



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 281**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01927074 .3**

96 Fecha de presentación : **16.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1274453**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54

Título: **Vacunas de BCG recombinante contra agentes patógenos intracelulares y métodos de uso de las mismas.**

30

Prioridad: **17.04.2000 US 550468**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73

Titular/es:
**The Regents of the University of California
5Th Floor, 1111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US**

72

Inventor/es: **Horwitz, Marcus, A. y
Harth, Gunter**

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 315 281 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

Vacunas de BCG recombinante contra agentes patógenos intracelulares y métodos de uso de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con agentes inmunoterapéuticos y vacunas contra organismos patógenos intracelulares como bacterias, protozoos, virus y hongos en general. Específicamente, frente a anteriores vacunas y agentes inmunoterapéuticos sobre la base de subunidades patogénicas, agentes patógenos muertos y agentes patógenos naturales atenuados, la presente invención emplea agentes patógenos recombinantes atenuados, o especies estrechamente relacionadas, que expresan y secretan determinantes inmunogénicos de un agente patógeno seleccionado estimulando una respuesta inmune efectiva en hospederos mamíferos. Las vacunas inmunoestimulantes e inmunoterapéuticas de la presente invención son obtenidas de agentes patógenos intracelulares recombinantes atenuados, o de especies estrechamente relacionadas, que expresan determinantes inmunogénicos *in situ*.

15 **Antecedentes de la invención**

Durante mucho tiempo ha sido reconocido que los microorganismos parasitarios poseen la habilidad de contagiar a animales causando así la enfermedad y a menudo la muerte del huésped. Los agentes patógenos han sido una causa principal de muerte durante toda la historia y continúan infligiendo un sufrimiento inmenso. Aunque en los últimos cien años se han observado importantes avances en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, las interacciones huésped-parásito complicadas todavía limitan la eficacia universal de las medidas terapéuticas. Los dificultades de contrarrestar los sofisticados mecanismos invasores desplegados por muchos organismos patógenos se evidencian por el resurgimiento de varias enfermedades como la tuberculosis así como por la aparición de numerosas cadenas de bacterias y virus resistentes a los fármacos.

Entre esos agentes patógenos de mayor preocupación epidemiológica, las bacterias intracelulares prueban ser particularmente intratables ante las medidas terapéuticas o profilácticas. Las bacterias intracelulares, incluyendo el género *Mycobacterium* y el género *Legionella*, terminan su ciclo de vida completo o una parte del mismo dentro de las células del organismo huésped infectado más que extracelularmente. Las bacterias intracelulares son responsables de millones de muertes cada año en el mundo e incalculables sufrimientos. La tuberculosis es la principal causa de muerte en el mundo por parte de un único agente de enfermedad, con 10 millones de casos nuevos y 2,9 millones de muertes cada año. Además, las bacterias intracelulares son responsables de millones de casos de lepra. Las otras enfermedades debilitantes transmitidas por agentes intracelulares incluyen *leishmaniasis* cutánea o visceral, *trpanosomiasis americana* (la enfermedad de Chagas), *listeriosis*, *toxoplasmosis*, *histoplasmosis*, *trachoma*, *psittacosis*, *Q-fiebre*, y *legionelosis*. En este momento, relativamente poco puede hacerse para prevenir las infecciones debilitantes en individuos susceptibles expuestos a muchos de estos organismos. Debido a esta incapacidad de proteger efectivamente a la población de tales agentes patógenos intracelulares y a la morbilidad y mortalidad resultante en humanos y animales causada por estos agentes, la tuberculosis es actualmente una de las enfermedades más importantes a las que se enfrenta la humanidad.

Expertos en el tema apreciarán que en la siguiente explicación ejemplar de *M. tuberculosis* se ilustran las enseñanzas de la presente invención y de ninguna manera se quiere limitar el alcance de la presente invención al tratamiento de *M. tuberculosis*. De forma similar, las enseñanzas aquí no están limitadas de alguna manera al tratamiento de las infecciones tuberculosas. Por el contrario, esta invención puede emplearse para proporcionar vacunas seguras y eficaces ventajosamente y agentes inmunoterapéuticos contra cualquier agente patógeno usando agentes patógenos recombinantes atenuados, u organismos no virulentos, que expresen, y de igual importancia liberen las proteínas principales inmunológicamente de los organismos patógenos.

En la actualidad se considera que aproximadamente un tercio de la población del mundo está infectada de *M. tuberculosis*, resultando en millones de casos de tuberculosis pulmonar anualmente. Más específicamente, la tuberculosis pulmonar humana, principalmente causada por *M. tuberculosis*, es una causa principal de muerte en países en vías de desarrollo. Capaz de sobrevivir dentro de macrófagos y monocitos, la *M. tuberculosis* puede causar infección intracelular crónica. La *M. tuberculosis* es relativamente exitosa en eludir las defensas normales del organismo huésped ocultándose así dentro de las células primariamente responsables de la detección de elementos extraños y la subsiguiente activación del sistema inmune. Además, muchos de los agentes quimioterapéuticos de la línea de frente usados para tratar la tuberculosis tienen actividad relativamente baja contra organismos intracelulares comparados con formas extracelulares. Estas mismas características patogénicas han prevenido el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos completamente eficaces o vacunas contra las infecciones tuberculosas hasta ahora.

Aunque esta enfermedad es un problema de salud particularmente agudo en los países en vías de desarrollo de América Latina, África, y Asia, también se está haciendo cada vez más habitual en el primer mundo. En los Estados Unidos, poblaciones específicas, en especial individuos inmunodeficientes pobres de áreas urbanas e inmigrantes de áreas de alta incidencia de la enfermedad han incrementado el riesgo. En gran parte debido a la epidemia del SIDA, en los últimos años el índice de tuberculosis ha aumentado en países desarrollados, a menudo en forma *M. tuberculosis* resistente a multi-fármacos.

Recientemente, la resistencia de tuberculosis a uno o más fármacos fue reportada sobre 36 de los 50 estados de EE.UU. En la ciudad de Nueva York, un tercio de todos los casos evaluados es resistente a uno o más de los principales fármacos. Aunque la tuberculosis no resistente puede ser curada con un curso largo de antibióticos, las perspectivas respecto a la cepa resistente a fármacos son poco prometedoras. Los pacientes infectados con cepas resistentes a dos o más de los principales antibióticos tienen un índice de mortalidad de alrededor del 50%. En consecuencia, se necesitan con urgencia vacunas seguras y eficaces contra estas variedades de *M. tuberculosis*.

Las infecciones iniciales de *M. tuberculosis* casi siempre ocurren a través de la inhalación de partículas aerosolizadas ya que los agentes patógenos pueden permanecer viables por semanas o meses en un medio o esputo húmedo o seco. Aunque el sitio primario de la infección son los pulmones, el organismo también puede causar infección de casi cualquier órgano cercano, incluyendo, pero sin limitarse a, los huesos, el bazo, el riñón, los meninges y la piel. Dependiendo de la virulencia de la cepa particular y la resistencia del huésped, la infección y el daño correspondiente para el tejido podría ser menor o extensiva. En los casos de seres humanos, la infección inicial es controlada en la mayoría de los individuos expuestos a las cepas virulentas de la bacteria. El desarrollo de la inmunidad adquirida que sigue al desafío inicial reduce la proliferación bacteriana permitiendo así que lesiones se curen y dejando al sujeto en gran parte asintomático.

Cuando la *M. tuberculosis* no es controlada por el sujeto infectado esto resulta a menudo en una degradación extensiva del tejido pulmonar. En personas individuales susceptibles las lesiones son formadas en el pulmón generalmente cuando los bacilos de tubérculo se reproducen dentro de macrófagos alveolares o pulmonares. Cuando los organismos multiplican, podrían extenderse a través del sistema linfático derivar a nódulos linfáticos y a través del flujo de sangre a los vértices de pulmón, a médula de hueso, a riñón y meninges circundando el cerebro. Principalmente como el resultado de la respuestas de hipersensibilidad mediada por células, las características de las lesiones granulomatosas o tubérculos son producidas en la proporción a la gravedad de la infección. Estas lesiones constan de células de epitelio bordeadas por monocitos, linfocitos y fibroblastos. En la mayoría de los ejemplos una lesión o tubérculo se convierte en necrótica al final y pasan por caseación (la conversión de tejidos afectados en una sustancia caseosa blanda).

Aunque la *M. tuberculosis* es un agente patógeno importante, las otras clases del género *Mycobacterium* también causan enfermedades en animales, incluyendo el hombre, y están evidentemente dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, *M. bovis* puede infectar y es responsable de infecciones tuberculosas en animales domésticos como ganado vacuno, cerdos, ovejas, caballos, perros y gatos. Además, *M. bovis* puede infectar a seres humanos por la vía del tracto intestinal, típicamente por la ingestión de leche cruda. La infección intestinal localizada se extiende al final al tracto respiratorio y es seguida en breve por los síntomas clásicos de la tuberculosis. Otro vector patogénico importante del género *Mycobacterium* es el *M. leprae*, que causa millones de casos de la antigua enfermedad de la leprosis. Las otras especies de este género que causan la enfermedad en animales y hombres incluyen *M. Kansasii*, *M. avium intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. chelonae*, y *M. scrofulaceum*. Las especies micobacteriales patógenas presentan frecuentemente un alto grado de homología en su respectivo ADN y en las correspondientes secuencias de proteínas y algunas especies, como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, están muy relacionadas.

Por razones prácticas y obvias, el trabajo inicial en seres humanos para determinar la eficacia de composiciones experimentales con respecto a tales afecciones es impracticable. Por tanto, en el desarrollo temprano de cualquier fármaco o vacuna es el procedimiento usual emplear modelos de animal apropiados por razones de seguridad y costo. El éxito de implementar modelos de animal de laboratorio se basa en el conocimiento de que los epítopes inmunogénicos están frecuentemente activos en diferentes especies del huésped. Por lo tanto, un factor determinante de inmunogénicos en una especie, por ejemplo un roedor o cobaya, será inmunorreactivo en especies diferente en general como en seres humanos. Solamente después de que los modelos de animal apropiados sean desarrollados suficientemente los ensayos clínicos serán llevados en seres humanos para demostrar la inocuidad y la eficacia de una vacuna en el hombre.

