

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 372**

51 Int. Cl.:

C12N 15/76 (2006.01)

A61P 33/10 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2010 PCT/BR2010/000065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10102363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10750256 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2407545**

54 Título: **Cepa Pasteur de BCG auxótrofa y recombinante y su uso para combatir infecciones humanas causadas por parásitos**

30 Prioridad:

11.03.2009 BR PI0900896

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

29.12.2016

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (100.0%)
Avenida Brasil 4365 Manguinhos
21040-900, Rio de Janeiro, RJ, BR**

72 Inventor/es:

**TENDLER, MIRIAM;
VILAR, MÓNICA MAGNO;
ARMÔA, GERALDO RODRIGUES GARCIA;
MCINTOSH, DOUGLAS y
SIMPSON, ANDREW, J., G.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 595 372 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

Cepa Pasteur de BCG auxótrofa y recombinante y su uso para combatir infecciones humanas causadas por parásitos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una cepa vacunal recombinante de BCG de *Mycobacterium bovis* que expresa el antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni*. La cepa vacunal de la presente invención se emplea para controlar las infecciones causadas por parásitos, específicamente el *Schistosoma mansoni*. La cepa vacunal es una cepa auxótrofa complementada con leucina derivada de la modificación genética de la subcepa Pasteur de BCG.

Antecedentes de la invención

- 10 Se estima que al menos 200 millones de personas están infectadas con una de las cinco especies de *Schistosoma* que afectan al hombre. Además, hay otros 600 millones en riesgo de ser infectados por este parásito.

La quimioterapia con el fármaco antihelmíntico Praziquantel es el método principal de control, sin embargo, la tasa de reinfección es alta [Al-Sherbiny M., Osman A., Barakat R., El Morshedy H., Bergquist R. & Olds R. (2003). *In vitro cellular and humoral responses to Schistosoma mansoni vaccine candidate antigens. Acta Trop.* 88:117-130; y Capron A., Riveau G.J., Bartley P.B. & McManus D.P. (2002). *Prospects for a schistosome vaccine. Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2:281-290].

Por tanto, el desarrollo de una vacuna eficaz utilizada en combinación con quimioterapia apropiada podría representar una estrategia eficaz de control a largo plazo [Pearce E.J. (2003). *Progress towards a vaccine for schistosomiasis. Acta Trop.* 86:309-313; y Bergquist N.R. (2002). *Schistosomiasis: from risk assessment to control. Trends Parasitol.* 18:309-314].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha seleccionado la proteína 14 transportadora de ácidos grasos de *Schistosoma mansoni* (Sm14) y la glutatión S-transferasa de 28-kDa de *S. haematobium* (Sh28-GST), como moléculas dianas prioritarias para ensayos clínicos en seres humanos como candidatas vacunales anti-esquistosomas [Bergquist, Feb 2004, <http://who.int/tdr/publication/tdrnews/news71/schisto.html>]; Bergquist R., Al-Sherbiny M., Barakat R. & Olds R. (2002). *Blueprint for schistosomiasis vaccine development. Acta Trop.* 82:183-192; y Bergquist N.R. (1998). *Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93 Suppl 1: 95-101]. La selección del antígeno Sm14 se basó en la observación de que la proteína Sm14 recombinante, producida en *Escherichia coli*, inducía inmunidad protectora contra *S. mansoni* (35 a 60%) y *Fasciola hepatica*, determinada por la reducción en la carga de gusanos por inoculación en modelos de roedores (Vilar, M. M.; Barrientos, F.; Almeida, M.; Garrat, R.; Tendler M. *An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis with r-Sm14 peptides. Vaccines*, v. 22, pp. 137-144, 2003; y Tendler M., Brito C.A., Vilar M.M., Serra-Freire N., Diogo C.M., Almeida M.S., et al. (1996). *A schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual purpose anti-heminth vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 269-273] y en ovejas (Almeida M.S., Torloni H., Lee Ho-P, Vilar M.M., Thaumaturgo N., Simpson A.J. & Tendler M. (2003). *Vaccination against Fasciola hepatica infection using a Schistosoma mansoni defined recombinant antigen, Sm14. Parasite Immunol.* 25:135-137]. Además, se ha confirmado la inmunogenicidad protectora de Sm14 cuando el gen codificador de esta proteína se administró en el contexto de una vacuna de DNA [Nascimento E., Lea-o I.C., Pereira V.R., Gomes Y.M., Chikhlikar P., August T., et al (2002). *Protective immunity of single and multi-antigen DNA vaccines against schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97 Suppl 1: 105-109] o por medio de bacterias recombinantes atenuadas vivas, es decir, *Salmonella enterica* variedad *Typhimurium* (Pacheco L.G., Zucconi E., Mati V.L., Garcia R.M., Miyoshi A., Oliveira S.C., et al., (2005). *Oral administration of a live Aro attenuated Salmonella vaccine strain expressing 14-kDa Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. Acta Trop.* 95:132-142] o como el BCG recombinante obtenido de la transformación de la cepa de BCG (bacilo de Calmette-Guérin) de *Mycobacterium bovis* utilizada mundialmente como vacuna contra la tuberculosis [Varaldo P.B., Leite L.C., Dias W.O., Miyaji E.N., Torres F.I., Gebara V.C., et al (2004). *Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of Schistosoma mansoni protects mice from cercarial challenge. Infect. Immun.* 72: 3336-3343; y Varaldo, P. B., Leite, L.c.c., Dias, W.O., Miyaj, E.N., Armoa, G.R.G., Campos, A. S., Vilar, M. M., McFadden, J., Almeida, M. S., Tendler, M. and McIntosh, D. (2006). *Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 gene of Schistosoma mansoni in recombinant Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice. FEMS Medical Microbiology and Immunology*, 48, 132-139].

