

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 553 763**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
A61K 39/02	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
C12N 15/31	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10769182 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2424974**

(54) Título: **Mutantes de Francisella tularensis y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

29.04.2009 US 213030 P

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

11.12.2015

(73) Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA (100.0%)
1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA**

(72) Inventor/es:

**CONLAN, JOSEPH WAYNE y
SJOSTEDT, ANDERS**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 763 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

Mutantes de *Francisella tularensis* y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de *Francisella tularensis* y usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere a mutantes *clpB* de *F. tularensis*.

10 Antecedentes de la invención

Francisella tularensis es un patógeno bacteriano intracelular facultativo que provoca un espectro de enfermedades denominadas de forma colectiva tularemia. Dos subespecies, subsp. *tularensis* (tipo A) y subsp. *holarctica* (tipo B), pueden provocar una enfermedad grave en seres humanos. En particular, la inhalación de pequeños números de *F. tularensis* tipo A tiene un índice de mortalidad de un 30-60 % si no se trata (Sjostedt, 2007). Por el contrario, las infecciones por *F. tularensis* tipo A iniciadas por vías no respiratorias son mucho menos letales, y las infecciones por tipo B iniciadas por cualquier ruta pueden provocar una enfermedad debilitante, pero no potencialmente mortal en seres humanos.

20 Se ha usado una cepa de tipo B empíricamente atenuada de *F. tularensis* desarrollada hace más de 50 años, cepa para vacuna con microbios vivos de *F. tularensis* (LVS), para proteger frente a la exposición a cepas de tipo A virulentas del patógeno. En pruebas formales usando voluntarios humanos, se demostró que la LVS impartía una protección completa frente a la exposición transdérmica con la cepa de tipo A de SCHU S4, aunque proporcionó una protección menor frente a una exposición en aerosol (Saslaw *et al.* 1961 a, 1961b). Es la única vacuna que ha demostrado formalmente que posee estas propiedades. Por razones de seguridad, nunca se ha autorizado totalmente por la Food and Drug Administration de los EE. UU. (FDA).

30 La secuenciación genómica de cepas de tipo A y tipo B clínicas de *F. tularensis* así como de LVS permitió la identificación de la modificaciones genética en la cepa de vacuna. Parece que la mayoría de la atenuación de LVS frente a cepas de tipo B clínicas se debe a defectos en un gen de *pilus*, *pilA*, y un gen (FTT0918) de función desconocida (Salomonsson *et al.* 2009). La LVS también contiene otras múltiples mutaciones menores que, por separado o de forma colectiva, contribuyen a su atenuación.

35 Se sabe que la LVS provoca tanto una respuesta de anticuerpos como una respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ para varias proteínas de *F. tularensis*. Los experimentos en ratones indican que la capacidad de LVS para provocar que los linfocitos T CD4+ y CD8+ segreguen interferón gamma representa su eficacia frente a cepas de tipo A (Conlan *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005). Sin embargo, los ratones C57BL/6 que producen tanto anticuerpos como linfocitos T que segregan interferón gamma (Woolard *et al.* 2008; Twine *et al.*, 2006) después de vacunación con LVS no están protegidos frente a la exposición con bacterias de tipo A (Chen *et al.* 2003, Wu *et al.* 2005; Green, *et al.* 2005). El desconocimiento del mecanismo de protección de LVS y de las contribuciones relativas de cada una de sus mutaciones para su atenuación total son las barreras principales para su total aprobación por la FDA de los EE. UU. Los antígenos de LVS que son responsables de provocar la inmunidad protectora son desconocidos; adicionalmente, debido a que la LVS es una vacuna generada a partir de una cepa de tipo B, faltan factores de virulencia y otras macromoléculas exclusivas de cepas de tipo A. Estos hechos hacen que sea difícil la tarea de diseñar vacunas basadas en antígenos específicos.

45 En los últimos años, se han usado diversas estrategias de mutagénesis para identificar factores de virulencia de *Francisella* que se podrían alterar para producir cepas de vacunas con microbios vivos novedosas. La mayoría de este trabajo se ha realizado usando LVS o *F. novicida*, una subespecie relacionada del patógeno que solo es virulenta para seres humanos inmunodeprimidos. Este enfoque se basa en dos supuestos críticos respecto al uso de LVS o *F. novicida* como cepas clínicas sustitutas: 1) los genes que se requieren por la virulencia de LVS o *F. novicida* predicen genes con virulencia para aislados clínicos; y 2) las vacunas que protegen frente a LVS o *F. novicida* protegerán de forma previsible frente a cepas clínicas.

55 Sin embargo, la LVS ya es aproximadamente 1 000 000 veces menos virulenta que la cepas de tipo A y B clínicas del patógeno; por tanto, la inhibición de la expresión de cualquier otro gen con virulencia en LVS sólo tendrá un efecto creciente sobre la virulencia. Esto hace que sea imposible la predicción del efecto que cualquiera de dicha mutación tendría sobre una cepa totalmente virulenta de *F. tularensis* en ausencia de las mutaciones innatas de LVS. Además, se ha demostrado que las cepas mutantes de LVS o *F. novicida* pueden proteger a los ratones frente a la exposición a la cepa natural homóloga, pero no frente a la exposición con bacterias de tipo A totalmente virulentas (Cantera *et al.*, 2007; Sebastian *et al.*, 2007). Adicionalmente, los anticuerpos frente a lipopolisacáridos de la superficie protegen frente a *F. novicida* y cepas de tipo B, pero no protegen frente a bacterias de tipo A (Conlan *et al.*, 2002; Fulop *et al.*, 2001; Thomas *et al.* 2007). Finalmente, parece que no existe una correlación entre la protección y la valoración de anticuerpos provocados por vacunas (Saslaw y Carhart 1961).

Además, las vacunas compuestas de células muertas y fracciones de las mismas son eficaces sub-óptimamente frente a *F. tularensis* debido a que dichas preparaciones no generan una inmunidad mediada por células protectora prolongada y resistente. Por tanto, en la actualidad no existe una vacuna aprobada por la FDA para uso general que pueda proporcionar una protección profiláctica frente a la tularemia respiratoria.

- 5 Sumario de la invención
- La presente invención se refiere a mutantes de *Francisella tularensis* y a usos de los mismos. Más específicamente, la
- 10 La presente invención proporciona una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado. La cepa de *F. tularensis* mutante puede estar atenuada. La *F. tularensis* mutante como se acaba de describir se puede derivar de una cepa de *F. tularensis* seleccionada del grupo que consiste en SCHU S4, FSC033 o FSC108, y FSC200.
- 15 La cepa de *F. tularensis* mutante como se describe puede comprender un gen *clpB* eliminado. La cepa de *F. tularensis* mutante como ya se ha descrito también puede comprender otros genes inactivados, por ejemplo, los seleccionados del grupo que consiste en *capB*, *wbtC*, *ggt* y *fupA*, o cualquier combinación de los mismos. En otro modo de realización, la cepa de *F. tularensis* mutante puede ser el mutante CCUG con número de depósito CCUG 59672.
- 20 La presente invención también proporciona una composición que comprende una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado, como se describe anteriormente. La composición puede ser una composición de vacuna *anti-Francisella*. La composición también puede comprender un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La cepa de *F. tularensis* mutante en la composición como se describe anteriormente puede estar viva.
- 25 La presente solicitud describe adicionalmente un procedimiento para conferir inmunidad frente a *F. tularensis* que comprende administrar una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado, o una composición que comprende dicho mutante. La administración del mutante o composición se puede realizar por vía intradérmica (i.d.), por vía subcutánea, por escarificación, por vía intramuscular, por vía oral o por inhalación. El huésped puede ser un
- 30 animal o un ser humano. El procedimiento como se describe anteriormente también puede comprender una etapa de refuerzo (es decir, una segunda administración) posterior a la primera administración de la cepa de *F. tularensis* mutante.
- 35 Adicionalmente, la presente solicitud describe un procedimiento de producción de una cepa de *F. tularensis* mutante como se describe anteriormente. El procedimiento puede comprender las etapas de:
- 40 a) obtener las células de una cepa de *F. tularensis* virulenta;
 b) inactivar el gen *clpB*;
 c) seleccionar células viables con virulencia atenuada e inactivación de *clpB*;
 d) aislar las células con virulencia atenuada e inactivación de *clpB*.
- 45 Los ejemplos en el presente documento muestran que una cepa mutante de *F. tularensis* SCHU S4 con un gen *clpB* alterado es menos virulenta y más eficaz que LVS. Cuando se administra por vía oral o por vía intradérmica, la cepa de SCHU S4Δ*clpB* protege a los ratones más eficazmente que LVS frente a la exposición en aerosol con bacterias naturales. Por tanto, SCHU S4Δ*clpB* se puede considerar una vacuna candidata frente a tularemia clínica. La delección de uno o más genes con virulencia adicionales de SCHU S4Δ*clpB* para proteger además frente a la reversión se engloba por la presente invención.
- 50 Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes en vista de la siguiente descripción. La descripción detallada y los ejemplos, aunque indican modos de realización preferentes de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.
- 55 Breve descripción de los dibujos
- 55 Estas y otras características de la invención se describirán ahora, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- 60 La FIGURA 1 muestra la secuencia de ADN del gen *clpB* de la cepa de *F. tularensis* SCHU S4 (SEQ ID NO: 1). La secuencia comprende 2577 nucleótidos. El gen *clpB* codifica una proteína de 859 aminoácidos putativa (Identificación de proteínas Entrez CAG46402,1) de peso molecular 95.929 kD.
- 65 La FIGURA 2 es un gráfico que muestra la supervivencia de BALB/c (símbolos abiertos) y C3H/HeN (símbolos cerrados) después de inmunización i.d. con 10^5 UFC de LVS (cuadrados), SCHU AV (círculos), SCHU S4Δ*clpB* (triángulos invertidos) o SCHU S4Δ*clpB* (triángulos).