Con respecto a las infecciones pulmonares y alveolares por *M. tuberculosis*, el modelo de la cobaya se asemeja en gran medida a la patología humana de la enfermedad. Por lo tanto, es bien comprendido por los expertos que es apropiado extrapolar el modelo de cobaya de esta enfermedad a seres humanos y a otros mamíferos. Como los seres humanos, las cobayas son propensas a la infección tuberculosa con bajas dosis de agente patógeno humano aerosolizado. A diferencia de los seres humanos donde la infección inicial es generalmente controlada, las cobayas contraen la enfermedad diseminada sobre la exposición para el agente patógeno aerosolizado, facilitando el análisis siguiente constantemente. Además tanto las cobayas como los seres humanos en los que la visualización cutánea de las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasada se caracterizaron por el desarrollo de una célula mononuclear densa sin duración o de área rígida en la piel en el sitio de prueba. Finalmente, las lesiones tuberculosas características de seres humanos y cobayas presentan morfología similar incluyendo la presencia de células *Langhans* gigantes. Como las cobayas son más propensas a la infección inicial y a la evolución de la enfermedad que los seres humanos, cualquier protección conferida en experimentos que usan este modelo de animal provee una señal poderosa de que la misma inmunidad protectora puede ser generada en el hombre u otros mamíferos menos susceptibles. Por lo tanto, para los propósitos de la explicación solamente y no para los propósitos de la limitación, la presente invención será demostrada principalmente en el contexto ejemplar de cobayas como el huésped mamífero. Los expertos apreciarán que la presente invención pueda ser practicada con otros hospederos mamíferos incluyendo seres humanos y animales domesticados.

Cualquier animal o ser humano infectado con un organismo patógeno y, en particular, un organismo intracelular, presentan un desafío difícil al sistema inmunológico del huésped. Mientras muchos agentes infecciosos pueden ser controlados por la respuesta humoral y la producción correspondiente de anticuerpos protectores efectivamente, estos mecanismos son principalmente eficaces solamente contra esos agentes patógenos ubicados en el fluido extracelular del cuerpo. En particular, los anticuerpos opsonizantes se unen a agentes extraños extracelulares siendo propensos a fagocitosis y la subsecuente muerte intracelular esto aún no es el caso para otros agentes patógenos. Por ejemplo los estudios previos han indicado que la respuesta inmune humoral no parece tener un papel protector importante contra las infecciones por bacterias intracelulares como *M. tuberculosis*. Sin embargo, la presente invención puede generar una respuesta humoral beneficiosa al agente patógeno blanco y, como tal, su eficacia no está limitada a ningún componente específico de la respuesta inmune estimulada.

Más específicamente defensas mediadas de anticuerpo aparentemente no previenen la infección inicial de agentes patógenos intracelulares y son ineficaces en cuanto las bacterias están apartadas dentro de las células del huésped. Como proteínas solubles en agua, los anticuerpos pueden penetrar el fluido extracelular y la sangre, pero tener problemas al emigrar al otro lado de las membranas de lípido de las células. Más lejos, la producción de anticuerpos opsonizantes en contra de las estructuras de superficie bacteriales puede ayudar a agentes patógenos intracelulares en realidad a entrar en la célula del huésped. Por lo tanto, cualquier medida profiláctica efectiva en contra de agentes intracelulares, como *Mycobacterium*, debe incluir un componente de respuesta inmune mediado por una célula agresiva que resulta en la proliferación rápida de antígenos linfocitos específicos que activan a los fagocitos comprometidos o los citotóxicamente eliminados. Sin embargo, como se discutirá en detalle más adelante, producir una respuesta inmune mediada por célula no iguala la inducción de la inmunidad protectora. Aunque la inmunidad mediada por célula podría ser un requisito esencial a la inmunidad protectora, la producción de vacunas de conformidad con las enseñanzas de la presente invención requiere estudios de desafío basados en animales.

Esta respuesta inmune mediada por célula involucra dos pasos en general. El paso inicial, indicando que la célula está infectada, es logrado por moléculas especiales (moléculas de gran histocompatibilidad o moléculas MHC) que entregan fragmentos del agente patógeno a la superficie de la célula. Estas moléculas MHC se unen a fragmentos pequeños de proteínas bacteriales que han sido degradadas dentro de la célula infectada y las presentes en la superficie de la célula. Su presentación estimula células T estimuladas del sistema inmune del huésped a eliminar la célula del huésped infectada o induce a la célula del huésped a erradicar cualquier bacteria que reside dentro de ella.

El intentar erradicar la tuberculosis usando vacunación se inicia en 1921 después de que Calmette y Guérin atenuaron con éxito una cepa virulenta de *M. bovis* con el uso de la técnica de paso en serie. La vacuna viva resultante se desarrolló en el Instituto Pasteur en Lille, Francia es conocida como el *Bacille Calmette y Guérin*, o vacuna de la BCG. Casi ochenta años después esta vacuna permanece como la única terapia profiláctica para la tuberculosis presentemente en uso. A decir verdad, todas las vacunas de BCG disponibles hoy se derivan de la cepa original de *M. bovis* desarrollada por Calmette y Guérin en el Instituto Pasteur.

La Organización Mundial de la Salud considera la vacuna de BCG un factor esencial para reducir la tuberculosis mundialmente, especialmente en naciones desarrolladas. En teoría, la vacuna de BCG confiere la inmunidad mediada por célula contra un *mycobacterium* atenuado que está inmunológicamente relacionado con la *M. tuberculosis*. La respuesta inmune como resultado debe prevenir la tuberculosis primariamente. Por lo tanto, si la tuberculosis primaria se previene, las infecciones latentes no pueden existir y la reactivación de la enfermedad se evita.

Sin embargo los ensayos clínicos controlados han revelado las diferencias relevantes en la eficacia de la vacuna. Las proporciones de la eficacia han variado entre 0-80%. Los ensayos de vacuna dirigidos en escolares ingleses informaron sobre una protección de vacunación de 10 años con una proporción superior(es) a 78%. Sin embargo, en un ensayo similar en el sur de la India, la BCG dejó de proteger contra la tuberculosis primaria en los primeros 5 años después de la inoculación. Un análisis objetivo reciente de la eficacia de BCG en la prevención de la tuberculosis calculó que esa eficacia profiláctica en conjunto era aproximadamente 50% (Colditz, G.A. T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, y F. Mosteller. 1994. JAMA 271: 698-702).

Esta disparidad extraordinaria en proporciones de eficacia reportadas permanece como un problema irritante para inspectores de sanidades y profesionales que deben determinar cuándo y cómo usar la vacuna de BCG. Numerosos factores han sido implicados que puede explicar estas disparidades de eficacia observadas incluyendo las diferencias en las técnicas de fabricación, rutas de inoculación y características de las poblaciones y ambientes en los que las vacunas han sido usadas. El trabajo reciente indica que el contacto incidental con micobacteria ambiental podría resultar en una "Vacuna natural" que impide al receptor de vacuna de montar una respuesta efectiva para proteínas de BCG naturales.

Para minimizar la variación de inmunogenicidad de BCG, las vacunas producidas mantienen en el estado liofilizado (hielo seco) como acciones de la cepa de vacuna original. Cada producción derivada de la cepa es colocada por turno llamada después por el sitio de fabricación, la compañía o la cepa bacteriana, por ejemplo: BCG-Londres, BCG-Copenhague, BCG-Connaught, o BCG - Tice (comercializada mundialmente por *Organon, Inc.*). En un esfuerzo de normalizar las técnicas de fabricación en los Estados Unidos, la Dirección de Alimentación y Fármacos federal (FDA), el Centro para la Educación Biológica y la Investigación (CBER) regulan la fabricación de la vacuna. La rama CBER de la FDA ha especificado que cada cepa de BCG liofilizada usada para la vacunación debe ser capaz de inducir una reacción de prueba de piel del tuberculino especificada en cobayas y seres humanos. Desafortunadamente la sensibilidad del tuberculino producida no ha sido demostrada tener correlación con la inmunidad protectora.

Las vacunas de BCG en curso son suministradas como cultivos liofilizados que son rehidratados con diluyente estéril inmediatamente antes de la administración. La vacuna de BCG es dada en el parto, en la infancia, o en la infancia temprana en países que practican la vacunación de BCG, incluyendo países en vías de desarrollo y desarrollados. Visitas de adultos a regiones endémicas que pueden haber sido expuesto a dosis altas de micobacteria contagioso podrían recibir BCG como un profiláctico siempre que la prueba de piel no sea reactiva. Las reacciones adversas para la vacuna son poco frecuentes y están en general limitadas a ulceraciones en la piel y a linfadenitis cerca del sitio de inyección. Sin embargo, a pesar de estas reacciones adversas poco frecuentes, la vacuna de BCG tiene una historia sin paralelo de la inocuidad con más de tres mil millones de dosis de haber sido administrado mundialmente desde 1930.

Han pasado 80 años desde que la BCG fue desarrollada y aún encontramos carencias de alternativas de vacuna aceptables. Recientemente, los inventores presentes han hecho un progreso considerable en el aislamiento, la caracterización y expresión recombinante de proteínas extracelulares segregadas por agentes patógenos intracelulares. Por ejemplo, la patente US 5,108,745, concedida en Abril 28, 1992 y varias solicitudes de patentes de Estados Unidos pendientes proveen vacunas y métodos de producir la inmunidad protectora contra *L. pneumophila* y *M. tuberculosis* tanto como otros agentes patógenos intracelulares. Estas vacunas anteriores de forma general están basadas en productos extracelulares originalmente obtenidos de compuestos de proteináceas liberadas extracelularmente por las bacterias patógenas en el caldo de cultivo *in vitro* y liberadas extracelularmente por bacterias dentro de células del huésped infectadas *in vivo*. Como se indica ahí, estas vacunas están basadas selectivamente en la identificación de productos extracelulares o sus análogos que estimulan una respuesta inmune fuerte contra el agente patógeno en un huésped mamífero.