Varias ventajas están asociadas al uso de rBCG como un sistema heterólogo presentador de antígenos [Ohara N. and Yamada T. (2001). *Recombinant BCG vaccines. Vaccine.* 19:4089-4098]. En este contexto, Varaldo et al. (2004) describieron anteriormente que la inmunización con una sola dosis de una cepa de rBCG que expresa Sm14 en fusión con la [beta]-lactamasa de *Mycobacterium fortuitum* (rBCG/PL73-Sm14) confirió protección contra la inoculación con cercaria de *S. mansoni* equivalente a la obtenida usando tres dosis de rSm14 (Varaldo et al., 2004). El nivel global de expresión de Sm14 obtenido a partir de esta construcción fue relativamente bajo en comparación con el registrado para otros antígenos usando los mismos o similares vectores de expresión [Mederle I., Bourguin I.,

Ensergueix D., Badell E., Moniz-Pereira J., Gicquel B. & Winter N. (2002). *Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. Infect. Immun. 70:303-314*. Sin embargo, se debe observar que no hay consenso en cuanto al nivel mínimo de producción de antígenos requerido para que una cepa de rBCG provoque inmunidad protectora, pero se ha considerado que un nivel bajo de expresión de antígenos representa un factor potencialmente limitante [Kanekiyo M., Matsuo K., Hamatake M., Hamano T., Ohsu T., Matsumoto S., et al., (2005). *Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin expressing human immunodeficiency virus type 1, Gag. J. Virol. 79: 8716-8723*; y Kawahara M., Matsuo K., Nakasone T., Hiroi T., Kiyono H., Matsumoto S., et al. (2002). *Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. Vaccine. 21: 158-166*].

Para resolver este problema se desarrollaron dos nuevas construcciones de rBCG capaces de expresar mejores niveles del antígeno diana [Tesis de Maestría titulada “*Construção do M. bovis BCG recombinante Sm14 e avaliação da sua capacidade contra esquistossomose no modelo murino*. A.P.C. Argondizzo en 2005, en Oswaldo Cruz Foundation, Río de Janeiro, Brasil]. Estas construcciones emplearon dos vectores plasmídicos, el pUS977 y el pAU5.

