de manera recombinate la proteína N de VRS subtipo A en el citoplasma (figura 1). La inmunización de ratones BALB/c con la formulación descrita, a modo de vacuna, confiere protección de estos animales contra una infección intranasal con 10^7 unidades formadoras de placa de VRS subtipo A (figuras 4 y 5). Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad contra la proteína N de VRS subtipo A y B.

Ejemplo II: Formulación inmunogénica que consiste en $5x10^7$ bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen N de VRS subtipo A y $5x10^7$ bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen M2 de VRS subtipo A. En cada una de las bacterias que componen la formulación inmunogénica, los genes de VRS se encuentran insertos en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor endógeno constitutivo *hsp60* de BCG y la expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica se encuentra preservada en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentración final de 10^8 bacterias por 100 µl y se conservaron a -20°C. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 4°C.

La cepa BCG Danish fue transformada, mediante electrotransformación con el plásmido pMV361/N o pMV361/M2, derivados del plásmido pMV361, los cuales se insertan una solo vez en el genoma de la bacteria. Estos plásmidos contienen los genes de las proteínas N y M2 de VRS subtipo A respectivamente, bajo el promotor constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado hasta $OD_{600\ nm}$ =1, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentración final de 10^7 bacterias por 100 µl y se conservaron a -20°C. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 4°C. Por Western blot, con el uso de anticuerpos para las proteínas N y M2 de VRS, puede observarse que estas cepas de BCG Danish expresan de manera recombinate, las proteínas N y M2 de VRS subtipo A (figura 1 y 2). Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad simultánea contra las proteínas M2 y N de VRS subtipo A y B.

Ejemplo III: Formulación inmunogénica que consiste en 10^6 bacterias de la cepa BCG Pasteur recombinante para un segmento de la proteína F de VRS subtipo B. El gen se encuentra en la bacteria extracromosomalmente en múltiples copias (2-4 copias por bacteria) y codifica para un fragmento de la proteína F de VRS subtipo B (segmento que va desde el aminoácido 5 al 200). La expresión de este gen se encuentra bajo el control del promotor endógeno constitutivo del gen que codifica para la proteína alpha-antigen (85 kD) de BCG. Además, la proteína codificada por este gen posee en su extremo N-terminal la señal peptídica HMKKRGLTVAVAGAAILVAGLSGCSSNKSTTGSGETTTTAAGTTASPGG de la proteína de 19kDa de BCG, que induce su expresión en la membrana de la bacteria. La formulación inmunogénica se encuentra preservada en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a -80°C. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 4°C.

La cepa BCG Pasteur fue transformada, mediante electrotransformación con el plásmido pMV261/F_{5-200}, derivado del plásmido pMV261, el cual reside extracromosomalmente en múltiples copias en la bacteria. Este plásmido codifica un fragmento del gen F de VRS subtipo B (segmento que va desde el aminoácido 5 al 200) fusionado en su extremo N-terminal con la señal peptídico:

HMKKRGLTVAVAGAAILVAGLSGCSSNKSTTGSGETTTTAAGTTASPGG

de la proteína de 19kD de BCG, que induce su expresión en la membrana de la bacteria. La expresión de este gen se encuentra bajo el control del promotor endógeno constitutivo del gen que codifica para la proteína alpha antigen (85kD) de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron hasta $OD_{600\ nm}$ =1, a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado y fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^6 bacterias por 100 µl. Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada en alícuotas con 10^6 bacterias cada una y conservadas a 4°C. Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad contra la proteína F de VRS subtipo A y B.

Ejemplo IV: Formulación inmunogénica que consiste en 10^5 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante simultáneamente para los genes N y M2 de VRS subtipo A. El gen N se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor endógeno constitutivo *hsp60* de BCG y la expresión de la proteína es citoplasmática. El gen M2 se encuentra extracromosomalmente en la bacteria en múltiples copias (2-4 copias por bacteria) bajo el control del promotor endógeno constitutivo del gen que codifica para la proteína alpha antigen (85 kD) de BCG. La proteína codificada por el gen M2 posee en su extremo N-terminal la señal peptídica

HMKKRGLTVAVAGAAILVAGLSGCSSNKSTTGSGETTTTAAGTTASPGG

de la proteína de 19kDa de BCG, que induce su expresión en la membrana de la bacteria. La formulación inmunogénica se encuentra preservada a 4°C liofilizada a partir de la bacteria resuspendida en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) liofilizada conservada a 4°C. Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^5 bacterias por 100 µl.