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra la supervivencia de BALB/c (símbolos abiertos) y C3H/HeN (símbolos cerrados) después de inmunización oral con 10^8 UFC de LVS (cuadrados), SCHU AV (círculos), SCHU S4ΔclpB (triángulos invertidos) o SCHU S4ΔclpB (triángulos).

5 La FIGURA 4 es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones BALB/c después de una inmunización i.d. con 10^5 UFC de LVS (invertidos triángulos) o SCHU S4ΔclpB (diamante) y posterior exposición respiratoria con 10, 100, o 1000 UFC de SCHU S4 (FIGURAS 4A, 4B y 4C, respectivamente). *, supervivencia significativamente mayor que en ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con LVS ($P<0,05$); **, supervivencia significativamente mayor que en ratones sin tratamiento previo.

10 La FIGURA 5 es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones C57BL/6 después de inmunización i.d. con 10^5 UFC de LVS (triángulos invertidos) o SCHU S4 ΔclpB (diamante) y posterior exposición i.d. con 20 (A), 200 (B) o 2000 (C) UFC de SCHU S4 o exposición i.n. con 35 UFC (D).

15 La FIGURA 6 es un gráfico que compara la sensibilidad *in vitro* al choque térmico de SCHU S4 y varios mutantes de delección del mismo. Se suspendieron SCHU 4S natural y varios mutantes de delección del mismo en solución salina a una concentración de aproximadamente 10^9 UFC/ml. Se calentaron las muestras a 50 °C y se monitorizó la supervivencia el transcurso de 30 minutos. Sólo SCHU S4ΔclpB no pudo soportar este estrés térmico, perdiendo una viabilidad de más de un 99 % en 30 minutos.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de *Francisella tularensis* y a usos de los mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere a mutantes *clpB* de *F. tularensis*.

25 La presente invención proporciona una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado y el mutante que se deriva de la cepa de *F. tularensis* puede ser SCHU S4, FSC033, o FSC108, o FSC200. La cepa de *F. tularensis* mutante puede estar atenuada. La cepa de *F. tularensis* mutante como ya se ha descrito también puede comprender otros genes inactivados.

30 *Francisella tularensis* es un patógeno bacteriano intracelular facultativo que provoca un espectro de enfermedades denominadas de forma colectiva tularemia. La cepa de *F. tularensis* referida anteriormente puede ser una cepa de tipo A (subespecie *tularensis*) o tipo B (subespecie *holoarctica*); en un ejemplo no limitante específico, la cepa de *F. tularensis* puede ser una cepa de tipo A. En un ejemplo específico no limitante, el mutante se puede derivar de la cepa de *F. tularensis* clínica SCHU S4.

35 La cepa de *F. tularensis* mutante de la presente invención comprende un gen *clpB* inactivado. Este gen codifica una proteína de choque térmico que, sin quedar vinculado a teoría alguna, puede proteger al patógeno del estrés ambiental al que se enfrenta en el huésped infectado. El gen se puede "inactivar" por cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, y sin querer limitarse, se puede inactivar el gen *clpB* por su delección completa o parcial de la cepa de *F. tularensis* (usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Golovliov *et al.*, (2002)), por una mutación de inactivación tal como la técnica, por ejemplo, como se describe por Golovliov *et al.*, (2002)), por una mutación por inactivación tal como una múltiple sustitución de nucleótidos, o por una inserción de inactivación tal como una inserción de transposón (usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos por Kadzhaev *et al.*, (2009)). En un ejemplo específico no limitante, el gen *clpB* se puede inactivar por delección completa de la cepa mutante. Cabe señalar, sin embargo, que sólo los procedimientos que dan como resultado la inactivación del gen *clpB* se engloban por la presente invención. La inactivación del gen *clpB* puede dar como resultado la atenuación completa o parcial de la cepa de *F. tularensis* mutante.

40 50 Por el término "atenuación" o "atenuado", se quiere decir que el patógeno se mantiene vivo, pero presenta virulencia reducida de modo que no provoca la enfermedad provocada por el patógeno virulento. La atenuación de la cepa particular de la presente invención puede resultar de la inactivación del gen *clpB*, o puede ser el resultado de otros mecanismos para la atenuación, por ejemplo, y sin limitarse a, mutagénesis, delección o inactivación de genes diana, o atenuación natural. En un modo de realización no limitante, se puede conferir la atenuación de la cepa por una combinación de los factores mencionados anteriormente.

55 En un ejemplo no limitante específico, la cepa de *F. tularensis* mutante puede ser el mutante CCUG con número de depósito CCUG 59672.

60 65 La cepa de *F. tularensis* mutante de la presente invención puede comprender además genes inactivados adicionales. El gen inactivado adicional puede ser un gen con virulencia (es decir, un gen que contribuye a la virulencia del patógeno), o puede ser cualquier otro tipo de gen. Por ejemplo, pero sin pretender ser limitante de ningún modo, se puede inactivar uno o más de uno de otro gen con virulencia para evitar la reversión y/o puede contribuir a la atenuación de la cepa de *F. tularensis* mutante. En un ejemplo no limitante específico, el uno o más de un gen inactivado adicional se puede seleccionar del panel de gen *capB*, *wbtC*, *ggt* y *fupA*, o una combinación de los mismos.

Los genes inactivados adicionales puede que no muestren ningún efecto adicional de atenuación de la cepa de *F. tularensis* mutante, o pueden contribuir a la atenuación de la cepa.

5 La presente invención proporciona además un procedimiento para producir la cepa de *F. tularensis* mutante como se describe en el presente documento. El procedimiento puede comprender las etapas de:

- 10 a) obtener las células de una cepa de *F. tularensis* virulenta;
- b) inactivar el gen *clpB*;
- c) seleccionar células viables con virulencia atenuada e inactivación de *clpB*; y
- d) aislar las células con virulencia atenuada e inactivación de *clpB*.

15 La cepa de *F. tularensis* virulenta proporcionada en la etapa a) del procedimiento descrito actualmente puede ser cualquier cepa virulenta conocida en la técnica; la cepa debe ser "virulenta" ya que puede provocar cualquier enfermedad en el espectro denominado tularemia, ya sea leve o grave. La cepa de *F. tularensis* virulenta puede ser SCHU S4, FSC033, o FSC108, o FSC200. En un ejemplo no limitante específico, la cepa de *F. tularensis* puede ser SCHU S4. En una alternativa, la cepa de *F. tularensis* en la etapa a), puede ser una cepa de *F. tularensis* mutante, en la que las mutaciones puede que se hayan introducido para atenuar el patógeno (de forma parcial o bien completa) o con otros propósitos.

20 20 En la etapa b), el gen *clpB* se puede inactivar usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica; por ejemplo, y sin quedar limitado de ningún modo, el gen se puede inactivar por su delección completa o parcial de la cepa de *F. tularensis*, por una mutación de inactivación tal como una sustitución de nucleótidos múltiple, o por una inserción de inactivación tal como una inserción de transposón. En un ejemplo no limitante específico, el gen *clpB* se puede inactivar por su delección completa.

25 25 En las etapas c) y d), las células con virulencia atenuada e inactivación de *clpB* se seleccionan y se aíslan, respectivamente. Estas etapas se pueden realizar usando cualquier procedimiento adecuado conocido; por ejemplo, y sin quedar limitado de ningún modo, el procedimiento de selección se puede realizar usando modelos animales. Los procedimientos de aislamiento y selección de las células/cepas son bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, y sin quedar limitado de ningún modo, los procedimientos de selección y aislamiento se describen por Kadzhaev *et al.*, (2009) y Golovliov *et al.*, (2002).

30 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado, como se describe anteriormente. La composición puede ser una composición de vacuna anti-*Francisella*. Además de la cepa de *F. tularensis* mutante, la composición puede comprender un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El diluyente, excipiente o vehículo puede ser cualquier diluyente, excipiente o vehículo adecuado conocido en la técnica, y debe ser compatible con otros ingredientes en la composición, con el procedimiento de administración de la composición, y no es perjudicial para el receptor de la composición. La composición puede estar en cualquier forma adecuada; por ejemplo, la composición se puede proporcionar en forma de suspensión, forma de polvo (por ejemplo, liofilizada), en forma de cápsula o comprimido. Por ejemplo, y sin quedar limitado, cuando la composición se proporciona en forma de suspensión, el vehículo puede comprender agua, solución salina, un tampón adecuado, o aditivos para mejorar la solubilidad y/o estabilidad; la reconstitución para producir la suspensión se efectúa en un tampón a un pH adecuado para garantizar la viabilidad de las bacterias. En un ejemplo no limitante específico, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina. Los polvos secos también pueden incluir aditivos para mejorar la estabilidad y/o vehículos para incrementar la masa/volumen; por ejemplo, y sin quedar limitado, la composición en polvo seco puede comprender sacarosa o trehalosa. Estaría dentro de la competencia de un experto en la técnica preparar las composiciones adecuadas comprendiendo los presentes compuestos.