El vector pAU5 fue desarrollado en el curso de la Tesis de Maestría titulada “*Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (Escherichia coli - Mycobacterium) em Mycobacterium bovis BCG*”, J.P.S. Santos en 2002, Oswaldo Cruz Foundation, Río de Janeiro, dirigida por el Dr. Douglas McIntosh, investigador visitante de la FIOCRUZ y el Prof. Walter Martim R. Oelemann, profesor de la Universidad Federal de Río de Janeiro. El vector pAU5 es una variación del plásmido pUS973 [Medeiros, M., Dellagostin, O.A., Armoa, G.R.G., Degrave, W.M., Mendonça-Lima, L., Lopes, M.Q., Costa, J.F., McFadden, J. G.M.B. and McIntosh, D. (2002). *Comparative evaluation of Mycobacterium vaccae as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. Microbiology 148, 1999-2009*]. Este plásmido (pAU5) demostró mayor estabilidad en comparación con pUS973 del que se originó. La mayor estabilidad se debe a una delección de cuatro pares de bases inmediatamente aguas arriba de la región promotora en combinación con la pérdida del primer par de bases de la secuencia promotora hsp60. La secuencia hsp60 así modificada se denomina hsp60*.

La capacidad de estas construcciones de rBCG para conferir protección a ratones suizos contra la inoculación de cercarias de *S. mansoni* se confirmó en dos experimentos separados [Master Thesis A.P.C. Argondizzo in 2005]. En este estudio, se observó que el mejor nivel de expresión de Sm14 (aproximadamente 32 veces mayor que el obtenido con PL73-Sm14 en el caso de la construcción de rBCG transformada con el vector pAU5), no condujo a una mejora en el nivel de protección en comparación con los registrados con la construcción rBCG/PL73-Sm14. Por otra parte, es importante observar que las cepas de rBCG/pAU5-Sm14 y rBCGr/pUS977-Sm14 también se diferencian de la cepa de rBCG/PL73-Sm14 en cuanto a la localización subcelular de la proteína Sm14 recombinante. Específicamente, la proteína se produjo dentro del citoplasma bacteriano en el caso de rBCG/pAU5-Sm14 en lugar de en la forma de una proteína de fusión asociada a la membrana como en el caso de rBCG/PL73-Sm14.

Considerados en su conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la Sm14 recombinante producida en el citoplasma de rBCGr, con la expresión dirigida por el promotor hsp60 modificado presente en la construcción pAU5-Sm14, retiene el potencial como medio de profilaxis contra la esquistosomosis (rBCG/pAU5-Sm14).

Todas las construcciones plasmídicas desarrolladas hasta este punto se basaron en una molécula de DNA plasmídica extracromosómica circular que contenía un gen que codifica la resistencia al antibiótico aminoglicosídico kanamicina. El gen de la kanamicina está presente en estas construcciones para proporcionar un medio de seleccionar positivamente las bacterias transformadas (transformantes) después de la introducción del plásmido en BCG. Una función secundaria de este gen es asegurar el mantenimiento del plásmido durante el crecimiento de la bacteria en los cultivos líquidos, que contienen kanamicina, utilizados para producir vacunas experimentales.

Sin embargo, la presencia del gen codificador de la resistencia a antibióticos no proporciona selección para el mantenimiento de plásmidos *in vivo*. Además, el uso de BCG recombinante que lleva un plásmido que contiene una secuencia codificadora de la resistencia a antibióticos para la vacunación humana plantea problemas de seguridad [Burlein J.E., Stover C.K., Offcut S. & Hanson, M.S. (1994). *Expression of foreign genes in mycobacteria. Washington DC: ASM Press*].

Evidentemente, sería deseable el desarrollo de vectores plasmídicos más estables para la expresión de antígenos heterólogos en BCG que no llevaran marcadores de resistencia a antibióticos. En vista de lo descrito previamente, es un objeto de la presente invención proporcionar una mejor cepa vacunal auxótrofa recombinante, que sea utilizable en el tratamiento de las infecciones respectivas.

Sumario de la invención

La solución según la invención se obtiene de acuerdo con las reivindicaciones independientes. Características ventajosas adicionales se pueden derivar de las reivindicaciones dependientes y de la siguiente memoria descriptiva.

La presente invención se refiere a una cepa vacunal recombinante de BCG de *Mycobacterium bovis* que expresa el antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni*. La cepa vacunal de la presente invención se emplea para controlar infecciones causadas por parásitos, en especial el *Schistosoma mansoni*. La cepa vacunal es una cepa auxótrofa complementada con leucina derivada de la modificación genética de la subcepa Pasteur de BCG.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática del desarrollo del vector complementario pUP410. La Figura 2 muestra el resultado de la PCR de la amplificación del casete de expresión hsp60*-Sm14 utilizando la construcción pAU5-Sm14 como molde de DNA.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere al uso de la cepa BCG [Delta]LeuD y del vector complementario pUP410 para obtener una cepa vacunal para el control de infecciones por *Schistosoma mansoni* y parásitos relacionados, basada en la expresión de la Sm14 de *S. mansoni in vivo*.