La cepa BCG Danish fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido pMV361/N, derivado del plásmido pMV361, que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína N de VRS subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor endógeno y constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Luego de verificar que la cepa BCG resultante es recombinante para la proteína N de VRS esta se transformó, mediante electrotransformación con el plásmido pMV206/M2, derivado del plásmido pMV206, el cual reside extracromosomalmente en múltiples copias en la bacteria. La proteína codificada por el gen M2 posee en su extremo N-terminal la señal peptídica HMKKRGLTVAVAGAAILVAGLSGCSSNKSTTGSGETTTTAAGTTASPGG de la proteína 19kD de BCG, que induce su expresión en la membrana de la bacteria. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron (a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado) hasta $OD_{600\ nm}$ =1, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) a una concentración final de 10^5 bacterias por 1 ml. Finalmente se liofilizaron alícuotas de 1 ml con 10^5 bacterias y se conservaron alícuotas a 4°C. Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^5 bacterias por 100 µl. Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad contra las proteínas N y M2 de VRS subtipo A y B.

Ejemplo V: Formulación inmunogénica que consiste 10^4 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen N de VRS subtipo A. El gen se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor endógeno inducible *acr* de BCG, el cual es activo en respuesta a óxido nítrico, baja concentraciones de oxígeno, y fases estacionarias de crecimiento. La expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica se encuentra liofilizada a partir de una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) conservada a 25°C en solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H_2O). Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^4 bacterias por 100 µl.

La cepa BCG Danish fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido $pMV361_{Pacr}$/N, derivado del plásmido pMV361, que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína N de VRS subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor endógeno e inducible del gen *acr*

de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron (a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado) hasta $OD_{600\ nm}$ =1, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBGT: 0,5 g asparragina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada). Finalmente se liofilizaron alícuotas de 1 ml con 10^4 bacterias y se conservaron a 25°C. Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^8 bacterias por 100 µl. Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad contra la proteína N de VRS subtipo A y B.

Ejemplo VI: Formulación inmunogénica que consiste en 10^9 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen N de VRS subtipo A. El gen se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor exógeno de fago T7 de expresión constitutiva en cepas de BCG que co-expresen la polimerasa del fago T7. La expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica se encuentra en una solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H_2O) y fue conservada a-20°C, o puede encontrarse liofilizada y conservada a 4ºC. Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4; 1,47 mM KH_2PO_4, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^9 bacterias por 100 µl.

La cepa BCG Danish fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido $pMV361_{PT7}$/N, derivado del plásmido pMV361, que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína N de VRS subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor T7 activado por la expresión de la polimerasa del fago T7 (Yoon, Y. G., and M. D. Koob. 2005. Transformation of isolated mammalian mitochondria by bacterial conjugation. *Nucleic Acids Res 33:e139*).

La cepa BCG resultante fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido $pMV261_{Amp}$/PolT7, derivado del plásmido pMV261, el cual reside extracromosomalmente en la bacteria en múltiples copias. En este plásmido la resistencia al antibiótico kanamicina (Ahmed, S. U., M. Okamoto, T. Oshikawa, T. Tano, A. Sasai, S. Kan, T. Hiroshima, H. Ohue, Y. Moriya, Y. Ryoma, M. Saito, and M. Sato. 2004. Anti-tumor effect of an intratumoral administration of dendritic cells in combination with TS-1, an oral fluoropyrimidine anti-cancer drug, and OK-432, a streptococcal immunopotentiator: involvement of toll-like receptor 4. In *J Immunother*, Vol. 27, p. 432) ha sido reemplazada por la resistencia al antibiótico higromicina (Higr). La polimerasa T7 del fago T7 se encuentra bajo control del promotor constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado hasta $OD_{600\ nm}$ =1, se centrifugaron a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución diluida Sauton SSI (125 µg $MgSO_4$, 125 µg K_2HPO_4, 1 mg L-asparragina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H_2O) y fue conservada a -80°C. Esta formulación inmunogénica puede conferir inmunidad contra la proteína N de VRS subtipo A y B.