Las vacunas preparadas de productos extracelulares seleccionados de *M. tuberculosis* están siendo optimizadas actualmente para emplearse como terapias profilácticas humanas. Los cócteles de proteína y preparaciones de proteína individuales que usan ambos recombinantes así como las proteínas expresadas naturalmente están en estudio. Un objetivo de estos estudios en curso es maximizar la respuesta inmune de base a través de la presentación de un inmunógeno (proteína) óptimo. Hasta la fecha, más de 100 preparaciones diferentes han sido realizadas, incluyendo 38 combinaciones de proteínas diferentes, 26 adyuvantes diferentes, 10 concentraciones de proteína diferentes y siete regímenes de dosis diferente. Las proteínas de candidato a vacuna también han sido acopladas a proteínas de no *M. tuberculosis* incluyendo albúmina de suero bovina, proteína segregada principal de *Legionella sp.*, y toxoide tetánico. Esta lista no está considerada dentro de los métodos que los inventores presentes han usado para presentar proteínas extracelulares de agentes patógenos intracelulares de huésped animales; más bien ilustra la complejidad enorme y la inherente variabilidad relacionada con la optimización de vacunas. Sin embargo, a pesar de estas y otras actividades, la no combinación de proteínas extracelulares, adyuvantes, proteínas portadoras, concentraciones o frecuencias de dosis resultaron en la inducción a una respuesta inmune protectora en cobayas que era comparable o superior a la BCG.

Recientemente se concentrado una atención importante en el uso de cepas de BCG transformadas para producir vacunas que expresen antígenos de célula asociados. Por ejemplo, C.K.Stover, *et al.* ha reportado una vacuna de la enfermedad de Lyme que usa una BCG recombinante (rBCG) que expresa la membrana de lipoproteína asociada OspA *Borrelia burgdorferi*. De forma semejante, el mismo autor produjo una vacuna de rBCG expresando a una proteína de superficie de neumococo (PsPA) del *Streptococcus pneumoniae*. (Stover, C.K., G.P. Bansal, S. Langerman, y M.S.Hanson. 1994. Inmunidad protectora extraída por vacunas de rBCG. En: Brown F. (ed): vectores de Recombinante Vectors in Vaccine Development Dev Biol Stand. Dassel, Karger, Vol. 82, 163-170). WO88/06626 describe vacunas micobacterianas recombinantes que vehículos capaces de expresar ADN ajeno portador de un vector conector, usando *M. smegmatis* como micobacteria.

El número de patente de los Estados Unidos (USPN) 5,504,005 ("patente 005.") y la USPN 5,854,055 ("patente 055.") ambas concedidas a B.R Bloom *et al.* revelan vectores de rBCG teóricos expresando una extensión amplia de célula asociadas a proteínas de fusión de numerosas especies de microorganismos. Los vectores teóricos descritos en estas patentes tampoco están dirigidos a células asociadas a proteínas de fusión, lo contrario a antígenos de proteínas no fusionados extracelulares, y el rBCG está expresando proteínas de fusión hipotéticamente de las especies vagamente relacionadas. Además la célula recombinante de proteína de fusión asociada expresada en estos modelos está codificada sobre ADN integrado en el genoma del huésped y bajo el control de promotores de conmutación de calor. Por consiguiente, los antígenos expresados son de fusión de proteínas por menos de la que las proteínas y la expresión están limitadas a niveles aproximadamente iguales, o menores que, las proteínas naturales del vector.

Es más, ni la patente '005 ni la '055 revelan la prueba de seguridad del modelo animal, el desarrollo de respuesta inmune o la inmunidad protectora de un sistema animal que emula la enfermedad humana de cerca. Además, solamente vectores de rBCG teóricos que expresan proteínas de fusión de *M. tuberculosis* son revelados en la '005 y la '055, y ninguna de las vacunas presentes están permitidas. Esos modelos revelados de vacuna para *M. tuberculosis* están dirigidos a proteínas de fusión de conmutación de calor asociadas a células, no a proteínas de no fusión extracelulares.

El número de patente de los Estados Unidos 5,830,475 ("patente '475") también descubre vacunas micobacterianas teóricas usadas para expresar proteínas de fusión. La codificación de ADN para estas proteínas de fusión reside en plásmidos extracromosomales bajo el control de proteína de conmutación de calor micobacterianas y promotores de proteína de tensión. Las vacunas reveladas son con la intención de extraer las respuestas inmunes en animales no en humanos para el propósito de producir anticuerpos a eso y no mostraron la prevención de enfermedades de agente patógeno intracelulares en mamíferos. Además, la patente '475 no revela el agente vacunante recombinante que usa promotores específicos de proteína para expresar proteínas de no fusión extracelulares.

Los inventores presentes proponen, sin limitación, que las principales proteínas de no fusión extracelulares de agentes patógenos intracelulares podrían ser importantes moléculas inmunoprotectoras. Primero, proteínas extracelulares de no fusión, en virtud de su liberación por el agente patógeno en el entorno intracelular de la célula del huésped, están disponible para el procesamiento y presentación al sistema inmunológico como fragmentos restringidos a las moléculas de MHC sobre la superficie de célula del huésped. Estos complejos de péptido-MHC sirven para alertar el sistema inmunológico sobre la presencia dentro de la célula del huésped de un invasor escondido, permitiendo al sistema inmune de montar un ataque antimicrobiano apropiado en contra del invasor. Segundo, la inmunización efectiva con proteínas extracelulares es capaz de producir una población de células inmunes que reconozcan los mismos complejos de péptido-MHC en el futuro cuando los complejos son exhibidos sobre células del huésped invadidas por el agente patógeno intracelular relevante. Las células inmunes pueden por lo tanto, apuntar a las células del huésped infectadas y activarlas con citoquinas, permitiendo así que restrinjan el crecimiento del agente patógeno intracelular, o destruir ellos, negando así al agente patógeno el entorno intracelular en el que prospera. En tercer lugar, entre las proteínas extracelulares, las más importantes, por ejemplo, las que se producen más en abundancia, figurarán mas prominentemente como moléculas inmunoprotectoras desde que podrían suministrar de forma general la visualización más abundante de complejos de péptido-MHC al sistema inmunológico.

Por lo tanto, permanece una necesidad de vacunas de agente patógeno intracelulares recombinantes que expresen las principales proteínas de no fusión extracelulares de agentes patógenos intracelulares que están estrechamente relacionadas con el agente vacunante. Además, hay una necesidad de vacunas de agente patógeno intracelular recombinante que sean capaces de expresar completamente proteínas de no fusión extracelulares recombinantes en virtud de ADN extracromosomal que tenga promotores de gen de no choque térmico o promotores de gen de proteínas de no estrés.

Específicamente, existe una necesidad urgente de producir vacunas de agente patógeno intracelulares que provean una protección de receptores de las enfermedades superior a la protección proporcionada a receptores de vacuna de la BCG. Además, hay una necesidad urgente de suministrar tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo con un costo eficiente, tratamientos inmunoterapéutico y profiláctico para la tuberculosis y otros agentes patógenos intracelulares.

Otro objetivo de la presente invención es suministrar vacunas para prevenir las enfermedades de agentes patógenos intracelulares usando el Bacille Calmette-Guerin (BCG) que ha sido transformado para expresar la Micobacteria tuberculosis 30 km más importante de proteína extracelular.

Es otro objetivo de la presente invención suministrar vacunas para el tratamiento y la prevención de enfermedades de micobacterias usando (BCG) recombinante que exprese la llamada proteína extracelular.

Otro objetivo de la presente invención es suministrar vacunas para el tratamiento y la prevención de la tuberculosis que use cepas recombinantes de BCG que expresen y secreten una o más proteínas extracelulares principales de la tuberculosis de *Mycobacterium tuberculosis*.

40 Resumen de la invención

La presente invención logra los objetivos arriba descritos y otros suministrando una nueva clase de vacunas e inmunoterapéuticos y métodos para tratar y prevenir las enfermedades de agentes patógenos intracelulares en mamíferos. Históricamente las vacunas de agentes patógenos intracelulares e inmunoterapéuticos han estado preparadas del agente patógeno intracelular mismo o especies relativas cercanas. Estos antiguos modelos de vacuna estaban compuestos del microorganismo entero o fragmentos del mismo. Por ejemplo, la primera y única vacuna disponible en la actualidad para la *Mycobacterium tuberculosis* es una vacuna de un fragmento vivo atenuado elaborada con un agente patógeno intracelulares relacionado de *M. bovis*. Recientemente, los inventores presentes han descubierto que los productos extracelulares específicos de agentes patógenos intracelulares que son secretados en un medio de cultivo pueden ser usados para respuestas inmunes protectoras ilícitas en mamíferos como subunidades individuales, o en combinaciones de subunidades. Sin embargo, estas subunidades de vacunas no han demostrado ser superiores a la vacuna atenuada original derivado de *M. bovis*.

La presente invención detalla vacunas e inmunoterapéuticos como se define en las reivindicaciones.