35 40 45 50 55 60 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para conferir inmunidad frente a *F. tularensis* que comprende administrar una cepa de *F. tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado, o una composición que contiene dicho mutante. La cepa de *F. tularensis* mutante se puede administrar por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, y sin quedar limitado, la cepa de *F. tularensis* mutante se puede administrar por vía intradérmica (i.d.), por vía subcutánea, por escarificación, por vía intramuscular, por vía oral o por inhalación. El procedimiento puede comprender una etapa de refuerzo posterior a la administración inicial de la cepa de *F. tularensis* mutante. Esta segunda administración de la cepa de *F. tularensis* mutante se puede realizar usando la misma vía de administración o una diferente. La segunda administración también se pueden administrar a cualquier intervalo de tiempo adecuado; por ejemplo, y sin quedar limitado, el refuerzo se puede administrar de 4 a 52 semanas después de la administración inicial; por ejemplo, y sin quedar limitado, el refuerzo se puede administrar 4, 8, 12, 20, 26, 32, 38, 44 o 52 semanas después de la administración inicial o cualquier momento entre las mismas. En un ejemplo no limitante específico, el refuerzo se puede administrar 8 semanas después de la administración inicial.

65 La cepa de *F. tularensis* mutante se puede usar para vacunar un huésped; el huésped puede ser un huésped humano o un huésped animal. La dosificación para la administración dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y peso del huésped y la especificidad de la composición formulada. En base a la experiencia con LVS, y sin quedar

limitado de ningún modo, se puede usar una dosis de aproximadamente 10^7 UFC para la administración a seres humanos. Estaría dentro de las capacidades de los expertos en la técnica determinar las dosificaciones apropiadas para la vacunación.

- 5 Las infecciones de seres humanos con cepas de tipo A de *F. tularensis* son escasas, lo que hace que sea difícil llevar a cabo ensayos clínicos de fase III para determinar la eficacia de vacunas anti-*Francisella* novedosas. En cambio, la FDA ha ideado una política, la Normativa sobre animales (*Animal Rule*) (<http://www.fda.gov/cber/rules/humeffic.htm>; véase también el Registro Federal: 31 de mayo de 2002 (volumen 67, Número 105, páginas 37988-37998)), que permite la aprobación de vacunas anti-*Francisella* en base a estudios de eficacia realizados exclusivamente con modelos animales. La Normativa sobre animales requiere que cualquiera de dichos modelos animales deben imitar la enfermedad humana, y que la protección provocada por la vacuna en animales debe predecir la eficacia en seres humanos.
- 10 Estudios publicados previamente han demostrado que la delección del gen *clpB* de LVS o *F. novicida* dio como resultado la atenuación (Meibom *et al* 2008, Tempel *et al* 2006). También se ha demostrado que LVS con un gen *clpB* alterado protege a los ratones frente a la exposición intraperitoneal con LVS natural altamente atenuado (Meibom *et al* 2008). Sin embargo, estos hallazgos no se pueden usar para predecir la eficacia de dicho mutante frente a la exposición con una cepa de tipo A de por medio de la vía i.p. o de cualquier otra vía. Ni tampoco se pueden usar para predecir el fenotipo de una cepa de tipo A con un gen *clpB* defectuoso.
- 15 20 La virulencia de LVS se reduce en un $>99,9999\%$ ($=1\,000\,000$ veces menos) a la de las cepas de tipo A y B del patógeno. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de genes con virulencia adicional en LVS sólo tendrá un efecto creciente sobre la virulencia. Esto no se puede usar para predecir qué efecto, si lo hay, tendrá una mutación sobre una cepa totalmente virulenta de *F. tularensis* en ausencia de mutaciones previas presentes en LVS. Por ejemplo, se ha demostrado que al eliminar el gen *katG* de LVS disminuye adicionalmente su virulencia para los ratones, pero al eliminar el mismo gen de SCHU S4 no afectó a su virulencia (Lindgren *et al* 2007). Hallazgos similares se aplican a los genes *tolC* y *chi A* (Kadzhaev, *et al.* 2009).
- 25 30 Adicionalmente, los anticuerpos frente a lipopolisacárido de superficie solo son suficientes para proteger a los ratones de la infección con LVS o *F. novicida*, pero dichos anticuerpos no protegen frente a bacterias de tipo A (Conlan *et al* 2002, Fulop *et al* 2001; Thomas *et al* 2007). De forma similar, las cepas mutantes de LVS o *F. novicida* pueden proteger a los ratones frente a la exposición a la cepa natural homóloga, pero no frente a la exposición con bacterias de tipo A totalmente virulentas (Cantera *et al* 2007; Sebastian *et al* 2007). Por tanto, no es factible evaluar los efectos de la mutación de una cepa de *F. tularensis* de tipo A usando los modelos de LVS o *F. novicida*.
- 35 40 Por tanto, no existe una manera clara de predecir *a priori* si la mutación de un gen particular atenuará la *F. tularensis* de tipo A. Además, la mera atenuación de una cepa de tipo A no predice su capacidad para actuar como un cepa de vacuna que pueda proteger a los ratones frente a la exposición con la cepa natural (Enroscarse *et al* 2005; Conlan, *et al.* 2010).
- 45 50 Los ejemplos en el presente documento muestran que una cepa mutante de *F. tularensis* SCHU S4 con un gen *clpB* alterado es menos virulenta y más eficaz que LVS por las vías de administración intradérmica y oral. Por vía intranasal, se demuestra que la dosis letal de SCHU S4Δ*clpB* es al menos 100 veces mayor que la de LVS. Cuando se administra por vía oral o por vía intradérmica, la cepa de SCHU S4Δ*clpB* protege a los ratones mucho más eficazmente que LVS frente a la exposición en aerosol con bacterias naturales. Por tanto, SCHU S4Δ*clpB* se puede considerar una vacuna candidata altamente definida frente a tularemia clínica. La delección de genes con virulencia adicionales de SCHU S4Δ*clpB* para garantizar además frente a la reversión se engloba por la presente invención.
- 55 60 Se comparó el mutante SCHU S4Δ*clpB* frente a LVS para determinar su capacidad para provocar protección frente a la exposición pulmonar después de vacunación i.d. tradicional (LVS está indicado para administración por escarificación solo a seres humanos). SCHU S4Δ*clpB* mostró un nivel de atenuación similar a LVS (>1 millón de veces frente a SCHU S4 natural por vía i.d.) y fue tan eficaz como LVS para combatir la exposición i.d. con >1000 DL₅₀ del patógeno totalmente virulento.
- 65 65 En una exposición con aerosol, SCHU S4Δ*clpB* fue superior a LVS en ambas cepas de ratón sometidas a prueba. Además, sólo SCHU S4Δ*clpB* proporcionó una protección significativa frente a la exposición con aerosol en ambos ratones BALB/c y C3H/HeN cuando se administró por vía oral. La vacunación oral primaria fue inferior a la vacunación i.d. para todas las vacunas de prueba. Sin embargo, el refuerzo oral mejoró la eficacia SCHU S4Δ*clpB* administrado por vía oral en ratones C3H/HeN.
- SCHU S4Δ*clpB* provocó una infección subletal en ratones BALB/c cuando se administró i.d. a una dosis de 10^5 UFC, que era similar a los resultados previos obtenidos con LVS. Sin embargo, este experimento no reveló ninguna explicación obvia para la mejor protección frente a la exposición con aerosol provocada por SCHU S4Δ*clpB*. En cambio, esto se correlacionó con una capacidad potenciada de los ratones inmunizados con el mismo para controlar una posterior exposición con aerosol con SCHU S4. A este respecto, la inmunización con LVS o SCHU S4Δ*clpB*

restringió eficazmente la bacteriemia que se desarrolla durante la fase final de la tularemia letal primaria lo que sugiere que este aspecto de la infección contribuye poco a la morbilidad y mortalidad. Previamente, se demostró que los anticuerpos anti-LVS secuestran rápidamente el LVS de la sangre al hígado (Anthony y Kongshavn, 1987), y presumiblemente, pero sin quedar vinculado a ninguna teoría, el mismo mecanismo interviene en el presente estudio.

5 Sin embargo, en general se cree que estos anticuerpos desempeñan solo un papel menor en la protección frente a una infección pulmonar o sistémica. En su lugar, parece que los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos son cruciales para controlar estos aspectos de la infección.

10 Durante los primeros cuatro días de infección, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB pudieron controlar la infección pulmonar mejor que los ratones inmunizados con LVS. Las cargas bacterianas en el hígado y bazo también fueron significativamente más menores en los primeros ratones; sin quedar vinculado a ninguna teoría, estos ratones pueden haber evitado mejor la diseminación a órganos internos y/o controlado mejor la infección en los mismos. El día 7, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB albergaron 100 veces menos bacterias en sus pulmones, y 1000 veces menos bacterias en sus hígados y bazos que los ratones inmunizados con LVS.

15 15 En base a los resultados en los modelos animales presentados en el presente documento y en la Normativa sobre animales de la FDA, la cepa de *F. tularensis* mutante de la presente invención constituye un candidato excelente como vacuna anti-*Francisella* tanto para animales como para seres humanos.

20 20 La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos son solo con propósitos ilustrativos y no se deben usar para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Generación de cepas bacterianas

25 25 Se usó el aislado ATCC 29684 de LVS para su comparación con vacunas a base de SCHU S4. Se han descrito previamente SCHU AV atenuado naturalmente y el mutante de delección SCHU S4ΔigC (Enroscarse *et al.*, 2005); estos mutantes se incluyeron como controles de vacunas a base de SCHU S4 positivo y negativo, respectivamente.