15 Una característica principal de la presente invención se puede conseguir por la construcción de un sistema de expresión del antígeno Sm14 en BCG utilizando una complementación auxótrofa como marcador seleccionable de acuerdo con la reivindicación 1. El sistema de expresión usado en la presente invención fue desarrollado por los grupos del Dr. Johnjoe McFadden, School of Biological Sciences, University of Surrey, Reino Unido y del Dr. Odir Dellagostin, Biotechnology Centre, Federal University of Pelotas, Brasil, para el proyecto de investigación titulado "*Development of recombinant BCG multivaccine and complementary diagnostics for predominant parasitic and epizootic disease of ruminants in Latin America*".

20 Los componentes y las características de este sistema de BCG que emplea la complementación auxótrofa son una cepa Pasteur de BCG que es auxótrofa respecto al aminoácido leucina (BCG [Delta]LeuD) y una familia de vectores plasmídicos que codifica el producto de la secuencia de LeuD que, como tal, sea capaz de complementar la auxotrofia de BCG para leucina. La cepa BCG auxótrofa que es incapaz de crecer en medios que carezcan de leucina, se obtuvo por sustitución de genes de la secuencia de LeuD, presente en el genoma de la cepa Pasteur de BCG, empleando los métodos descritos por Parish, T. & Stoker, N. G. (2000) [*Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement. Microbiology. 146:1969-1975*]. Los vectores de complementación se derivan del vector pUS77 [Medeiros, M., Dellagostin, O.A., Armoa, G.R.G., Degrave, W.M., Mendonça-Lima, L., Lopes, M.Q., Costa, J.F., McFadden, J.G.M.B. and McIntosh, D. (2002). *Comparative evaluation of Mycobacterium vaccae as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. Microbiology 148, 1999-2009*] y contienen el gen LeuD que actúa como complementario de la deficiencia nutricional (auxotrofia) y como marcador seleccionable, siendo dirigida la expresión por el promotor pAN. Además, estos vectores poseen sitios de endonucleasa de restricción únicos que permiten la clonación de casetes de expresión de antígenos en el vector y también poseen un gen de resistencia a la kanamicina, necesaria para la selección en *E. coli*, que puede ser retirado además por digestión con enzimas de restricción seguida por religamiento antes de la transformación de BCG. La ausencia de leucina ya sea en el medio de crecimiento *in vitro* (medio de crecimiento Middlebrooke caldo 7H9 o agar-agar 7H10) o *in vivo* proporciona una presión selectiva constante que obliga al rBCG a mantener el plásmido de complementación. Los detalles de los métodos utilizados para producir la cepa BCG [Delta]LeuD y una serie de vectores de complementación fueron descritos por Borsuk, S., et al., en "*Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in Mycobacterium bovis BCG*", *Tuberculosis, Vol. 87, Magazine 6, pp 474-480*, publicado en línea el 24 de septiembre de 2007. Las etapas implicadas en el desarrollo del vector de complementación pUP410 que se deriva de la familia de vectores de complementación se representan en la Figura 1.

45 De acuerdo con lo que se representa en la Figura 1, las etapas para obtener el vector pUP410 son las siguientes: obtención de la secuencia codificadora del gen LeuD por PCR usando los cebadores LeuDI (5'-AAT CTA GAA CAG CTA GGG GAT C-3' - SEQ ID NO: 1) y LeuDII (5'-TCC TGC AGT TCT ACG CCT CA-3' - SEQ ID NO: 2) y como molde DNA de *Mycobacterium bovis* BCG P3 (Isogen); digestión del fragmento amplificado (617 pb) con las enzimas XbaI y PstI; y, clonación posterior del plásmido pUS977 (Medeiros et al., 2002) que origina el vector denominado pUP400.