Las proteínas extracelulares principales expresadas por BCG recombinante incluyen, pero no se limitan a, los 12 kDa, 14 kDa, 16 kDa, 23 kDa, 23.5 kDa, 30 kDa, 32A kDa, 32B kDa de, 45 kDa, 58 kDa, 71 kDa, 80 kDa, y 110 kDa de *Mycobacterium sp.* y los análogos respectivos, homólogos y las subunidades del mismo incluyendo proteínas recombinantes de no fusión, las proteínas de fusión y los derivados del mismo. Es evidente para los expertos que los pesos moleculares usados para identificar las proteínas principales extracelulares de Micobacteria y otros agentes patógenos intracelulares son solamente un intento de aproximación. Expertos en la tecnología recombinante y biología molecular se darán cuenta de que es posible co-expresar (co-traducir) estas proteínas con aminoácidos adicionales, polipéptidos y proteínas, como también es posible expresar estas proteínas de formas truncadas. Las proteínas modificadas están consideradas todavía dentro del alcance de la presente invención en términos nativos proteínas de no fusión, proteínas de fusión, proteínas híbridas o proteínas quiméricas. Para los propósitos de la presente invención, las proteínas de fusión definidas incluyen, pero no se limitan a, los productos de dos ó más secuencias que codifican a genes diferentes que han sido clonados juntos y que, después de la traducción, forman una secuencia de polipéptido simple.

La revelación presente también describe agentes vacunales de patógeno intracelular atenuado recombinante que expresan proteínas de fusión completa de al menos otro agente patógeno intracelular. Esto se logra por el uso ácidos nucleicos extra-cromosómicos que expresan al menos un gen inmunogénico del antígeno recombinante y se pone este(os) gen(es) bajo el control de promotores de gen de no choque térmico o promotores de gen de proteínas de no estrés, con preferencia de secuencia de promotores específicos de proteína. Por consiguiente, las vacunas son suministradas teniendo no fusión, antígenos inmunogénicos recombinante expresados en grandes cantidades posibles cuando los genes que codifican para antígenos inmunogénicos recombinante están establemente integrados en el ADN genómico del agente vacunal. Por consiguiente, vacunas de agente patógeno intracelulares, tiene sorprendentemente superior precisión y potencia que subunidades existentes o vacunas de agente patógenos intracelular atenuadas que son suministradas.

Además la revelación presente describe los métodos de tratar y prevenir las enfermedades en mamíferos causadas por agentes patógenos intracelulares con el uso de las vacunas de la presente invención. Una lista parcial de los muchos agentes patógenos intracelulares que pueden ser usados como agentes vacunales atenuados y la fuente de los antígenos inmunogénicos recombinante incluye, pero no se limita a, *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. avium*, *Mycobacterium sp.*, *Legionella pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *Legionella sp.*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia tyfi*, *Rickettsia sp.*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia fagocytophila* geno group, *Ehrlichia sp.*, *Coxiella burnetii*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria sp.* y *Histoplasma sp.* La BCG recombinante que expresa el 30 kDa de la proteína extracelular principal de *M. tuberculosis* de acuerdo a la invención puede ser administrada a mamíferos usando inoculaciones intradérmicas. Sin embargo, se comprende que las vacunas de la presente invención pueden ser administradas usando cualquier enfoque que resulta en una respuesta inmune apropiada que incluye pero no se limita a, subcutáneos, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, oral, o inhalación. Siguiendo un período post inoculación apropiado, los mamíferos fueron desafiados con una infección de *M. tuberculosis* aerosol. Los mamíferos que recibieron la vacuna de la presente invención quedaron notablemente libres de la enfermedad comparados con mamíferos que recibieron solamente BCG, solamente la proteína extracelular principal, o cualquier combinación de estas.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se evidenciarán para los expertos a partir de considerar la siguiente descripción detallada de las realizaciones ejemplares preferidas de las mismas tomadas conjuntamente con las figuras que serán descritas brevemente primero.

Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 representa geles de cepa azul de Coomassie identificados como 1a y 1b los cuales ilustran la secreción de *Mycobacterium tuberculosis* recombinante 30 kDa por cepas transformadas de BCG desde filtrados de cultivo.

La Fig. 2 representa gráficamente los resultados de dos experimentos identificados como 2a y 2b diseñados para comparar resultados de pruebas de cobayas inoculadas con la vacuna de BCG recombinante que expresa la proteína extracelular 30 kDa de *M. Tuberculosis*, con BCG sola, con la proteína 30 kDa recombinante sola, o con una vacuna falsa.

La Fig. 3 representa gráficamente el cambio de peso en cobayas identificado como 3a y 3b seguida por un desafío de inmunización posterior con la *M. tuberculosis*.

La Fig. 4a representa gráficamente unidades formadoras de colonia (CFU) de *M. tuberculosis* contagiosa recuperadas de pulmones de cobayas siguiendo el desafío de inmunización posterior con *M. tuberculosis*.

La Fig. 4b representa gráficamente unidades formadoras de colonia (CFU) de *M. tuberculosis* contagiosa recuperadas del bazo de cobayas siguiendo el desafío de inmunización posterior con *M. tuberculosis*.

La Fig. 5 representa gráficamente la reacción de prueba de piel de cobayas para vacuna falsa, BCG sola y BCG administrada con recombinante 30 kDa *M. tuberculosis*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención esta dirigida en general a vacunas y a inmunoterapéuticos para el tratamiento y prevención de infecciones en seres humanos y animales causadas por agentes patógenos intracelulares. Específicamente, la presente invención está dirigida a optimizar la presentación de antígeno de agente patógeno intracelular para permitir al receptor de vacuna inmunoterapéutico generar la respuesta inmune máxima a proteínas terapéuticas y profilácticas importantes. Los inventores presentes, tras años de investigación y experimentación, han descubierto sorprendentemente que la terapia próspera y profilaxis de infecciones de agente patógeno intracelular usando proteínas extracelulares derivadas del agente patógeno intracelular es una función de la presentación de proteína al huésped.

La presentación de antígeno abarca un grupo de variables que determinan cómo un receptor se procesa y responde a un antígeno. Éstas variables pueden incluir, pero no se limitan a, adyuvantes, concentración del componente de vacuna, moléculas portadoras, haptenos, frecuencia de dosis y ruta de administración. Los inventores presentes han demostrado que antígenos idénticos compuestos de manera diferente resultarán en variaciones de respuesta estadísti-

camente significativas en huéspedes genéticamente similares. Por ejemplo, dos preparados de vacuna de la proteína extracelular 30 kDa de *M. tuberculosis* se prepararon empleando la misma proteína y concentraciones de adyuvante. A un grupo de cobayas se les administró una vacuna que contenía solamente la proteína 30 kDa y adyuvante; a un segundo grupo de cobayas se le administró la misma vacuna que al primer grupo con la excepción de que IL-12 se añadió a la segunda vacuna. Cuando las medias de las respuestas inmunes de ambos grupos se compararon, las cobayas que recibieron la vacuna más IL-12 demostraron una respuesta inmune superior estadísticamente significativa.

La presente invención describe la unión de dos tecnologías, una conocida durante más de ochenta años, la otra un producto de los años 90. Juntas, representan un enfoque completamente nuevo y asombrosamente efectivo en cuanto a la presentación de proteínas extracelulares de patógenos intracelulares a receptores y la inducción a respuestas inmunes protectoras excepcionalmente resistentes a estos agentes. Los inventores presentes han intentado más de 100 métodos de presentación de antígeno diferentes que emplean proteínas extracelulares de *Mycobacterium tuberculosis* como agente patógeno intracelular ejemplar. Sin embargo, a pesar de los muchos éxitos conseguidos por los inventores presentes, nada había producido una respuesta inmune superior a la observada con el empleo de la vacuna de BCG sola.

En pocas palabras, y únicamente como ejemplo general, la presente invención incluye vacunas de agentes patógenos intracelulares con el empleo de agentes patógenos intracelulares recombinantes atenuados, o no virulentos, ("agente vacunal") que expresan y segregan antígenos inmunogénicos recombinantes de la misma especie, otra especie, o ambos ("inmunógeno(s)") como se describe en las reivindicaciones, el agente vacunal y el(los) inmunógeno(s) son denominados colectivamente "vacunas" en la presente invención. Las vacunas son administradas empleando una o más rutas, que incluyen pero no se limitan a, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intradérmica, oral, o inhalación. El agente vacunal de la presente invención sobrevive dentro del receptor que expresa y segrega el(los) inmunógeno(s) *in situ* (estado).

Sin pretensión de estar obligados a mantener esta teoría, los inventores presentes han propuesto que los antígenos inmunogénicos de agentes patógenos oportunistas tales como *Legionella sp.* tienen respuestas inmunes protectoras ilícitas con mayor facilidad que los antígenos inmunogénicos similares de agentes patógenos de animales más tradicionales como *Mycobacterium sp.* Presiones selectivas podrían permitir a estos agentes patógenos como *Mycobacterium sp.*, que co-evolucionaron con sus huéspedes naturales, mecanismos de evasión inmunes de los que carecen los agentes patógenos incidentales u oportunistas. Por consiguiente, deben desarrollarse agentes vacunales e inmunógenos significativamente más fuertes para extraer respuestas inmunes protectoras contra *Mycobacteria* patógena que los que se requieren para extraer la inmunidad protectora contra agentes patógenos para los que los seres humanos no son un huésped principal.

Los inventores presentes han demostrado previamente que las proteínas extracelulares de agentes patógenos intracelulares oportunistas como *Legionella sp.* permiten protección inmune importante a animales cuando se administran en forma purificada o en cócteles usando el adyuvante de Freund completo o incompleto. (ver USPN 5,108,745).

Sin embargo, los intentos de obtener respuestas inmunoprotectoras similares empleando proteínas extracelulares de *M. OercluLosi4* bajo condiciones similares no han sido tan exitosas. Por consiguiente, los inventores presentes han propuesto que la sobre expresión de proteínas extracelulares de no fusión podría ser un aspecto importante de presentación de antígeno y el desarrollo de respuestas inmunes protectoras. Sin embargo, es comprendido que mientras la sobre expresión de proteínas extracelulares de no fusión podría ser un factor importante en la extracción de la inmunidad protectora, no se cree que sean los únicos factores inmunoestimulados proporcionados por las vacunas de la presente invención.