30 30 Se generó una nueva cepa mutante SCHU S4ΔclpB usando procedimientos conocidos en la técnica, en general, descritos por Golovliov *et al* (2002). En resumen, se construyó una delección en fase del gen *clpB* por intercambio alélico en base a la integración y escisión de un plásmido suicida que lleva en dirección 5' y en dirección 3' secuencias del gen diana. Se amplificaron las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del gen por PCR. Los fragmentos de PCR para el gen contenían secuencias complementarias en el extremo 3' del fragmento en dirección 5' y en el extremo 5' del fragmento en dirección 3' que se hibridaron durante un segundo ciclo de la PCR. Después de la digestión por enzimas de restricción y la purificación, se clonaron los fragmentos de PCR al vector suicida pDMK2, que se transformó después a *Escherichia coli* S17-1. Se llevó a cabo la conjugación a *F. tularensis* SCHU S4 como se describe previamente (Golovliov *et al* 2002). Se seleccionaron los conjugados en un medio que contenía 10 mg/ml de canamicina y 50 mg/ml de polimixina B y se confirmó por PCR. Para seleccionar un segundo acontecimiento de recombinación, se plaquearon los conjugados en un medio que contenía sacarosa al 5 % y se identificó la delección del gen por PCR y se verificó la localización exacta por secuenciación. La estrategia dio lugar a la delección de 2463 de las 2580 pb para *clpB*. La secuencia del gen *clpB* (SEQ ID NO:1) se muestra en la figura 1.

40 45 Para estudios en animales, se prepararon cultivos de reserva de todas las cepas haciéndolas crecer como césped confluyente sobre agar con base de cistina complementado con hemoglobina (CHAH) al 1 % (p/v). Se recogieron las bacterias después de una incubación de 48-72 h a 37 °C en medio de congelación que comprende caldo de Mueller Hinton modificado que contenía sacarosa al 10 % p/v. Se alicuotaron las reservas en volúmenes de 1 ml y se almacenaron a -80 °C a una concentración de 10¹⁰-10¹¹ UFC/ml.

50 50 La cepa mutante generada actualmente SCHU S4ΔclpB se depositó con la colección de cultivos de la Universidad de Gotemburgo (*Culture Collection University of Gothenburg*, CCUG; Sahlgrenska Academy of the University of Gothenburg, Box 7193, SE-402 34, Göteborg, Suecia); se ha concedido el depósito con el número de acceso CCUG 59672.

55 55 *Ejemplo 2: Eficacia de la vacunación i.d. frente a la exposición con aerosol*

Se examinó el grado de protección frente a la inhalación de tularemia provocada por inmunización i.d. con la cepa de *F. tularensis* mutante del ejemplo 1.

60 65 La DL₅₀ i.d. para LVS es >10⁸ UFC, y 10⁵ UFC administrada i.d. protege frente a la exposición sistémica pero sin aerosol (Conlan *et al* 2003; Chen *et al* 2003). Por lo tanto, se eligió 10⁵ UFC como la dosis inmunizante i.d. para todas las cepas de vacuna de prueba, y los ratones BALB/c y C3H/HeN como los huéspedes modelo para determinar su eficacia. Se inyectaron inóculos i.d. en un pliegue de piel en la mitad del vientre en un volumen de 0,05 ml de solución salina. Se realizaron exposiciones con aerosol seis semanas después de la vacunación con una dosis baja (20 UFC) de aerosol de la cepa de tipo A SCHU S4 usando una cámara de exposición únicamente nasal InTox Products como se

describe previamente (Conlan *et al* 2002). Se realizó todo el trabajo animal en instalaciones de nivel 3 de confinamiento para animales pequeños aprobadas para organismos peligrosos y con licencia federal. Se examinaron los ratones diariamente para detectar signos de infección y cuando fue factible se sacrificaron por asfixia con CO₂ tan pronto como presentaron signos de morbilidad irreversible.

5 Previamente se demostró que LVS, pero no SCHU AV ni SCHU S4ΔigIC, a esta dosis provocó necrosis obvia en el lugar de la inyección y signos visibles de infección (pelaje rizado) en ratones BALB/c (Twine *et al* 2005). A este respecto, SCHU S4ΔclpB era similar a SCHU AV (datos no mostrados). Como se esperaba a partir de estudios previos, el LVS a una dosis i.d. de 10⁵ UFC mató a unos pocos ratones BALB/c (2/15), mientras que todos los ratones 10 C3H/HeN sobrevivieron (figura 2). Se observó el resultado inverso con SCHU AV que mató a 2/15 de los ratones C3H/HeN, pero a ninguno de los ratones BALB/c. Ambas cepas de ratón sobrevivieron a la inmunización i.d. con SCHU S4ΔclpB y SCHU S4 ΔigIC.

15 También se ha demostrado previamente que ratones BALB/c inmunizados i.d. con LVS o SCHU AV, pero no con SCHU S4ΔigIC, sobrevivieron a una exposición i.d. posterior a 1000 DL₅₀ de *F. tularensis* de tipo A totalmente virulenta (Twine *et al*, 2005). SCHU S4ΔclpB protegió frente a una exposición i.d. similar (no mostrado). Los ratones BALB/c inmunizados con SCHU S4ΔclpB estaban mejor protegidos frente a una exposición con aerosol con SCHU S4, en comparación con los ratones inmunizados con LVS. Ambas vacunas eran igualmente eficaces en ratones C3H/HeN. Los resultados se muestran en la tabla 1.

20 Tabla 1. Supervivencia de ratones inmunizados i.d. después de exposición con aerosol con SCHU S4.

Cepa de ratón	vacuna	Tiempo hasta la muerte de los ratones individuales (días)	Mediana del tiempo hasta la muerte (días)
BALB/c	ninguna	5,5,5,5,5	5
BALB/c	LVS	7,7,8,9,12	8 ¹
BALB/c	SCHU AV	6,9,10,10,12	10 ¹
BALB/c	SCHU S4ΔclpB	8,11, >28, >28, >28	19 ¹
BALB/c	SCHU S4ΔigIC	5,5,6,6,6	6
C3H/HeN	ninguna	5,5,5,5,5	5
C3H/HeN	LVS	9,9,11,12,14	11 ¹
C3H/HeN	SCHU AV	6,6,6,7,>28	6 ¹
C3H/HeN	SCHU S4 Δ clpB	5,8,10,11,14	10 ¹
C3H/HeN	SCHU S4 Δ igIC	5,5,5,6,6	5

¹ supervivencia significativamente mayor (P<0,05 comparación chi² de curvas de supervivencia) que para los ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con SCHU ΔigIC

25 Todos (n=6) los ratones BALB/c y C3H/HeN sin tratamiento previo murieron el día 5 de la exposición y todos los ratones (n=5) inmunizados con SCHU S4ΔigIC murieron los días 5 o 6. Todas las demás candidatas a vacuna provocaron un incremento estadísticamente significativo (P<0,02 comparación de curvas de supervivencia por la prueba de Chi al cuadrado) en la mediana de la supervivencia en comparación con los ratones BALB/c sin tratamiento previo o ratones BALB/c inmunizados con SCHU S4ΔigIC. Los ratones BALB/c inmunizados con SCHU S4ΔclpB mostraron la mejor mediana de la supervivencia (19 días) y esto fue significativamente (P<0,05) mayor que la supervivencia de los ratones BALB/c inmunizados con LVS. En ratones C3H/HeN, LVS y SCHU S4ΔclpB provocaron un incremento estadísticamente significativo de la supervivencia en comparación con los ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con SCHU S4ΔigIC (p<0,02). El LVS produjo una ligera mejora en la mediana de la supervivencia en ratones C3H/HeN frente a BALB/c expuestos por aerosol con SCHU S4 (11 frente a 8 días; P>0,05).

30 35 *Ejemplo 3: Eficacia de la vacunación oral frente a la exposición con aerosol*

35 Se examinó el grado de protección frente a la inhalación de tularemia provocada por inmunización oral con las cepas de *F. tularensis* mutantes del ejemplo 1.

40 40 Se ha demostrado que los ratones BALB/c sobreviven a la inmunización oral con 10⁸ UFC de LVS y posteriormente demuestran algo de protección frente a la exposición con aerosol con *F. tularensis* de tipo A (KuoLee *et al* 2007). Por este motivo, se eligió 10⁸ UFC como la dosis inmunizante oral para todas las cepas de vacuna de prueba, y los ratones

BALB/c y C3H/HeN como los huéspedes modelo para determinar su eficacia. Para inmunización oral, se alimentó a los ratones una vez con una cepa de vacuna elegida suspendida en 0,2 ml de solución salina.

Se ha demostrado que la mayoría de los ratones BALB/c inmunizados una vez por vía oral con 10^8 LVS están completamente protegidos frente a la exposición con aerosol a dosis baja con *F. tularensis* de tipo A, pero esta inmunidad mengua sustancialmente después de 4 semanas (KuoLee *et al* 2007). Para determinar si las presentes cepas de vacuna podrían ser superiores a LVS en este respecto, se realizaron exposiciones con aerosol 6 semanas después de la vacunación, cuando se espera que la protección provocada por LVS haya disminuido considerablemente. Se realizaron exposiciones con aerosol seis semanas después de la vacunación con una dosis baja ($\square 20$ UFC) de aerosol de la cepa de tipo A SCHU S4 usando una cámara de exposición únicamente nasal InTox Products como se describe previamente (Conlan *et al* 2002). Se realizó todo el trabajo animal en instalaciones de nivel 3 de confinamiento para animales pequeños aprobadas para organismos peligrosos y con licencia federal. Se examinaron los ratones diariamente para detectar signos de infección y cuando fue factible se sacrificaron por asfixia con CO₂ tan pronto como presentaron signos de morbilidad irreversible.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Supervivencia de ratones inmunizados por vía oral después de exposición con aerosol con SCHU S4.