50 El gen *hyg*^R (1575 pb) se obtuvo a partir del vector PGOAL19 por digestión con la enzima KpnI [Parish, T. & Stoker, N.G. (2000). *Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement. Microbiology. 146:1969-1975*] y se unió al vector pU400 digerido con la misma enzima. Este procedimiento dio como resultado el vector pU401. Para eliminar el gen de resistencia a la kanamicina por digestión con HindIII, seguido por nuevo ligamiento, se sintetizó un adaptador que lleva el sitio HindIII y el extremo compatible PacI. Un microgramo de las secuencias Adap F (5'-GAT ATC AAG CTT AAG ACG CGT TAA-3') y Adap R (5'-TAA CGC GTC TTA AGC TTG ATA TCT A-3') se hibridaron por ebullición durante 1 minuto y luego se incubaron durante 3 horas a la temperatura ambiente. A continuación, se utilizaron quinientos nanogramos (ng) de los oligonucleótidos en una reacción de unión con 200 ng del vector pUP401 digerido con PacI. El producto de ligamiento se calentó a 70°C durante 10 minutos e inmediatamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se escindió y eluyó del gel. Se añadió al DNA eluido un tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5; NaCl

100 mM; EDTA 1 mM) y se calentó a 80°C durante 5 minutos. A continuación, el DNA se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente durante 3 horas y se utilizaron cinco microlitros para la transformación de la cepa TOP10 de *E. coli*. Los clones recombinantes se identificaron por digestión con HindIII y por secuenciación de DNA. La construcción resultante se denominó pUP402. A continuación se separó el gen *hyg^R* por digestión con KpnI dando como resultado el vector pUP410.

La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos, que no deberán ser considerados limitantes de la presente invención.

A. Construcción de la cepa Pasteur rBCG auxótrofa complementada con leucina (BCGr Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]Kan-hsp60*-Sm14)

10 Los cebadores PSm14F (TAT ATA TAT ATA TAG GCG CCA CCA CAA CGA CGC GC - SEQ ID NO: 3) y PSm14R (CGC GGG CGC CTT AGG ATG ATC GTT TAT A - SEQ ID NO: 4) fueron diseñados para que permitieran la amplificación por PCR del promotor hsp60* modificado y el casete de expresión Sm14 utilizando como molde el vector pAU5-Sm14. El amplicón de 816 pb resultante obtenido por PCR (Figura 2) se sometió a digestión con la enzima NarI y luego se clonó en el vector pUP410 digerido con la misma enzima. El análisis de la secuencia de DNA confirmó que el casete de expresión estaba insertado en la posición deseada. En la Figura 2, la pista 1 = Marcador [phi]X174RF/HaeIII y la pista 2 = amplicón hsp60*-Sm14.

La capacidad de la construcción pUP410-hsp60*-Sm14 para dirigir la expresión del antígeno Sm14 se evaluó en el hospedante de clonación sustituto (*Mycobacterium vaccae*). Por tanto, se utilizaron cinco transformantes individuales seleccionados en placas que contenían kanamicina para producir cultivos líquidos que se procesaron para análisis de la expresión por inmunotransferencia como describen Medeiros et al., (2002). La expresión del antígeno se detectó usando un antisuero policlonal de ratón anti-Sm14 con anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Se encontraron que las cinco colonias expresaban Sm14 a niveles equivalentes a los observados en *M. vaccae* transformado con pAU5-Sm14 (control positivo de expresión).

25 A continuación, se separó el gen de resistencia a la kanamicina de pUP410-hsp60*-Sm14 por digestión con la endonucleasa de restricción HindIII y el vector se volvió a circularizar usando ligasa T4 dando lugar a la construcción p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 que se utilizó para transformar la cepa Pasteur auxótrofa de BCG (BCG [Delta]LeuD). Los transformantes obtenidos se seleccionaron en placas de agar-agar Middlebrook 7H10 (no contienen leucina) y se analizaron para determinar la capacidad de crecimiento en presencia de kanamicina. A continuación, la estabilidad *in vitro* en términos de la capacidad de expresar la proteína Sm14 de tres transformantes individuales sensibles a la kanamicina, se evaluó en más de 60 generaciones en caldo Middlebrook 7H9 (no contiene leucina) y más de 10 días dentro de monocitos humanos y de múridos infectados utilizando métodos previamente descritos (Varaldo et al., 2002).