La presente invención es perfectamente apropiada para preparar vacunas inmunoprotectoras altamente eficaces contra una variedad de agentes patógenos intracelulares que incluyen, pero no se limitan a, la sobre expresión de cepas de BCG de las principales proteínas extracelulares de no fusión de *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. leprae*. Cada vacuna de la presente descripción puede expresar al menos un inmunógeno de varios pesos moleculares específicos para un agente patógeno intracelular en particular. Por ejemplo, los inventores presentes han identificado previamente inmunógenos de *M. Tuberculosis* que pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas extracelulares principales 12 kDa, 14 kDa, 16 kDa, 23 kDa, 23,5 kDa, 30 kDa, 32A. KDa, 32B kDa, 45 kDa, 58 kDa, 71 kDa, 80 kDa, 110 kDa y los análogos respectivos, los homólogos y las subunidades que incluyen proteínas de no fusión recombinante, proteínas de fusión y sus derivados. (Ver solicitudes de patentes de Estados Unidos pendientes con números de serie 08/156,358 (6,752,993) y 09/157,689 (6,599,510).

Es evidente para los expertos que los pesos moleculares empleados para identificar las proteínas extracelulares principales de *Mycobacteria* y otros agentes patógenos intracelulares pretenden solamente ser aproximaciones. Los expertos en tecnología recombinante y biología molecular se darán cuenta de que es posible co-expresar (co-traducir) estas proteínas con aminoácidos adicionales, polipéptidos y proteínas, así como también es posible expresar estas proteínas en formas truncadas. Las proteínas modificadas resultantes se considera que están dentro del alcance de la revelación presente ya sean llamadas nativas, proteínas de no fusión, proteínas de fusión, proteínas híbridas o proteínas quiméricas. Para los propósitos de la revelación presente, las proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, los productos de dos o más secuencias de codificación de genes diferentes que han sido clonados juntos y que, después de la traducción, forman una secuencia de polipéptido simple.

La expresión de antígeno, incluyendo proteínas extracelulares, se eleva en general cuando genes codificados para proteínas recombinantes de no fusión están ubicados, y bajo el control de, uno o más plásmidos (ADN extracromosomal) en vez de estar integrados en el genoma del huésped. Además, la expresión de la proteína guiada por la secuencia del promotor específico para una proteína en particular permite la expresión mejorada y el plegado de la proteína mejorada que pliega y el procesamiento del antígeno de la proteína de no fusión. Por lo tanto, la presente invención provee proteínas extracelulares recombinantes de no fusión codificadas sobre ADN extracromosomal que son controladas por promotores de gen de no choque térmico o promotores de gen de proteínas de no estrés, preferentemente secuencias de promotor de proteínas específicas.

La presente invención proporciona agentes vacunales de patógenos intracelulares atenuados recombinantes llamados BCG como se define en las reivindicaciones. Sin embargo, se ha demostrado tras 80 años de estudios que las proteínas extracelulares endógenas de BCG solas no proporcionan protección completa en todos receptores. Además, como será explicado más en detalle debajo, los inventores presentes han demostrado también que co-inyectando simplemente proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* junto con BCG tradicional no resulta en vacunas superiores a BCG sola.

La vacuna de la presente invención incluye un agente vacunal de BCG recombinante que expresa solamente un inmunógeno, a saber la proteína extracelular principal de 30kDa de *M. tuberculosis*. En otra realización de la revelación presente la BCG recombinante puede expresar dos o más inmunógenos, por ejemplo las proteínas extracelulares principales 23,5 kDa y las 30 kDa. Esta última realización podría ser particularmente efectiva como vacuna para prevenir enfermedades en mamíferos. Los inventores presentes han propuesto la teoría no limitante de que la sobreexpresión simultánea de las proteínas extracelulares principales 23,5 kDa y 30 kDa de *M. tuberculosis* por una BCG recombinante puede actuar sinérgicamente para agudizar la respuesta inmunoprotectora mamífera contra agentes patógenos intracelulares de la presente revelación. Esta teoría está parcialmente basada en la observación de tipo salvaje y la BCG recombinante son mutantes de supresión de *M. bovis* que no expresan naturalmente su propia proteína extracelular principal 23,5 kDa.

Por concisión, y debido a la descripción enormemente compleja que eso conllevaría, pero no con la intención de limitación, la presente invención será descrita usando una BCG recombinante como agente de vacunación y proteínas de no fusión extracelulares de *M. tuberculosis*, a saber, la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa, como realización ejemplar de la presente invención. Se comprende que cualquier antígeno inmunogénico recombinante puede ser expresado por cualquier agente patógeno intracelular atenuado recombinante, y que las vacunas de la presente invención no están limitadas a la BCG como agente vacunal ni a las proteínas extracelulares principales de no fusión de *M. tuberculosis* como inmunógenos.

Para determinar los efectos de variación de las cepas del agente vacunal, se usaron dos cepas de BCG diferentes para preparar varias realizaciones de la presente invención: BCG Tice y BCG Connaught. *M. bovis* BCG Tice de tipo salvaje se adquirió de Organon y *M. bovis* BCG Connaught de tipo salvaje fue obtenida de los Laboratorios Connaught, Toronto, Canadá. Las cepas fueron mantenidas en un medio 7H9 a pH 6,7 (Difco) a 37°C en una atmósfera 5% CO₂-95% aire en cultivo inmóvil. Los cultivos se sonificaron una o dos veces semanalmente durante 5 minutos en un baño de agua sonificada para reducir amontonamiento bacteriano.

La TICE BCG recombinante (rBCG30 Tice) que expresa la proteína de no fusión extracelular principal de *M. tuberculosis* se preparó de la siguiente manera. El plásmido pMTB30, un constructor recombinante de la micobacteria de *E. Coli* conectado al plásmido PSMT3 se preparó como fue previamente descrito por los inventores presentes en Harth, G., B.-Y. Lee y M.A. Horwitz. 1997. Expresión de heterólogos de alto nivel y secreción en micobacteria no patogénica rápidamente en crecimiento de cuatro proteínas extracelulares de *Mycobacterium tuberculosis* consideradas a ser candidato vacunal líder y objetivos del fármaco. Infect. Immun. 65: 2321-2328.

Brevemente, el plásmido pMTB30 fue creado para expresar la proteína de no fusión extracelular principal de *M. tuberculosis* 30 kDa de Erdman desde su propio promotor (o cualquier promotor de gen de proteína de no tensión y de no conmoción de calor) por inserción de un fragmento de restricción de ADN genómico grande que contiene el gen de proteína de no fusión 30 kDa más extensivo que las secuencias de ADN flanqueado dentro del sitio de multiclonación del plásmido con el uso de métodos conocidos por expertos en la tecnología de ADN recombinante. El plásmido fue introducido primero en DH5α de *E. Coli* para obtener grandes cantidades del plásmido recombinante. La cepa de *E. Coli* recombinante que es incapaz de expresar la proteína de no fusión, 30 kDa de *M. tuberculosis* creció en presencia de 250 µg/ml de higromicina y la secuencia de ADN insertado en el plásmido fue determinada en su totalidad. El plásmido fue introducido en *M. smegmatis* por electroporación usando 6,25 kv/cm, 25 µF, y 1000 mΩ como condiciones para producir un gran número de transformantes positivos. Los inventores presentes verifican la presencia del plásmido recombinante por el crecimiento en presencia de 50 µg/ml de higromicina y la expresión constitutiva y la exportación de proteína de no fusión 30 kDa recombinante por electroforesis de gel de poliácridamida e *immuoblotting* con inmunoglobulina de proteína de conejo de no fusión anti-30 kDa altamente específica usando métodos conocidos por los expertos en la tecnología de ADN recombinante. Adicionalmente, los inventores verificaron la expresión correcta y el procesamiento de proteína de no fusión 30 kDa de *M. tuberculosis* recombinante, que era indistinguible de su homólogo nativo por el ordenamiento secuenciado de aminoácido N-terminal.

El plásmido pSMT3 de recombinante pMTB30 fue posteriormente introducido en *M. bovis* BCG Tice usando 6,25Kv/cm, 25 µF, y 200 mΩ como condiciones de electroporación óptimas. Los transformantes se incubaron en

un medio 7H9 complementado con 2% glucosa por 4 h en 37°C de agitación ambiental y puesto posteriormente en agar 7H11 con 20 µg/ml de higromicina. La concentración de higromicina era gradualmente incrementada a 50 µg/ml cuando los transformantes fueron sub-cultivados a un nuevo medio de crecimiento. Los cultivos de BCG Tice recombinante se mantuvieron en las mismas condiciones que el tipo salvaje excepto que el medio 7H9 contenía 50 µg/ml de higromicina.

La expresión y la exportación de proteína de no fusión 30 kDa de *M. tuberculosis* fueron verificadas por gel de electroforesis de poliacrilamida e *immunoblotting* con inmunoglobulina de proteína de no fusión anti 30kDa de conejo. Típicamente, 1 de cada 10 transformantes expresó y exportó cantidades de proteína de no fusión 30 kDa recombinante significativamente mayores que los otros transformantes; 2 de estos transformantes fueron escogidos y una gran cantidad de estos transformantes se preparó y congeló en un medio 7H9 que contenía glicerina al 10%. Estos transformantes fueron usados para estudios de eficacia de vacuna en cobayas. La figura 1a muestra la expresión de proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* por BCG Tice recombinante sobre geles SDS-PAGE e *immunoblots*. La cepa recombinante expresó mucho más de la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* que ambas de tipo salvaje sobre geles de cepas azules de Coomassie e *immunoblots*.

Después una cepa Connaught BCG de *M. bovis* recombinante (rBCG30 Conn.) que expresa la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* fue preparada de forma semejante a la descrita arriba para el BCG Tice recombinante (rBCG30Tice) usando el plásmido pMTB30 mencionado anteriormente. Este fue mantenido en un medio que contiene higromicina a una concentración de 50 µg/ml bajo las mismas condiciones que las descritas para la cepa BCG Tice recombinante. La Fig 1b muestra la expresión de la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* por BCG Connaught recombinante sobre geles SDS-PAGE e *immunoblots*. La cepa recombinante expresó mucho más de la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* que ambas de tipo salvaje sobre geles de cepas de azul de Coomassie e *immunoblots*.