Cepa de ratón	vacuna	Tiempo hasta la muerte de los ratones individuales (días)	Mediana del tiempo hasta la muerte (días)
BALB/c	ninguna	5,5,5,5,5	5
BALB/c	LVS	5,5,5,7,7	5
BALB/c	SCHU AV	5,5,5	5
BALB/c	SCHU S4 Δ clpB	9,9,16,>28,>28	16 ¹
BALB/c	SCHU S4 Δ igIC	5,5,5,5	5
C3H/HeN	ninguna	5,5,5,5,5	5
C3H/HeN	LVS	4,5,5,5	5
C3H/HeN	SCHU AV	5,5,5,5	5
C3H/HeN	SCHU S4 Δ clpB	5,9,12,13,16	12 ¹
C3H/HeN	SCHU S4 Δ igIC	5,5,5,6,6	5

¹ supervivencia significativamente mayor ($P<0,05$) que para ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con SCHU Δ igIC.

Por esta vía de vacunación, SCHU AV y SCHU S4 Δ igIC eran completamente no virulentos para ambos ratones BALB/c y C3H/HeN. De forma similar, LVS y SCHU S4 Δ clpB estaban completamente atenuados para ratones BALB/c, pero cada uno mató a 5/15 de los ratones C3H/HeN (figura 3).

Todos los ratones de control murieron el día 5 de la exposición, al igual que todos los ratones C3H/HeN inmunizados con LVS o SCHU AV; 2/5 de los ratones C3H/HeN inmunizados por vía oral con SCHU S4 Δ igIC sobrevivieron hasta el día 6. Todos los ratones BALB/c inmunizados con SCHU AV o SCHU S4 Δ igIC murieron el día 5, mientras que 2/5 de los ratones BALB/c inmunizados con LVS sobrevivieron hasta el día 7. Por el contrario, los ratones C3H/HeN y BALB/c inmunizados por vía oral con SCHU S4 Δ clpB sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones de control ($P<0,01$).

Ejemplo 4: Efecto del refuerzo oral sobre la eficacia de la vacuna

Ocho semanas después de vacunación i.d. u oral, como se describe en los ejemplos 2 y 3, se volvieron a inmunizar por vía oral algunos ratones con 10^8 UFC de la cepa mutante homóloga. Al contrario que la inmunización oral primaria, no murió ningún ratón después del refuerzo oral. Seis semanas después del refuerzo, se expusieron los ratones a un aerosol de 20 UFC de SCHU S4 (como se describe anteriormente) y se monitorizó su supervivencia (tablas 3 y 4). El refuerzo oral de ratones BALB/c inmunizados i.d. no mejoró la supervivencia en comparación con la vacunación i.d. u oral primaria. De hecho, parecía que la protección había menguado en los primeros ratones. Por el contrario, el refuerzo oral después de la inmunización oral mejoró la mediana de la supervivencia de los ratones C3H/HeN vacunados con LVS o SCHU S4 Δ clpB (del ejemplo 1).

Tabla 3. Supervivencia de ratones con refuerzo oral inmunizados i.d. después de exposición con aerosol con SCHU S4.

Cepa de ratón	vacuna	Tiempo hasta la muerte de los ratones individuales (días)	Mediana del tiempo hasta la muerte (días)
BALB/c	ninguna	5,5,5,5,5,5	5
BALB/c	LVS	6,7,8,8	7,5 ¹
BALB/c	SCHU AV	6,6,6,6	6
BALB/c	SCHU S4ΔclpB	7,9,11,11,>28	11 ¹
BALB/c	SCHU S4Δig/C	5,6,6,6	6
C3H/HeN	ninguna	5,5,6,6,6,6,	6
C3H/HeN	LVS	5,6,7,7,7,8	7
C3H/HeN	SCHU AV	5,5,6,7	5,5
C3H/HeN	SCHU S4ΔclpB	8,13,16,16,19	16 ¹
C3H/HeN	SCHU S4Δig/C	5,6,6,6,7	6

¹ supervivencia significativamente mayor (P<0,05) que para ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con SCHU S4Δig/C.

5 Tabla 4. Supervivencia de ratones con refuerzo por vía oral inmunizados por vía oral después de exposición con aerosol.

Cepa de ratón	vacuna	Tiempo hasta la muerte de los ratones individuales (días)	Mediana del tiempo hasta la muerte (días)
BALB/c	ninguna	5,5,5,5,5,5	5
BALB/c	LVS	5,6,7,8,8	7 ¹
BALB/c	SCHU AV	5,5,5,5,5	5
BALB/c	SCHU S4 Δ clpB	5,6,11,19,>28	11 ¹
BALB/c	SCHU S4 Δ ig/C	5,5,5,5,5	5
C3H/HeN	ninguna	5,5,5,5,5,5	5
C3H/HeN	LVS	5,6,7,8,8	7 ¹
C3H/HeN	SCHU AV	5,5,5,5,5	5
C3H/HeN	SCHU S4 Δ clpB	11,15,>28,>28,>28	>28 ¹
C3H/HeN	SCHU S4 Δ ig/C	5,5,5,5,5	5

¹ supervivencia significativamente mayor (P<0,05) que para ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con SCHU S4Δig/C.

Ejemplo 5: Evolución de la infección en ratones vacunados

- 10 Se ha examinado previamente la cinética de la infección de LVS en ratones inmunizados i.d. (Chen *et al* 2003). Por lo tanto, se determinaron las características de crecimiento *in vivo* de SCHU S4ΔclpB (tabla 5).
- 15 Los resultados de los ejemplos 2 a 4 muestran que para vacunas a base de SCHU S4 ni la inmunización oral, ni el refuerzo, ni el uso de ratones C3H/HeN confirió ninguna ventaja en la supervivencia sobre una única inmunización i.d. de ratones BALB/c. Por lo tanto, los estudios restantes usaron sólo ratones BALB/c inmunizados i.d. Además, puesto que SCHU S4Δig/C no provocó ninguna protección, y SCHU AV fue inferior a SCHU S4ΔclpB, no se prosiguió adicionalmente con estos grupos de control.

Se determinaron las características de crecimiento *in vivo* de SCHU S4 Δ clpB (del ejemplo 1) y se muestran en la tabla 5. En resumen, se retiraron los órganos en los tiempos indicados, se homogeneizaron en solución salina estéril, se diluyó y se plaqueó en medio CHAH. Se realizaron recuentos de colonias después de 48-72 h de incubación a 37 °C. La cinética de crecimiento *in vivo* general de SCHU S4 Δ clpB era similar a los resultados publicados anteriormente para LVS (Chen *et al.*, 2003).

5

Tabla 5. Crecimiento *in vivo* de SCHU S4 Δ clpB después de inoculación i.d. en BALB/c.

Tejido	Log ₁₀ ± D.E. de carga bacteriana el día después de la infección:			
	2	4	7	16
piel	6,84 ± 0,17	5,49 ± 0,57	4,21 ± 0,44	<1,30 (0/5)
bazo	4,87 ± 0,36	6,49 ± 0,52	4,59 ± 0,14	3,69 ± 0,11
hígado	4,55 ± 0,38	5,89 ± 0,33	4,63 ± 0,13	3,78 (1/5)
pulmones	1,78(1/5)	2,55 ± 0,70	3,47 ± 0,41	<1,30 (0/5)

N=5 ratones/grupo; (), proporción de órganos infectados usados para calcular la media.

10

También se examinó la evolución de la infección iniciada por inhalación de SCHU S4 natural en ratones sin tratamiento previo y ratones inmunizados usando los procedimientos descritos anteriormente (tabla 6).

15

Tabla 6. Crecimiento *in vivo* de *F. tularensis* SCHU S4 después de la exposición con aerosol de los ratones vacunados.

Grupo de vacuna	Tejido	Log10 DE de carga bacteriana el día después de la exposición con aerosol:					
		2	4	7	10	14	
sin tratamiento previo	pulmones	6,09 ± 0,11	7,71 ± 0,20				
LVS		6,0 ± 0,17	7,52 ± 0,07	8,31 ± 0,20			
ΔclpB		4,79 ± 0,93 ¹²	5,94 ± 0,46 ^{1,2}	6,27 ± 0,96 ²	6,91 ± 0,96	3,97 ± 1,83	
sin tratamiento previo	hígado	4,04 ± 0,88	7,99 ± 0,25				
LVS		3,07 ± 0,58	5,77 ± 0,13 ¹	7,94 ± 0,73			
ΔclpB		1,87 (2/4) ¹	4,26 ± 0,41 ^{1,2}	4,14 ± 0,64 ²	5,33 ± 0,70	3,70 (3/4)	
sin tratamiento previo	bazo	3,85 ± 1,0	8,26 ± 0,98				
LVS		2,13 ± 0,76 ¹	5,75 ± 0,17 ¹	7,54 ± 0,92			
ΔclpB		2,43 ± 0,46 ¹	3,76 ± 0,38 ^{1,2}	3,63 ± 0,58 ²	4,52 ± 0,82	3,41 ± 1,43	
sin tratamiento previo	sangre/ml	2,82 ± 0,94	7,19 ± 0,03				
LVS		3,47 (1/4) ¹	3,22 ± 0,87 ¹	4,22 (2/4)			
ΔclpB		2,85 (1/4) ¹	2,0 (1/4) ¹	2,0 (1/4)	4,38 (2/4)	<2,0 (0/4)	

Ratones (n=4/grupo);
¹ carga significativamente menor que en ratones sin tratamiento previo
² carga significativamente menor que en ratones inmunizados con LVS

Ambas vacunas confirieron eficazmente control de la bacteriemia intensa asociada con la infección primaria. El día 2 de la infección, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB albergaron significativamente menos bacterias en sus pulmones que los ratones sin tratamiento previo o ratones inmunizados con LVS. El día 4 de la infección, las cargas pulmonares fueron similares en ratones sin tratamiento previo y ratones inmunizados con LVS, con cargas en ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB a niveles significativamente menores. Los ratones inmunizados con LVS albergaron >100 veces menos bacterias en sus hígados y bazo que los ratones sin tratamiento previo el día 4, y los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB albergaron significativamente menos bacterias que los ratones inmunizados con LVS. Los ratones sin tratamiento previo no sobrevivieron más allá del día 5. El día 7 de la infección, los ratones inmunizados con LVS albergaron una carga bacteriana en los pulmones que fue significativamente mayor de la carga en los pulmones de los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB. En este momento, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB tenían un mejor control de la infección en el hígado y bazo que los ratones inmunizados con LVS. Ningún ratón inmunizado con LVS sobrevivió al día 10 de infección. El día 10, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB albergaron números de bacterias similares en los pulmones, hígado y bazo a los del día 7. Sólo entre los días 10-15 estos ratones empezaron a reducir la carga bacteriana en los pulmones hasta los niveles bajos observados en el hígado y bazo a lo largo de la evolución de la infección.