35 Con esta finalidad, se infectaron *in vitro* monocitos humanos o de múridos con dos clones de BCG estables transformados con la construcción p[Delta]K410-hsp60*-Sm14. Previamente se cultivaron los macrófagos (5 x 10⁵ por pocillo) en placas con 24 pocillos, utilizando como medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con HEPES 10 mM; L-glutamina 2 mM; y 1% de suero de bovino fetal. Después las monocapas de células se expusieron a niveles equivalentes a cada BCG recombinante con el fin de obtener una multiplicidad de infección (MOI: "multiplicidad de infección") de aproximadamente 10 células bacterianas por macrófago.

40 Los inóculos micobacterianos se prepararon por dilución del cultivo en fase logarítmica hasta la concentración deseada, basado en el recuento directo por microscopía óptica. Se recogieron muestras (seis pocillos por cultivo) 4 h, 24 h, 5 días y 10 días después de la exposición de macrófagos a BCG recombinante. La recogida después de la lisis de las monocapas con 0,1% de Tween en agua destilada (200 µL por pocillo) fue seguida por diluciones en serie del lisado y posterior inoculación en placas de agar-agar 7H10 o en el mismo medio suplementado con kanamicina.

45 Los niveles de crecimiento micobacteriano, observados a partir del análisis de las muestras recogidas después de 4 horas de exposición, se utilizaron para calcular la capacidad infecciosa relativa. Los valores obtenidos del recuento de unidades formadoras de colonias de otros puntos se utilizaron para calcular el nivel de persistencia intracelular. La estabilidad funcional (expresión del antígeno Sm14) se analizó por inmunotransferencia de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (Medeiros, 2002).

50 En todos los casos, se ha observado que los transformantes expresan la proteína Sm14 en niveles equivalentes a los observados en BCG de *M. bovis* transformado con pAU5-Sm14 (control positivo de expresión). Por tanto, se confirmó la estabilidad del sistema de expresión tanto en los medios no celulares como en el cultivo de células humanas y de múridos.

B. BCGr Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]Kan-hsp60*-Sm14 protege a los ratones contra la inoculación de cercarias de *S. mansoni*.

55 La capacidad de rBCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]Kan-hsp60*-Sm14 para proteger a los ratones contra cercarias vivas de *S. mansoni* se evaluó en dos experimentos separados. Cada experimento empleó 6 grupos experimentales (Tabla 1), conteniendo cada grupo 10 hembras de ratones suizos de 4 semanas. La eficacia de la vacunación con

una sola dosis administrada por vía intranasal (1×10^6 ufc = dosis estándar; o 1×10^2 ufc = dosis baja) de rBCG-(p[Delta]K21-Sm14) se comparó con la conseguida por la administración de dosis únicas similares de rBCG-(pAU5-Sm14) o 3 dosis de proteína rSm14 (10 µg en hidróxido de aluminio) en la pata tal como ha sido descrito anteriormente por Varaldo et al., (2004).

- 5 La dosis de proteína recombinante final se administró el mismo día que las dosis únicas de vacunas a base de BCGr. Para ensayos de protección, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (sc) con 100 cercarias de *S. mansoni* 30 días (experimento 1) o 60 días (experimento 2) después de las inmunizaciones iniciales y perfundidas 45 días después de la inoculación. La carga parasitaria y los niveles de protección en diferentes grupos de inoculación se calcularon de acuerdo con lo descrito anteriormente por Tendler et al., 1996. La importancia estadística se evaluó por la prueba t de Student.

Tabla 1 - Protocolo de inmunización empleado para evaluar la capacidad de rBCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 para conferir protección contra la inoculación con cercarias de *S. mansoni*

Grupo experimental	Inmunización (día 0)	Unidad formadora de colonias de BCG
A	Solución salina	-----
B	rBCG [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14) ^a	1×10^6
C	rBCG [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14) ^b	1×10^2
D	rBCG/pAUS-Sm14) ^a	1×10^6
E	rBCG/pAUS-Sm14) ^b	1×10^2
F	Sm14r (10 µg) en alumbre ^c (3 dosis individuales y consecutivas separadas una semana)	-----

a = dosis estándar, b = dosis baja, c = hidróxido de aluminio, como se describió anteriormente (Varaldo et al., 2004).