La estabilidad del plásmido de las cepas recombinantes de BCG fue tasada bioquímicamente. Este análisis bioquímico demostró que en presencia de higromicina, los caldos de cultivo de las cepas de BCG recombinante mantienen un nivel regular de expresión de proteína de no fusión durante un período de crecimiento 3 meses. En la ausencia de higromicina, los mismos cultivos muestran solamente un decrecimiento leve de la expresión de la proteína de no fusión (sobre la base de una célula), demostrando que el plásmido recombinante se mantiene estable y solamente muy gradualmente pierde en crecimiento bacteriana sin la presión selectiva (Fig. 1a y Fig. 1b, línea 3).

Se comprende que usando el método descrito arriba junto con los métodos conocidos por expertos en la tecnología de ADN recombinante, las cepas de BCG recombinante expresan proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis*. La cepa recombinante expresó mucho más de la proteína de no fusión extracelular principal 32(A) kDa de *M. tuberculosis*, la proteína de no fusión extracelular principal 16 kDa, proteína de no fusión extracelular principal 23.5 kDa y otras proteínas de no fusión extracelulares principales de *M. tuberculosis* pueden ser preparadas. Además metodologías similares pueden ser usadas para preparar cepas de BCG recombinante que expresen las proteínas de no fusión extracelulares principales de *M. leprae* que incluyen pero no se limitan a los homólogos de proteínas de no fusión extracelulares principal de *M. leprae*, las proteínas de no fusión extracelulares principales de 30 kDa de *M. tuberculosis*, *leprae* (a.k.a. antígeno 85B), homólogos de las proteínas de no fusión extracelulares principales 32 (A) de *M. leprae*, las proteínas de no fusión extracelulares principales 32 (A) de *M. tuberculosis*, (a.k.a. antígeno 85A), y otras proteínas de no fusión extracelulares principales de *M. lepra*. Adicionalmente metodologías similares también pueden ser usadas para preparar BCG de *M. bovis* recombinante que expresan homólogos de las proteínas de no fusión extracelulares principales 30 kDa de *M. bovis*, proteínas de no fusión extracelulares principales de 30 kDa de *M. tuberculosis* (a.k.a. antígeno 85B), homólogos de las proteínas de no fusión extracelulares principal 32(A) kDa de *M. bovis*, proteínas extracelulares principales 32(A) kDa de *M. tuberculosis*, (a.k.a. antígeno 85A), y otras proteínas extracelulares principales de *M. bovis*.

Siguiendo la producción de vacuna con éxito, las vacunas de la presente invención son probadas para su eficacia y seguridad con el uso de un modelo animal. Los estudios utilizaron a cobayas porque el modelo de cobaya es especialmente relevante a la tuberculosis humana clínicamente, inmunológicamente, y patológicamente. En contraste con el ratón y la rata, pero de la misma manera que el ser humano, la cobaya a) es susceptible a dosis bajas de aerosolizados de *M. tuberculosis*; b) presenta DTH cutánea fuerte a la tuberculina; y c) revela células gigantes Langhans y caseación en lesiones pulmonares. Sin embargo, mientras que solamente aproximadamente el 10% de seres humanos inmune competentes que están infectados con *M. tuberculosis* contraen la enfermedad activa durante su vida (en la mitad temprana después de la exposición y la mitad de después de un período de la latencia), las cobayas infectadas desarrollan la enfermedad activa temprana siempre. Mientras que las cobayas difieren de los humanos en este respecto, la regularidad con que desarrollan la enfermedad activa después de la infección con *M. tuberculosis* es una ventaja en los juicios de la eficacia de vacuna.

Los inóculos de inmunización hechos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención estaban preparados a partir de alícuotas del tipo de salvaje de crecimiento logarítmico o cultivos de BCG recombinante ("Bacteria"). Cada alícuota de bacterias fue precipitada por centrifugación en 3,500 x g durante 15 minutos y luego lavado con buffer salino fosfato 1x (1 x PBS, 50 mM de fosfato de sodio a pH 7, 150 mM de cloruro de sodio). Los inóculos de inmunización eran entonces resuspendidos a una concentración final de 1×10^4 unidades formadoras de colonia por mL en 1 x PBS y contenidas 1,000 bacterias viables por 100 µl.

Agentes patógenos específicos libres 250-300 de cepas *Harley* de machos de reproducción a cobayas de Charles River-Laboratories, en grupos de 9, se inmunizaron intradérmicamente con uno de los siguientes: 1) BCG Connaught [10^3 unidades Formadoras de Colonia (CFU) una vez solamente (Tiempo 0 semanas); 2) rBCG30 Connaught (10^3 CPU) una vez solamente (tiempo 0 semanas); 3) purificado de proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa recombinante de *M. tuberculosis* (r30), 100 μ g en 100 μ L de Formulaci3n Adyuvante Syntex (SAF), tres veces tres semanas separadamente (tiempo 0, 3, y 6 semanas); SAF que consta de Pluronic L121, squalane, y Tween 80, y en la primera inmunizaci3n, dipéptido de muramil de alanil; y 4) SAF solamente (100 μ l) (inmunizado falso), tres veces por tres semanas separadamente (tiempo 0, 3, y 6 semanas). Un grupo adicional de 3 animales fue inmunizado falso con SAF solamente (100 μ l) y usado como un control de prueba de piel. Éstos y otros de tres a seis animales inmunizados falsos sirvieron como control no infectado en los experimentos de desafío.

Nueve semanas después de la única inmunizaci3n (BCG y grupos de rBCG30) o la primera inmunizaci3n (grupo de r30 y grupo de prueba de piel de falsa inmunizaci3n), las cobayas fueron afeitadas sobre la parte posterior e inyectados intradérmicamente con 10 μ g de proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa recombinante de *M. tuberculosis* (r30) purificada en 100 μ L de buffer fosfato salino. Después de 24 horas, el diámetro de eritema e induraci3n fue medido. (Un grupo distinto de animales inmunizados falsos usados en los estudios de desafío fue usado para la prueba de piel. Animales inmunizados falsos usados en estudios de desafío no fueron evaluados para eliminar la posibilidad de que la prueba de piel misma podría influir en el resultado).

Nueve semanas después de la primera o única inmunizaci3n e inmediatamente después de las pruebas de piel, los animales fueron desafiados con un aerosol generado de una suspensi3n 10 ml de cácula simple que contiene 1×10^5 unidades formadoras de colonia(CFU) de *M. tuberculosis*. La cepa *Erdman* de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 35801) se pasó a través de outbreak de cobayas para mantener la virulencia, cultivada en agar 7H11, sujeta a sonicaci3n apacible para obtener una suspensi3n de célula simple, y congelada a -70°C para el uso en experimentos de desafío de animal. La dosis de aerosol liberó ~40 bacilos vivos a los pulmones de cada animal. La ruta aerotransportada de la infecci3n fue usada porque ésta era la ruta natural de la infecci3n para la tuberculosis pulmonar. Una dosis grande fue usada para producir la enfermedad clínica medible en el 100% de los animales de control en un marco de tiempo relativamente corto (10 semanas). Después, las cobayas fueron alojadas por separado en parrillas de acero inoxidable que contenían dentro un cercado de seguridad biohazard de flujo laminar y permitían el acceso libre para comida y agua. Los animales fueron observados para la enfermedad y pesados semanalmente durante 10 semanas y luego eutanizados. El pulm3n derecho y el bazo de cada animal fueron retirados y cultivados para CFU de *M. tuberculosis*.

En cada uno de los dos experimentos, los animales placebo inmunizados por o de BCG tipo salvaje presentaron poco o nada de eritema y la prueba sobre de la duraci3n al evaluar la proteína de no fusión principal extracelular 30 kDa recombinante de *M. tuberculosis* (r30). En contraste los animales inmunizados con (r30) o BCG rBCG30 presentaron marcadamente eritema e induraci3n que era significativamente más alto que en los animales placebos inmunizados ó los inmunizados con BCG tipo salvaje (tabla 1 y Fig. 2).

En cada uno de los dos experimentos los controles no infectados ganaron peso normalmente después del reto con los animales inmunizados con rBCG30 o los de BCG tipo salvaje (Fig. 3). Efectivamente no hubo diferencias significativas en el aumento de peso entre estos tres grupos. Por contraste, animales inmunizados falsos y en menor grado animales inmunizados con r30, expusieron disminuci3n en el aumento de peso a través del curso del experimento (Tabla 2 e Fig. 3). Por lo tanto, después del desafío con *M. tuberculosis*, tanto BCG como rBCG30 protegieron a los animales totalmente de la pérdida de peso, una seña física muy importante de la tuberculosis en seres humanos, y un distintivo de la tuberculosis en el modelo de cobaya de esta enfermedad contagiosa crónica.