Ejemplo 6. Supervivencia de ratones inmunizados i.d. frente a exposición intranasal.

Se inmunizaron i.d. ratones Balb/c con 10^5 UFC de LVS o SCHU S4ΔclpB (del ejemplo 1), a continuación se expusieron 6 semanas después por vía intranasal con 10, 100, o 1000 UFC de SCHU S4 junto con ratones sin tratamiento previo con edades coincidentes. Los resultados se muestran en la figura 4. Se muestra que un 100 % y un 80 % de los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB sobrevivieron a la exposición i.n. con 10 y 100 UFC de SCHU S4 respectivamente en comparación con un 30 % y un 0 % de los ratones inmunizados con LVS. Ningún ratón inmunizado sobrevivió a la exposición i.n. con 1000 UFC de SCHU S4, pero los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones inmunizados con LVS.

Ejemplo 7. Protección de ratones C57BL/6.

Se ha demostrado de forma consistente que la vacunación i.d. de ratones C57BL/6 con LVS no los protege frente a la exposición i.d. o respiratoria con SCHU S4.

Se inmunizaron i.d. ratones C57BL/6 con 10^5 UFC de SCHU S4ΔclpB o LVS, a continuación se expusieron 6 semanas después con 20, 200 o 2000 UFC de SCHU S4 ID o 20 UFC SCHU S4 i.n. Los resultados se muestran en la figura 5.

Ningún ratón inmunizado con LVS sobrevivió a la exposición i.d. ni i.n. con SCHU S4, mientras que un 80 %, 100 % y un 60 % de los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB (Ejemplo 1) sobrevivieron a la exposición i.d. con 10, 100 o 1000 UFC de SCHU S4. Ningún ratón sobrevivió a la exposición i.n., pero los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB sobrevivieron más tiempo que los ratones inmunizados con LVS. En todos los casos, los ratones inmunizados con SCHU S4ΔclpB sobrevivieron significativamente más tiempo ($P<0,001$) que los ratones inmunizados con LVS.

Ejemplo 8: Resistencia al choque térmico

Se examinó el grado de sensibilidad de las cepas de *F. tularensis* mutantes del ejemplo 1 y otras cepas al tratamiento térmico.

Se suspendieron individualmente SCHU S4 natural, SCHU S4ΔfupA (SCHU S4 ΔFTT0918; Twine *et al.* 2005), SCHU S4ΔcapB (Conlan *et al.* 2010), SCHU S4ΔwbtC y SCHU S4ΔclpB (Ejemplo 1) en solución salina a una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/ml. Se calentaron las muestras a 50 °C y se monitorizó la supervivencia el transcurso de 30 minutos.

Con la excepción de SCHU S4ΔclpB, todas las cepas pudieron soportar el estrés térmico. Sin embargo, SCHU S4ΔclpB presentó una pérdida de viabilidad de más de un 99 % en 30 minutos. Por tanto, se requiere claramente el gen *clpB* para proteger la *F. tularensis* virulenta del estrés térmico tal como el que se encuentra durante un periodo de tiempo prolongado en el huésped febril.

Los modos de realización y ejemplos descritos en el presente documento son ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención como se reivindica. Además, puede que la combinación analizada de los rasgos característicos no sea necesaria para la solución de la invención.

Referencias

Anthony LSD, Kongshavn PAL. Experimental murine tularemia caused by *Francisella tularensis* live vaccine strain:a model of acquired cellular resistance. *Microb Pathog* 1987; 2: 3-14.

- Chen W, Shen H, Webb A, KuoLee R, Conlan JW. Tularemia in BALB/c and C57BL/6 mice vaccinated with *Francisella tularensis* LVS and challenged intradermally, or by aerosol with virulent isolates of the pathogen; protection varies depending on pathogen virulence, route of exposure, and host genetic background. *Vaccine* 2003; 21: 3690-700.
- 5 Conlan JW, Shen H, Webb AC, Perry MB. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine* 2002; 20: 3465-3471.
- 10 Conlan, J.W., Shen, H., KuoLee, R., Zhao, X., Chen, W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an α T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine* 2005; 23: 2477-85.
- 15 Conlan J W, Shen H Golovliov I, Zingmark C, Oyston PCF, Chen W, *et al.*. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization. *Vaccine* 2010; 28: 1824-31.
- 20 Forslund A-L, Kuoppa K, Svennson K, Salomonsson E, Johansson A, Bystrom M *et al.* Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59: 1818-1830.
- Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccine* 2001; 19: 4465-72.
- 25 Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, V. Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 222:273-80.
- 30 Green M, Choules G, Rogers D, Titball RW. Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease. *Vaccine* 2005; 23: 2680-86.
- Kadzhaev K, Zingmark C, Golovliov I, Bolanowski M, Shen H, Conlan W, *et al.* (2009). Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model. *PLoS One* 2009; 4(5): e5463.
- 35 KuoLee R, Harris G, Conlan JW, Chen W. Oral immunization of mice with the live vaccine strain (LVS) of *Francisella tularensis* protects mice against respiratory challenge with virulent type A *F. tularensis*. *Vaccine* 2007; 25: 3781-91.
- Lindgren H, Shen H, Zingmark C, Golovliov I, Conlan W, Sjostedt A. The resistance of *Francisella* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun* 2007; 75: 1303-1309.
- 40 Meibom KL, Dubial I, Dupuis M, Barel M, Lenco J, Stulik J *et al.* The heat-shock protein clpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Mol Microbiol* 2008; 67:1384-1401.
- 45 Quarry JE, Isherwood KE, Michell SL, Diaper H, Titball RW, Oyston PCF. A *Francisella tularensis* subspecies novicida pur F mutant, but not a purA mutant, induces protective immunity to tularemia in mice. *Vaccine* 2007; 25:2011-2018.
- 50 Saslaw S, Eigelsbach HT, Wilson HE, Prior JA, Carhart S. Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Arch Int Med* 1961a; 107: 689-701.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Prior JA, Wilson HE, Carhart S. Tularemia vaccine study II. Respiratory challenge. *Arch Int Med* 1961b; 107: 702-14.
- 55 Saslaw S, Carhart S. Studies with tularemia vaccines in volunteers. III. Serologic aspects following intracutaneous or respiratory challenge in both vaccinated and nonvaccinated volunteers. *Am J Med Sci* 1961; 241: 689-99.
- 60 Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund A-L, Zingmark, C, Golovliov I, Sjostedt A, *et al.* (2009). Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 2009; 7: 3424-31.
- Sebastian S, Dillon ST, Lynch JG, Blalock L-A T, Balon E, Lee KT, *et al.* A defined O-antigenpolysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity. *Infect Immun* 2007; 75: 2591-2602.

- Sjostedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology and clinical manifestations. *Ann New York Acad Sci* 2007; 1105: 1-29.
- 5 Tempel R, Lai XH, Crossa L, Kozlowicz B, Heffron F. Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun* 2006; 74:5095-105.
- 10 Thomas RM, Titball RW, Oyston PCF, Griffin K, Waters E, Hitchen PG *et al.* The Immunologically Distinct O Antigens from *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* Are both Virulence Determinants and Protective Antigens. *Infect Immun* 2007; 75:371-378.
- 15 Twine SM, Bystrom M, Chen W, Forsman M, Golovliov IR, Johansson A, *et al.* A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58 kDa protein is attenuated for virulence and an effective live vaccine. *Infect Immun* 2005; 73:8345-52.
- 20 Woolard M D, Hensley L L, Kawula T H, Frelinger J A, *et al.* (2008). Respiratory *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Infection Induces Th17 Cells and Prostaglandin E2, Which Inhibits Generation of Gamma Interferon-Positive T Cells. *Infect. Immun.* 2008; 76: 2651-59
- 25 Wu TH, Hutt JA, Garrison KA, Berliba LS, Zhou Y, Lyons CR. 2005. Intransal vaccination induces protective immunity against intranasal infection with virulent *Francisella tularensis* biovar A. *Infect Immun* 2005; 73: 2644-54.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Francisella tularensis* mutante en la que el gen *clpB* está inactivado, en la que el mutante se deriva de una cepa clínica natural de *F. tularensis* seleccionada del grupo que consiste en SCHU S4, FSC033 o FSC108, y FSC200.
5
2. La cepa de *F. tularensis* mutante de la reivindicación 1, en la que el mutante está más atenuado que *F. tularensis* LVS.
- 10 3. La cepa de *F. tularensis* mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el gen *clpB* está eliminado.
- 15 4. La cepa de *F. tularensis* mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que se han eliminado 2463 pb del *clpB*.
5. Una composición que comprende la cepa de *F. tularensis* mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la composición es una vacuna y el mutante está vivo.
7. Una cepa de *F. tularensis* mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de las reivindicaciones 5 o 6 para su uso para conferir inmunidad frente a una exposición dérmica o respiratoria con *F. tularensis* en un huésped.
- 25 8. La cepa de *F. tularensis* mutante o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la cepa de *F. tularensis* mutante o la composición se preparan para su administración por vía intradérmica (i.d.), por vía subcutánea, por escarificación, por vía intramuscular, por vía oral o por inhalación.
9. La cepa de *F. tularensis* mutante o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que el huésped es un animal o un ser humano.
30
10. La cepa de *F. tularensis* mutante de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la cepa mutante o la composición se administra una sola vez.
35