- 15 Los resultados de la inoculación están representados en la Tabla 2. Se puede observar que todos los grupos vacunados mostraron una disminución significativa de la carga parasitaria con relación a los animales de control (grupo de solución salina). Este resultado era claro tanto el día 30 como el día 60 después de la vacunación. En general, estos datos muestran claramente que rBCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]Kan-hsp60*-Sm14 es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora a los 30 días y que esta respuesta sigue siendo eficaz 60 días después de la inmunización. Además, la nueva cepa vacunal era tan protectora como la cepa BCGr/pAU5-Sm14 de acuerdo con lo descrito en la técnica anterior. Por último, el nivel de protección conseguido con una sola dosis administrada por vía intranasal (tanto 1×10^6 ufc = dosis estándar como 1×10^2 ufc = dosis baja) de BCGr Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]Kan-hsp60*-Sm14 era capaz de proporcionar un nivel de protección equivalente al obtenido con 3 dosis de proteína Sm14 recombinante formulada con hidróxido de aluminio como adyuvante.

- 25 Tabla 2 - Evaluación de la protección medida en términos de la reducción de la carga de gusanos en comparación con controles con PBS (solución salina) en ratones suizos inmunizados a los 30 y 60 días después de la vacunación

Inmunizados con	% de reducción de la carga de gusanos (30 días)	% de reducción de la carga de gusanos (60 días)
Solución salina	0	0
rBCG (p[Delta]K410-hsp60*-Sm14) ^a	46,0	63,0
rBCG ([p[Delta]K410-hsp60*-Sm14) ^b	57,4	57,4
rBCG (pAU5-Sm14) ^a	43,8	61,2
rBCG (pAU5-Sm14) ^b	39,6	66,4
rSm14 (10 µg) en alumbre ^c (3 dosis individuales y consecutivas separadas por una semana)	54,9	57,6

a = dosis estándar, b = dosis baja, c = como se describió anteriormente (Varaldo et al., 2004).

Después de lo descrito e ilustrado anteriormente, la firma solicitante confirma la eficacia de la cepa Pasteur de BCG [Delta]LeuD y el vector complementario p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 para obtener la cepa vacunal para el control de

infecciones por *Schistosoma mansoni* y parásitos relacionados basándose en la expresión del antígeno Sm14 natural.

5 Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria y los aspectos adicionales ventajosos explicados no deben considerarse como limitación. Debe observarse que la invención no está limitada a dichas realizaciones específicas y los expertos en la técnica deben tener en cuenta que cualquier característica particular adicional aquí introducida se debe entender sólo como una descripción para hacer que la invención se comprenda más fácilmente. Dentro del alcance de las reivindicaciones independientes son posibles características o medidas adicionales sin salirse del objeto reivindicado.

Listado de secuencias

<110> Fundação Oswaldo Cruz

5 <120> Cepa Pasteur de BCG auxótrofa y recombinante y su uso para combatir infecciones humanas causadas por parásitos