En cada uno de los dos experimentos, al final del período de observaci3n de 10 semanas, las cobayas fueron eutanizadas y el pulm3n derecho y el bazo de cada animal fueron retirados asépticamente y ensayado para CFU de *M. tuberculosis*. Los animales inmunizados con placebo tenían la carga bacteriana más alta en los pulmones y el bazo (Tabla 3 y Fig. 4a y Fig. 4b). Los animales inmunizados con r30 tenían menos organismos en los pulmones y el bazo que los animales placebo inmunizado. Los animales inmunizados con BCG tenían menos organismos que los inmunizados con r30; y excepcionalmente, los animales inmunizados por rBCG30 tenían menos organismos que los animales inmunizados por BCG. Pruebas estadísticas que emplean el análisis factorial de dos métodos de varianza para comparar las medias demostraron que la media de los cuatro grupos de "tratamiento" (falso, r30, BCG, y rBCG30) en el experimento 1 no era significativamente diferente de las medias de los cuatro grupos de tratamiento en el experimento 2 y por lo tanto apropiado para combinar los datos en los dos experimentos. Los datos combinados se muestran en la Tabla 4 y la Fig. 3. De gran interés e importancia, los animales inmunizados con rBCG30 tenían 0,5 log organismos menos en pulmones y casi 1 log de organismos menos en el bazo que los animales inmunizados por BCG. Sobre el análisis estadístico, empleando métodos de análisis de varianza para comparar medias y el criterio de diferencia significativa (LSD) Tukey - Fisher) para ensayar significativas estadística. La media de cada uno de los cuatro grupos en los pulmones y bazos en ambos era significativamente diferente de la media de cada uno de los otros (Tabla 4). Las diferencias entre animales inmunizados con rBCG30 y BCG r en los pulmones fue significativa $p=0.02$ y en los bazos $p=0.001$. Poniendo en paralelo las diferencias en CFU en los pulmones, sobre la inspecci3n grosera, los pulmones de animales inmunizados por rBCG30 tenían menos destrucci3n de pulm3n que animales inmunizados por BCG ($20 \pm 4\%$ contra $35 \pm 5\%$ media $\pm$ SE).

Por lo tanto, la administración de BCG recombinante que expresa la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* indujo la protección de alto nivel contra el desafío de aerosol con *M. tuberculosis* en el modelo de tuberculosis pulmonar en cobayas altamente susceptible. En contraste a lo descrito en los ejemplos abajo, la administración de la misma proteína de no fusión extracelular micobacteriana (proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* en adyuvante en combinación con BCG no producen protección de alto nivel contra el desafío de aerosol *M. tuberculosis*; ni la administración de *M. smegmatis* recombinante que expresa la proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis*; ni la administración de proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* en microesferas que son del mismo tamaño aproximado como BCG y liberan las proteínas de la misma manera que BCG despacio durante 60-90 días; ni la administración del encapsulado de proteína de no fusión extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* en liposomas.

Un aspecto muy sorprendente de esta invención es que la cepa de rBCG30 produjo la protección superior a la wild type BCG expresa y segrega homólogos altamente endógenos de proteína extracelular principal (Vea Fig. 1). El gen que codifica la proteína 30 kDa de cepa BCG Connaught no ha sido secuenciado. Sin embargo, la secuencia de la proteína 30 kDa de dos otras cepas de BCG, deducido de la secuencia del gen clonado de otras dos cepas, es diferente de la proteína de *M. tuberculosis* por solamente un aminoácido (BCG Parías 173 P2) o por 5 aminoácidos incluyendo dos aminoácidos adicionales (BCG Tokio). (Vea páginas 3041-3042 of Harth, G., B.-Y. Lee, J. Wang, D.L. Clemens, y M.A. Horwitz. 1996. Las perspectivas nuevas respecto a la genética, bioquímica, e inmunocitoquímica de la proteína extracelular principal 30 kilodalton de *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 64: 3038-3047. Por lo tanto, la protección mejorada de la cepa recombinante es diferente debido a la pequeña diferencia de aminoácido entre la proteína endógena y la recombinante. Muy probablemente, es debido a la expresión mejorada del proteína de no fusión recombinante comparado con las proteínas endógenas. Si es así, entonces la expresión abundante obtenida usando un número de copia alto de plásmido era probablemente un factor importante en la eficacia de la vacuna recombinante.

TABLA 1

Hipersensibilidad tipo retrasada cutánea de la proteína extracelular principal 30 kDa de <i>M. tuberculosis</i>		
	Eritema (Diámetro medio $\pm$ SE)(mm)	Induración (Diámetro medio $\pm$ SE) (mm)
Experimento 1		
Falso inmunizado	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
r30	15,0 $\pm$ 1,2	4,2 $\pm$ 0,3
BCG	0,8 $\pm$ 0,8	1,7 $\pm$ 1,2
rBCG30	19,8 $\pm$ 2,2	3,1 $\pm$ 0,2
Experimento 2		
Falso inmunizado	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
r30	15,3 $\pm$ 0,9	5,2 $\pm$ 0,7
BCG	3,0 $\pm$ 1,5	1,0 $\pm$ 0,0
rBCG30	16,5 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,4

TABLA 2

Ganancia de Peso neto después de desafío con aerosol con Cepa Erdman de <i>M. tuberculosis</i> virulenta			
	Semana 0 (Peso medio $\pm$ SE) (g)	Semana 10 (Peso medio $\pm$ SE) (g)	Semana 0-10 Ganancia de peso medio (g) (media $\pm$ SE)
Experimento 1			
Falso inmunizado	763,1 $\pm$ 17,1	805,4 $\pm$ 27,8	42,3 $\pm$ 28,2
r30	793,8 $\pm$ 21,6	906,3 $\pm$ 44,6	112,6 $\pm$ 32,0
BCG	763,8 $\pm$ 28,7	956,3 $\pm$ 45,4	192,5 $\pm$ 23,7
rBCG30	767,8 $\pm$ 17,6	947,7 $\pm$ 31,3	179,9 $\pm$ 25,1
Experimento 2			
Falso inmunizado	839,1 $\pm$ 21,7	857,6 $\pm$ 32,4	18,5 $\pm$ 30,9
r30	801,9 $\pm$ 36,3	888,6 $\pm$ 39,7	86,7 $\pm$ 28,3
BCG	796,6 $\pm$ 29,8	963,6 $\pm$ 19,8	167,0 $\pm$ 23,3
rBCG30	785,7 $\pm$ 17,7	958,7 $\pm$ 27,7	173,0 $\pm$ 24,9

ES 2 315 281 T3

TABLA 3

Unidades Formadoras de colonia (CFU) de <i>M. tuberculosis</i> en Experimentos 1 y 2 combinados de Pulmón y Bazo de animales desafiados por aerosol con la Cepa Erdman			
	n	CFU Pulmón Log ₁₀ (Media±SE)	CFU Bazo Log ₁₀ (Media±SE)
Falso inmunizado	18	6,47 ± 0,17	6,27 ± 0,19
r30	18	6,02 ± 0,14	5,73 ± 0,14
BCG	17	5,00 ± 0,13	4,57 ± 0,17
rBCG30	18	4,53 ± 0,14	3,65 ± 0,25

TABLA 4

Resumen del Análisis Estadístico (ANOVA) CFU en los experimentos 1 y 2 combinados de Pulmón y Bazo	
Pulmón	
Falso vs r30	p=0.03
r30 vs BCG	p=0.0001
BCG vs rBCG30	p=0.02
Bazo	
Falso vs r30	p=0.05
r30 vs BCG	p=0.0001
BCG vs rBCG30	p=0.001

TABLA 5

Unidades Formadoras de colonia (CFU) de <i>M. tuberculosis</i> en pulmón y Bazo de animales desafiados por aerosol con la Cepa Erdman de <i>M.tuberculosis</i> : Animales inmunizados con BCG o con BCG más proteína 30 kDa <i>M.tuberculosis</i> recombinante en adyuvante o falso inmunizado			
	n	CFU Pulmón Log ₁₀ (Media±SE)	CFU Bazo Log ₁₀ (Media±SE)
Falso inmunizado	17	6,40 ± 0,18	5,65 ± 0,20
BCG	8	4,70 ± 0,13	2,91 ± 0,35
BCG+ r30	9	5,30 ± 0,23	3,34 ± 0,37

TABLA 6

Unidades Formadoras de colonia (CFU) de <i>M. tuberculosis</i> en pulmón y Bazo de animales desafiados por aerosol con la Cepa Erdman de <i>M.tuberculosis</i> : Animales inmunizados con <i>M.smegmatis</i> recombinante viva que expresa la proteína extracelular principal 30 kDa de <i>M.tuberculosis</i> recombinante (<i>rM smegmatis</i> 30)			
	n	CFU Pulmón Log ₁₀ (Media±SE)	CFU Bazo Log ₁₀ (Media±SE)
Falso inmunizado	9	6,63 ± 0,27	6,34 ± 0,29
BCG	8	4,61 ± 0,14	4,31 ± 0,27
M smegmatis control	9	5,92 ± 0,31	5,29 ± 0,34
rM. smegmatis 30	9	5,48 ± 0,26	5,55 ± 0,28

TABLA 7

Unidades Formadoras de colonia (CFU) de <i>M. tuberculosis</i> en pulmón y Bazo de animales desafiados por aerosol con la Cepa Erdman de <i>M. tuberculosis</i> : Animales inmunizados con microsferas que son del mismo tamaño aproximado como BCG y BCG de liberación lenta de la proteína extracelular principal 30 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (r30) animales inmunizados con liposomas que contiene la proteína extracelular principal 30 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (r30)			
	n	CFU Pulmón Log ₁₀ (Media±SE)	CFU Bazo Log ₁₀ (Media±SE)
Falso inmunizado	9	6,63 ± 0,27	6,34 ± 0,29
BCG	8	4,61 ± 0,14	4,31 ± 0,27
rBCG30	9	5,92 ± 0,31	5,29 ± 0,34
Control Microsferas	9	5,48 ± 0,26	5,55 ± 0,28
Microsferas con r30 (10 mg x1)	6	6,10 ± 0,32	5,93 ± 0,41
Microsferas con r30 (3,3 mg x3)	9	6,42 ± 0,17	6,04 ± 0,28
Control Liposomas	9	6,24 ± 0,23	6,41 ± 0,21
Liposomas con r30	9	5,77 ± 0,18	5,63 ± 0,16

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar el aspecto nuevo de la presente invención. Cada ejemplo ilustra unos medios de repartir los inmunógenos de la presente invención usando técnicas relacionadas, pero diferente de la vacuna de la presente invención. Específicamente, el ejemplo 1 demuestra que cuando los inmunógenos de la presente invención están administrados con, pero no expresados *in vivo* por BCG, la inmunidad protectora de alto nivel no es conseguida.