ATGGATATAAATAAATTACAATAAACTACAAGAAGCTAGCTGAGGCTCAATCT
 TATGCTTTCAACAAAAAGCAACTGAGTTACATCAGCACATATACTAAAAGCTCTT
 TGGAGCAAAATGATAGTGTGCTATATCTATATTAAAGCGTTGTGGTGTAAATATAC
 AAAACTTATAAAAGCTGTAATGATATGGTTGATAGTGTGCGGTATTATCTGGAG
 AAGGTAACCCTCAAGTAACACCATCTAGAGATTAATAGCTACATTACATAAAATGC
 AAGGGCTTGTCAATAAAATGGTGTAGGTTATCTCGAGTGAGGTTCTTATTAG
 CCTCTTAGAAGACAAAAGTTAAGTGGACTGTATAACAAATTGGTATTACAAAAG
 AAAATTAAACAAAAGCAGTCATGATTATCGCGGAGGGGAGAAAGTGAGTAGTCAA
 AATCAAGAAGATATGAAAGGTGCATTAGATAAAATACACGGTAGATCTAAGTGTCA
 GCGAGAAAAGGAAAAATTGATCCAATAATCGGTAGAGATAGTGAGATCCGTAGAAC
 TATTCAAGTATTACAAAGAAGAACTAAGAACAAACCTGTGCTTATAGGTGAGCCTG
 GTGTTGGTAAAAGTGTCTATTGTTGAGGGCTAGCTAACGAATAGTTAATGATGAA
 GTACCAGAAGGTGTCAAAGGTAAAAAGTACTATCATTAGATATGGGTGCACTGCT
 AGCTGGTGCTAAATTAGAGGAGATTGAGAGCTAAAGTGCTAAATCTGTATTAAAGA
 GTTATCAAAACAAGAAGGTAAATGTAATTCTCTTATAGATGAATTACATACTATGGT
 GGTGCTGGTAAAGCAGAAGGATCTATGGATGCTGGTAAACATGCTTAAACCTGCTCT
 AGCTAGAGGAGAGCTAAAGTGTGTTGGTGCACAACTTAGATGAGTAGTGTGAGT
 ATGTTGAAAAAGATCCGGCACTTGAGCGAAGATTCCAGAAAGTGCTAGTTGATGAA
 CCTACTGTAGAAGATACTATCGCTATACTTAGAGGCCTAAAGAAAGATATGAGCTA
 CATCATGGTGTAAATATCACAGATTCACTATTGTAAGTGCAGCAACTTGTACAT
 AGGTATATCACAGATAGACAGCTACCTGATAAAGCTATAGATCTAGTAGATGAAGC
 AGCAAGCCAATTCTGTATGGAAATAGACTCTAAACCTGAAAAAGTGTGACTTATA
 TCGTAGAATCATCCAGCTGAAAATGCAACCGCAACAGCTAAAGAAAAGAGAACAGT
 ATGCTACTAAAAACGTTAGAGATACTTGAGCAAGAAATAAAAGGGCTAGACTCC
 GAGTATAAAGGACTAGAAGAGCTTGAGGAAAGCTGAAAGCTTAAGATGCAAGGTAC
 AAGTAAACTAAAAGAAGAGCTTGAGGAAAGCCAAGTTGAACCTGAAAAGTACCAAA
 GAGTGGGTGATTGAGCAAATGGCAGAATTACAATACGGTAAACACCTGAGCTA
 GAAGCACAAATTAAACAAATAGAAGAAACTGAAGCAGAACCTCTGAAAACAAATT
 GTAAGAACATCTGTTACAGAAAATGAGATTGCTGATGTAGTTCAAAGCTACTGGA
 ATACCTGTGCTAAGATGATGGAAGGGAAAAAGACAAGCTCTAAATATGGAAAG
 TTTCTTACATAAAAGAGTAATCGGACAAGATCAAGCTATAAAAGCAGTATCAAATGC
 TGTAAGAACATCTGTTCTGGATTATCAGATCCAAATAGACCTATAGGCTCATT
 GTTCTTAGGTCACACTGGTGTGGTAAACTGAGCTTACAAAGCTTACAGAGT
 TTTGTTGATGATGAAGATGCCATGCTTAGAGTAGATATGCTGAGTTATGGAGA
 AACATTCTGTAGCTAGACTAATAGGCGCACCTCTGGATACGTAGGTTATGAACAA
 GCGCGCTACTAACATGTTAGAAGAAAACCTTATTCTGTAATCTTACTTGAT
 GAGGTTGAAAAGCTCATGCTGATATTTAACATCTTACTACAAGTGCTGAGGAG
 GGTCGCCTAACAGATGGCAAGGCAGAACAGTAGACTTTAAAAGTGTAAAGT
 TATGACTTCTAACCTGGTCACATCGAATCCAAGAAATGCAAGGTAGGATTATGA
 AACAGTAAAATCTGCTGTAATGGAAATGGTACTTAGCCACTTACGCTGAATTG
 AAATAGAGTTGATGATGCAATTGCTTTGAACCTCTAAACAAAGAGATGATACTGA
 AATAGCTAAAATACAAATCAAACGCTTAGAAAAACGCTAGCAGATCTAAGTATAGG
 ATTAGAAGTCACAACGGAGCTATGGATAAAACTAGCTGATGCTGGCTTGATCCTG
 TGTTGGTGTAGACCGCTTAAGCGCGTATTCAAACAAACTTAGAAAACCCCTG
 GCTCTAAAACCTCTAGATGGTGTAGTTAAAGCTGAAGATAAAATAGTTGTCGATATT
 GACGCTAATAACAATATTATATTCTCTAAATAA