Los ejemplos anteriores se hacen extensivos a formulaciones inmunológicas que contenga una cepa recombinante de *Mycobacterium* atenuada que expresan las proteínas NS2, N, P, M, SH, M2 (ORF1), M2 (ORF2), L, F o G de VRS, como también todas las combinaciones de estas formulaciones. Así mismo los ejemplos se hacen extensivos a formulaciones inmunológicas que contienen una o varias cepas recombinantes de *Mycobacterium* atenuadas; donde dichas bacterias recombinantes contienen genes de proteínas, o fragmentos inmunogénicos de VRS que se encuentran insertos en el genoma bacteriano o en plásmidos extracromosomales, en una o varias copias, y su expresión está comandada por promotores endógenos o exógenos, constitutivos o inducibles, expresadas, de forma soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o como proteínas unidas a la membrana celular.

REIVINDICACIONES

1. Formulación inmunogénica que confiere protección contra la infección o patología causada por el virus respiratorio sincicial, que comprende una cepa recombinante atenuada de *Mycobacterium* en una concentración entre 10^4-10^9 bacterias, CARACTERIZADA por que la cepa recombinante atenuada de *Mycobacterium* expresa al menos una proteína o fragmento inmunogénico del virus respiratorio sincicial seleccionada entre las proteínas N, M2 o F, en una solución tampón salina farmacéuticamente aceptable.

2. La formulación inmunogénica de acuerdo con cláusula 1, caracterizada por que la cepa recombinante atenuada de *Mycobacterium* es la cepa Bacilo de Calmette y Guerin.

3. La formulación inmunogénica de acuerdo con cláusula 1, caracterizada por que el virus respiratorio sincicial corresponde al subtipo A, B o a ambos subtipos.

4. La formulación inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, caracterizada por que al menos una proteína o fragmento inmunogénico del virus respiratorio está seleccionado del genoma del virus respiratorio sincicial.

5. La formulación inmunogénica de la cláusula 4, caracterizada por que dicha proteína o fragmento inmunogénico del virus respiratorio seleccionado del genoma del virus respiratorio sincicial se encuentran insertos en el genoma de *Mycobacterium* o en plásmidos extracromosomales, en una o varias copias, controlados por promotores endógenos o exógenos de *Mycobacterium*, y en que dicha proteína o fragmento inmunogénico del virus respiratorio sincicial están expresados por la cepa de *Mycobacterium* en forma soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o como proteínas unidas a membrana celular.

6. La formulación inmunogénica de la cláusula 1, caracterizada dicha formulación se utiliza además en conjunto con otras formulaciones inmunogénicas, que difieren en la forma que expresan las proteínas o fragmentos inmunogénicos como soluble, soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o proteínas unidas a membrana celular.

7. La formulación inmunogénica de la cláusula 1, caracterizada por que dicha formulación se utiliza además en conjunto con otras formulaciones inmunogénicas que difieren en el número de copias de los genes de las proteínas o fragmentos inmunogénicos del virus respiratorio sincicial, así como en el control de la expresión de las proteínas o fragmentos inmunogénicos del virus respiratorio sincicial, constitutivos o inducibles.

8. La formulación inmunogénica de la cláusula 1 caracterizada por que dicha formulación es estabilizada por congelamiento, liofilización o solución salina tampón para su conservación previa a su uso.

9. La formulación inmunogénica de la cláusula 1, para uso en la inducción de protección contra infecciones del virus respiratorio sincicial y/o la atenuación de la patologia causada por dicho virus en mamíferos.