<130> P1733

10 <150> PCT/BR2010/000065
<151> 2009-03-10

<160> 4

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Mycobacterium bovis

20 <400> 1
aatctagaac agctagggga tc 22

25 <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Mycobacterium bovis

30 <400> 2
tcctgcagtt ctacgcctca 20

35 <210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Schistosoma mansoni

<400> 3
tatatatata tataggcgcc accacaacga cgcgc 35

40 <210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Schistosoma mansoni

45 <400> 4
cgcgggcgcc ttaggatgat cgttata 28

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa vacunal Pasteur de BCG auxótrofa y recombinante complementada por el aminoácido leucina que expresa una proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*, es decir, rBCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14, obteniéndose dicha cepa vacunal de acuerdo con las siguientes etapas:
- 10 (a) amplificación por PCR de un fragmento que contiene un casete de expresión de Sm14 que contiene un promotor hsp60* modificado, usando
- un vector pAU5-Sm14 como molde, teniendo dicho vector una secuencia de hsp60 modificado que contiene una deleción de cuatro pares de bases inmediatamente aguas arriba de la región promotora en combinación con la pérdida del primer par de bases de la secuencia del promotor hsp60 y en consecuencia es denominado hsp60*, y
- 15 - los cebadores PSm14F, es decir, TAT ATA TAT ATA TAG GCG CCA CCA CAA CGA CGC GC - SEQ ID NO: 3 y PSm14R, es decir, CGC GGG CGC CTT AGG ATG ATC GTT TAT A - SEQ ID NO: 4;
- (b) digestión con una enzima NarI de un amplicón de 816 pb, es decir, hsp60*-Sm14, obtenido por amplificación por PCR de la etapa (a), proporcionando un amplicón hsp60*-Sm14;
- 20 (c) clonación del amplicón hsp60*-Sm14 obtenido en la etapa (b) en un vector pUP410 digerido con la enzima NarI, dando lugar a una construcción pUP410-hsp60*-Sm14;
- (d) evaluación de la capacidad de la construcción pUP410-hsp60*-Sm14 para expresar la proteína Sm14 en *Mycobacterium vaccae*;
- 25 (e) eliminación del gen de resistencia a la kanamicina de la construcción pUP410-hsp60*-Sm14 por digestión con una endonucleasa de restricción HindIII; y
- 30 (f) re-circularización de la construcción pUP410-hsp60*-Sm14 digerida sin el gen de resistencia a la kanamicina utilizando ligasa T4 para producir la construcción pUP410-hsp60*-Sm14 digerida, que se utiliza para transformar una cepa Pasteur de BCG auxótrofa, es decir, BCG [Delta]LeuD, para producir una cepa Pasteur de BCG auxótrofa recombinante complementada con el aminoácido leucina que expresa una proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*, es decir, BCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14.
2. La cepa BCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la esquistosomosis.
- 35 3. La cepa BCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la fasciolosis.
4. La cepa BCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la tuberculosis.
- 40 5. La cepa BCG Pasteur [Delta]LeuD/p[Delta]K410-hsp60*-Sm14 de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de neoplasias.

Fig. 1

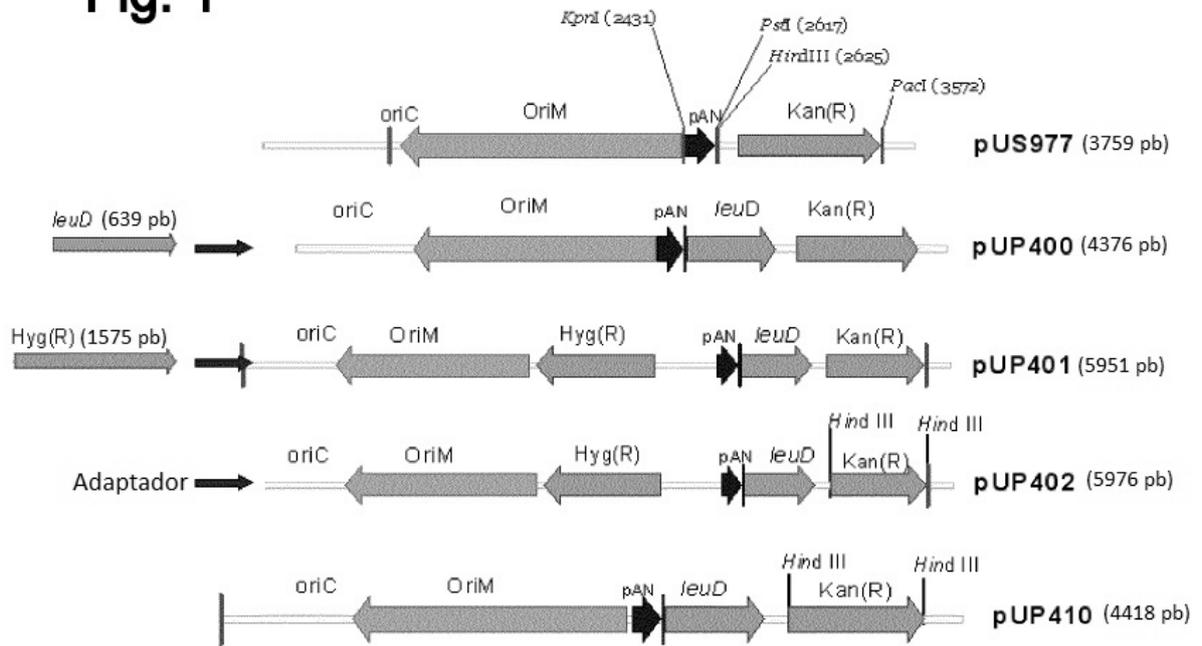


Fig. 2