FIG. 1

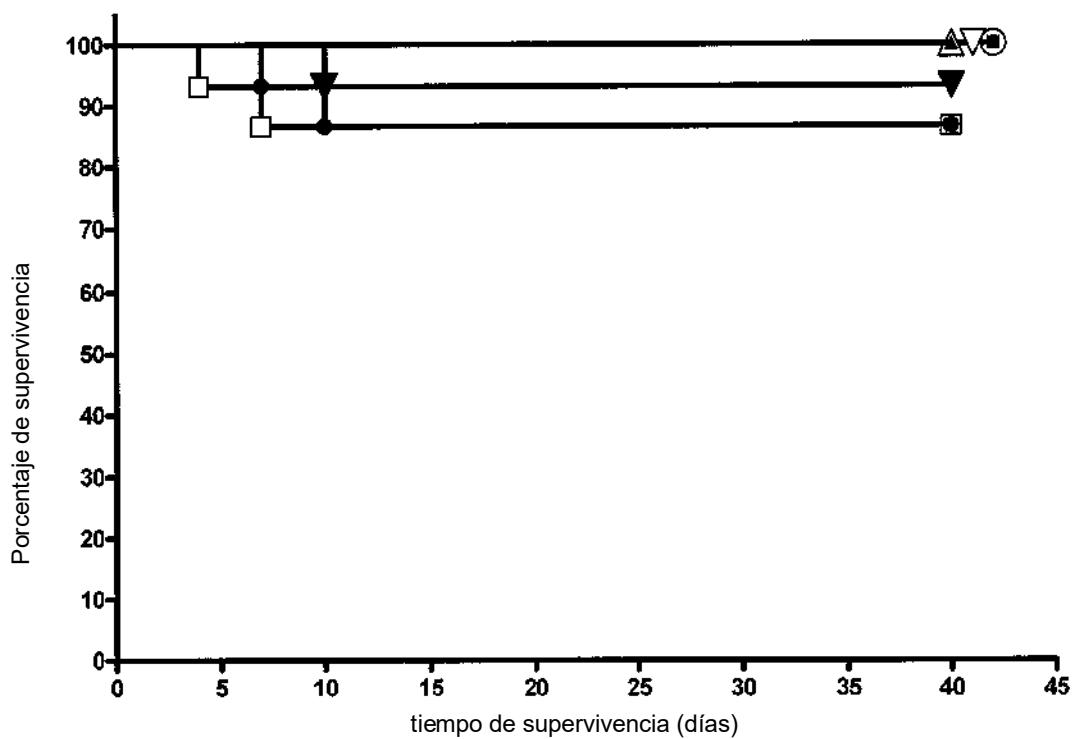


FIG. 2

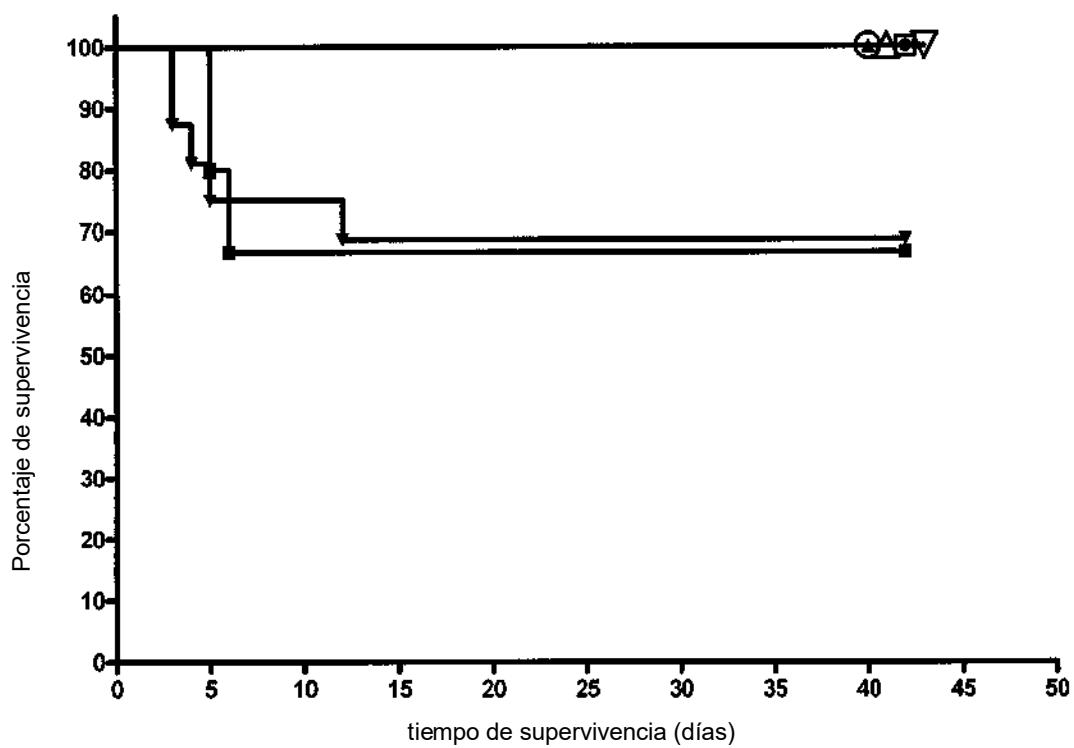


FIG. 3

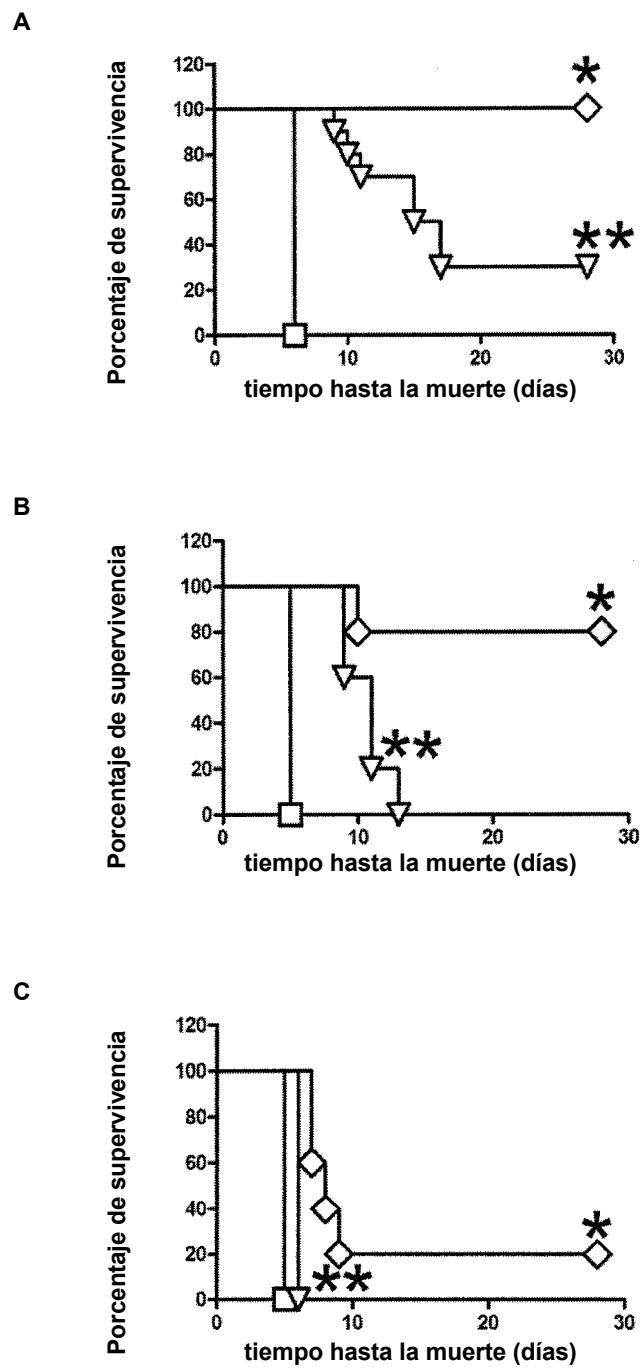


FIG. 4

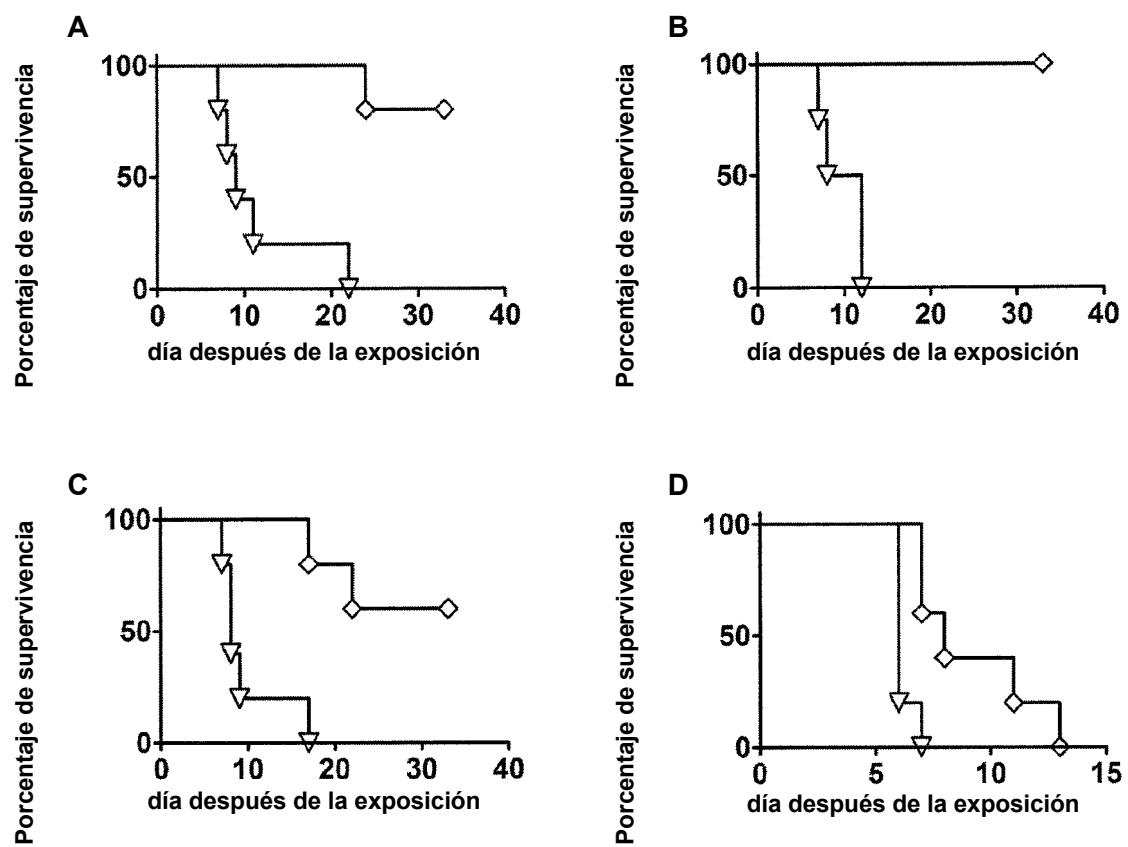


FIG. 5

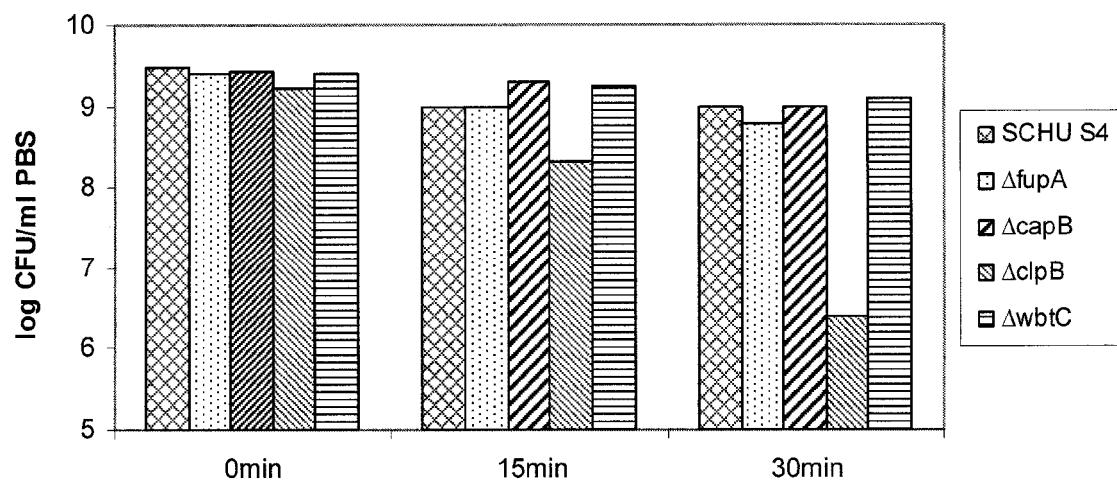


FIG. 6