10. Vacuna que comprende la formulación inmunologica de las cláusulas 1 a 9.

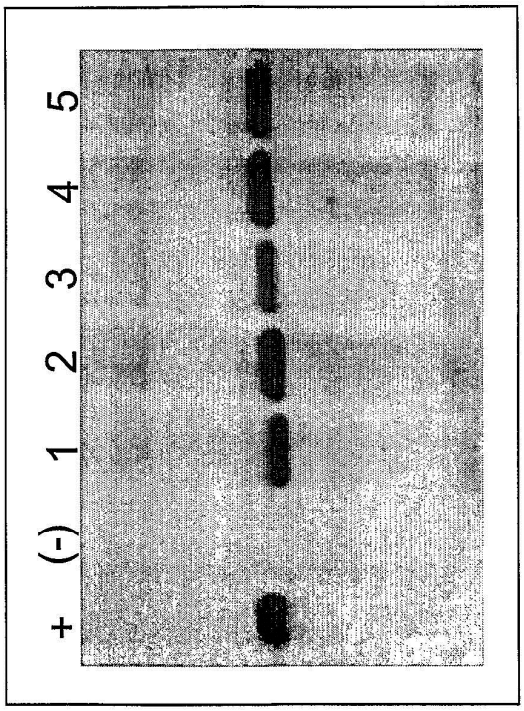


Figura 1

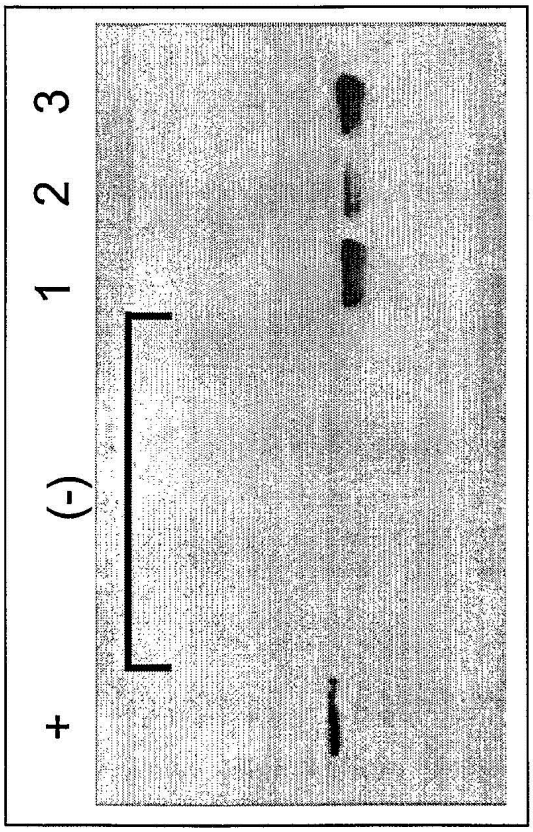
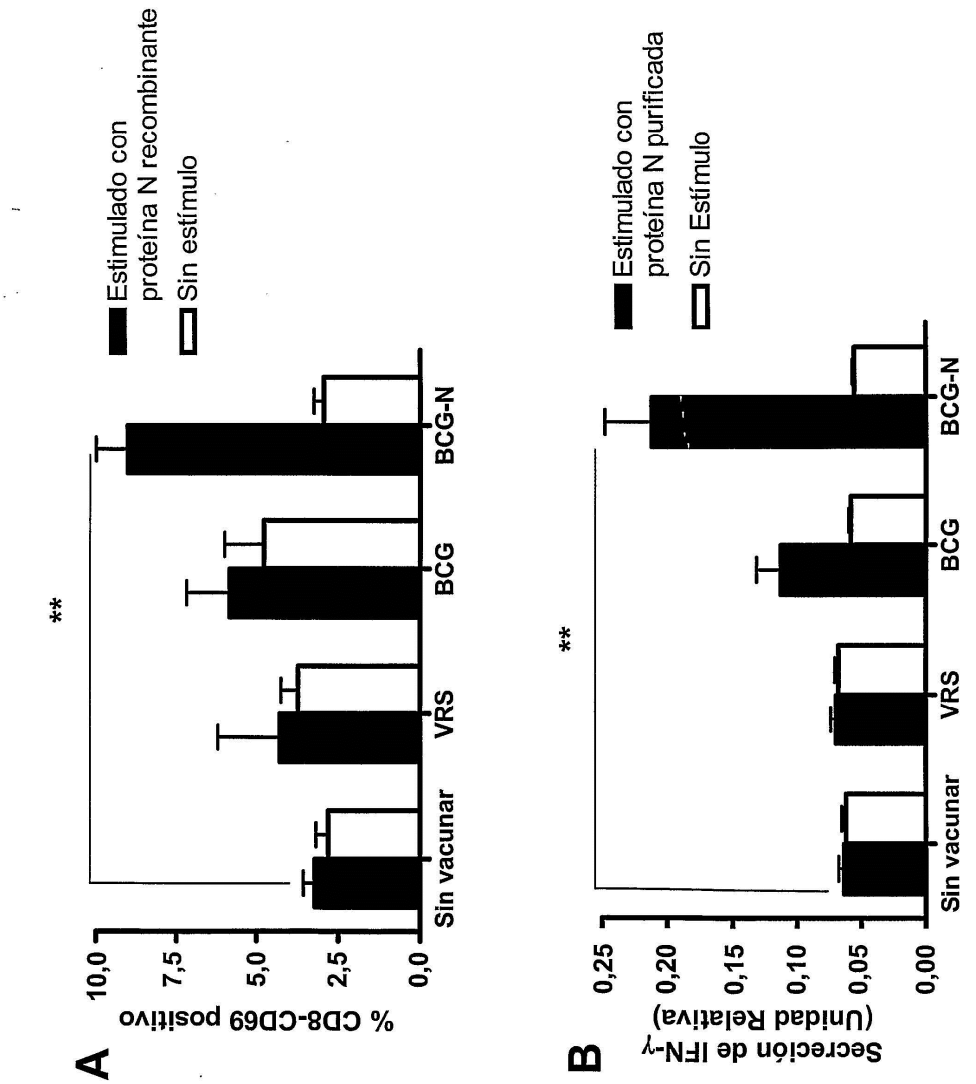


Figura 2

Figura 3


A
% CD8-CD69 positivo
10,0
7,5
5,0
2,5
0,0
**
Sin vacunar
VRS
BCG
BCG-N
Estimulado con proteína N recombinante
Sin estímulo
B
Secreción de IFN-γ (Unidad Relativa)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
**
Sin vacunar
VRS
BCG
BCG-N
Estimulado con proteína N purificada
Sin Estímulo

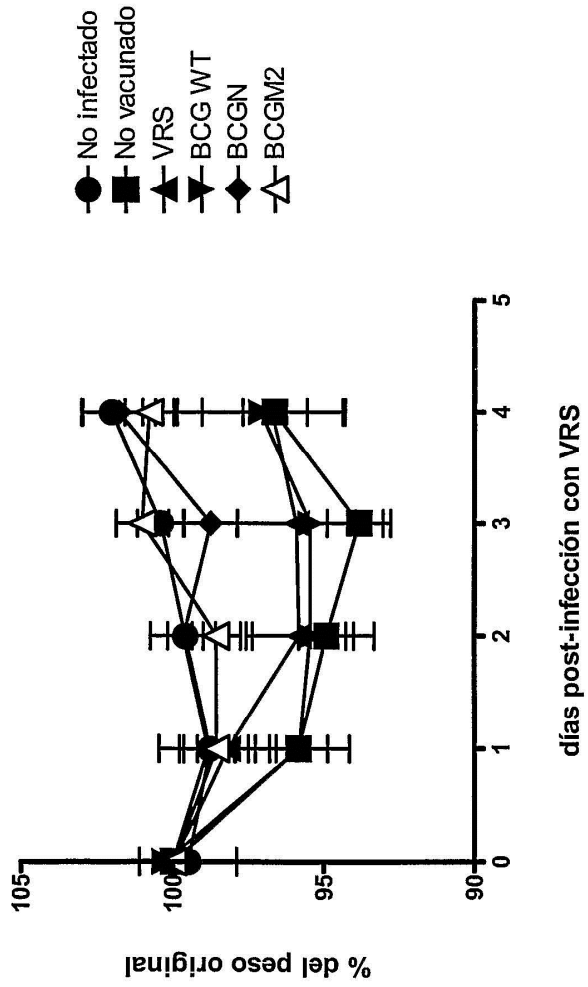

No infectado
No vacunado
VRS
BCG WT
BCGN
BCGM2
105
100
95
90
% del peso original
0
1
2
3
4
5
días post-infección con VRS

Figura 4

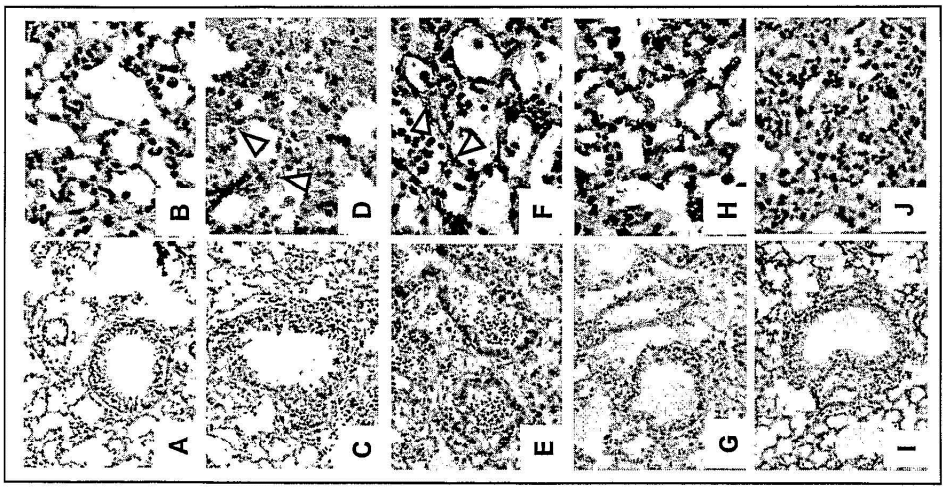


Figura 5