El ejemplo 2 demuestra que la expresión *in vivo* de los inmunógenos del invención usando *Mycobacterium sp.* se relaciona para BCG, pero no es capaz de replicarse en hospederos mamíferos, deja de producir niveles importantes de protección contra el desafío con *M. tuberculosis*. Los ejemplos que 3 y 4 demuestran que la liberación lenta de los inmunógenos de la presente invención por microportadores de vacunas sintéticos también deja de producir niveles importantes de protección contra el desafío con la *M. tuberculosis*.

Por lo tanto, los ejemplos siguientes sirven para resaltar el extraordinario y sorprendente avance que las vacunas de agente patógeno intracelulares de la presente invención representan al campo de la inmunología en enfermedades infecciosas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunización de cobayas con BCG más proteína principal 30 kDa extracelular recombinante (r30) que no produce protección de alto nivel contra el desafío con M. tuberculosis

Nosotros inmunizamos a cobayas previamente con BCG más r30 en un adyuvante fuerte (SAF, Syntex Adyuvante Formulation). La proteína r30 (100 µg por la inmunización) fue administrado intradérmicamente tres veces. Esta produjo una respuesta de hipersensibilidad cutánea (C-DTH) de tipo retrasado a r30 (Fig. 5). Efectivamente, la respuesta C-DTH era comparable a la producida por BCG recombinante que expresa r30. Sin embargo, la inmunización con ambos BCG y r30 no produjo a gran nivel protección contra el desafío de *M. tuberculosis* (Tabla 5). Animales inmunizados tanto con BCG como r30 no tuvieron niveles más bajos de CFU en los pulmones y el bazo que animales inmunizados solos. Este resultado está en contraste directo con el resultado descrito arriba en el que animales inmunizados con BCG recombinante que expresa r30 expusieron niveles de protección altos cuando se desafiaron con *M. tuberculosis*.

Ejemplo 2

Inmunización de cobayas con M. smegmatis recombinante vivo que expresa la proteína extracelular principal 30 kDa (r30) en una forma indistinguible desde la forma nativa que no produce la protección de alto nivel contra el desafío con M. Tuberculosis

En uno de los mismos experimentos en los que inmunizamos a animales con BCG, con los que inmunizamos a cobayas con *M. smegmatis* recombinante vivo que expresa la proteína extracelular principal 30 kDa (r30) en forma indistinguible desde la forma nativa. La expresión y la secreción de la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* fue igual o superior a la de la cepa de BCG recombinante que expresa y segrega la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis*. Además, la dosis de *M. smegmatis* recombinante, 10⁹ bacteria, fue muy alta, un millón veces la dosis de BCG recombinante (10³ bacterias), para compensar la pobre multiplicación de *M. smegmatis* en el animal hospedero. Para compensar incluso más lejos, *M. smegmatis* recombinante fue administrada tres veces

intradérmicamente, mientras que la BCG recombinante fue administrado solamente una vez intradérmicamente. La inmunización con *M. smegmatis* recombinante que expresa la proteína r30 produjo una hipersensibilidad cutánea de tipo retrasado fuerte (C-DTH) a la respuesta para r30. Efectivamente, la respuesta C-DTH era comparable o más grande que la que se produjo por la BCG que expresa r30. Sin embargo, el *M. smegmatis* recombinante vivo que expresa proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no produjo la protección de alto nivel contra el desafío *M. tuberculosis* (Tabla 6). Animales inmunizados con la *M. smegmatis* recombinante vivo que expresa la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no tuvieron niveles más bajos de CFU en pulmones y bazo que los animales inmunizados con BCG solo. Este resultado está en contrate directo con los resultados descritos arriba en los que animales inmunizados con BCG recombinante que expresa r30 mostraron niveles altos de protección cuando se desafiaron con *M. tuberculosis*.

Ejemplo 3

Inmunización de cobayas con microsféricas que son del mismo tamaño aproximado como BCG y BCG de liberación lenta de la proteína extracelular principal 30 kDa de M. tuberculosis (r30) de 60-90 días que no producen altos niveles de protección contra el desafío de M. tuberculosis

En uno de los mismos experimentos en el cual inmunizamos a animales con rBCG30 y BCG, inmunizamos cobayas con microsféricas que son del mismo tamaño aproximado como BCG y BCG de liberación lenta de la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* (r30) de 60-90 días. Un grupo de animales fue inmunizado una vez con microsféricas que contiene 10 mg de r30. Otro grupo de animales fue inmunizado con microsféricas que contenían 3.3 mg de r30. Esta cantidad fue calculada para exceder grandemente la cantidad de proteína de r30 expresada por la cepa de BCG recombinante. La inmunización con cualquier régimen de microesfera produjo una respuesta de hipersensibilidad cutánea de tipo retrasado fuerte (C-DTH) para r30. Efectivamente, la respuesta de C-DTH era comparable a la producida por BCG recombinante que expresa r30. Sin embargo, la inmunización con los microsféricas que son del mismo tamaño aproximado como BCG y BCG de liberación lenta de la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no produjo la protección de alto nivel contra el desafío de *M. tuberculosis* (Tabla 7). Los animales inmunizados con los microesfera no tenían niveles más bajos de CFU en los pulmones y bazo que los animales inmunizados con BCG a solas. Este resultado está en contraste directo con el resultado descrito de arriba en el que animales inmunizados con BCG recombinante que expresa r30 mostraron protección de alto nivel cuando se desafiaron con *M. tuberculosis*.

Ejemplo 4

La inmunización de cobayas con liposomas que contienen la proteína extracelular principal 30 kDa de M. tuberculosis no produce la protección de alto nivel contra el desafío con M. tuberculosis

En el mismo experimento como en el ejemplo 3, inmunizamos a cobayas con liposomas que contienen la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis*. Los animales fueron inmunizados tres veces con liposomas que contienen 50 µg de r30. Esto produjo una respuesta de hipersensibilidad cutánea de tipo retrasado moderadamente fuerte (C-DTH) para r30. La respuesta C-DTH era más grande que la producida por BCG y liposomas de control pero menos que la producida por BCG recombinante que expresa r30. Sin embargo, la inmunización con liposomas que contiene la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no produjo la protección de alto nivel contra el desafío con *M. tuberculosis* (Tabla 7). Animales inmunizados con liposomas que contiene la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no tuvieron niveles más bajo de CFU en pulmones y bazo que animales inmunizados con BCG a solas. Este resultado está en contraste directo al resultado descrito de arriba en que los animales inmunizados con BCG recombinante que expresa r30 mostraban protección de alto nivel cuando se desafiaban con *M. tuberculosis*.

Las vacunas de la presente invención representan un enfoque completamente nuevo para el tratamiento terapéutico y profiláctico de agentes patógenos intracelulares. A través de una serie de experimentos bien diseñados y el análisis atento, los inventores presentes han demostrado totalmente que la inmunidad protectora es solamente conseguida cuando un agente patógeno seleccionado ó especies relacionadas cercanas, se transforma para expresar proteínas extracelulares recombinantes del mismo o diferente agente patógeno intracelular de conformidad con las enseñanzas de la presente invención.

La presente invención también puede ser usada para proveer beneficios profilácticos y terapéuticos contra agentes patógenos intracelulares múltiples simultáneamente. Por ejemplo de la misma manera que un agente vacunal intracelular atenuado recombinante como *M. bovis* puede ser diseñado para expresar inmunógenos inmunoprotectores contra *M. tuberculosis* y *Legionella sp.* simultáneamente. Por consiguiente, la gran eficiencia en la liberación de vacunas podía estar consumada. Los ejemplos no limitantes de BCG recombinante que expresa la proteína extracelular principal 30 kDa de *M. tuberculosis* no solamente sirve permitiendo completamente la realización de la presente invención, sino representa un avance importante a la medicina, y a la humanidad como un todo.

Por lo tanto, es evidente que aunque una realización preferida de la invención ha sido mostrada y descrita, varias modificaciones y cambios pueden ser hechos sin salirse del alcance de la invención.

Referencias citadas en la descripción

5 *Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 5108745 A
- WO 8806626 A
- 15 • US 5504005 A
- US 5830475 A
- US 08156358 B
- 20 • US 6752993 B
- US 09157689 B
- US 6599510 B
- 25

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- 30 • **COLDITZ**, G.A.; **T.F. BREWER**; **C.S. BERKEY**; **M.E. WILSON**; **E. BURDICK**; **H.V. FINEBERG**; **F. MOSTELLER**. *JAMA*, 1994, vol. 271, 698-702.
- Protective Immunity Elicited by rBCG Vaccines. **STOVER**, C.K.; **G.P. BANSAL**; **S. LANGERMAN**; **M.S. HANSON**. Recombinant Vectors in Vaccine Development. *Dev Biol Stand.* vol. 82, 163-170.
- 35 • **HARTH**, G.; **B.-Y. LEE**; **M.A. HORWITZ**. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, 2321-2328.
- 40 • **HARTH**, G.; **B.-Y. LEE**; **J. WANG**; **D.L. CLEMENS**; **M.A. HORWITZ**. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, 3041-3042 30383047.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que consta de:

una bacteria recombinante *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) que tiene una secuencia de ácido nucleico extracromosomal que porta el gen que codifica para la proteína extracelular principal 30 kDa de *Micobacteria tuberculosis*, en donde dicha proteína principal extracelular de 30 kDa de *M. tuberculosis* es expresada y donde dicha secuencia de ácido nucleico extracromosomal está bajo el control de promotores de gen de no choque térmico o promotores de gen de proteínas de no tensión.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que dicha proteína principal extracelular es una proteína de no fusión.

3. Una composición inmunogénica como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 2 para su uso como medicamento, en la que el medicamento es una vacuna.

4. El uso de una composición inmunogénica como la descrita en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 2 para la fabricación de un medicamento para la inducción de una respuesta inmune en un animal.

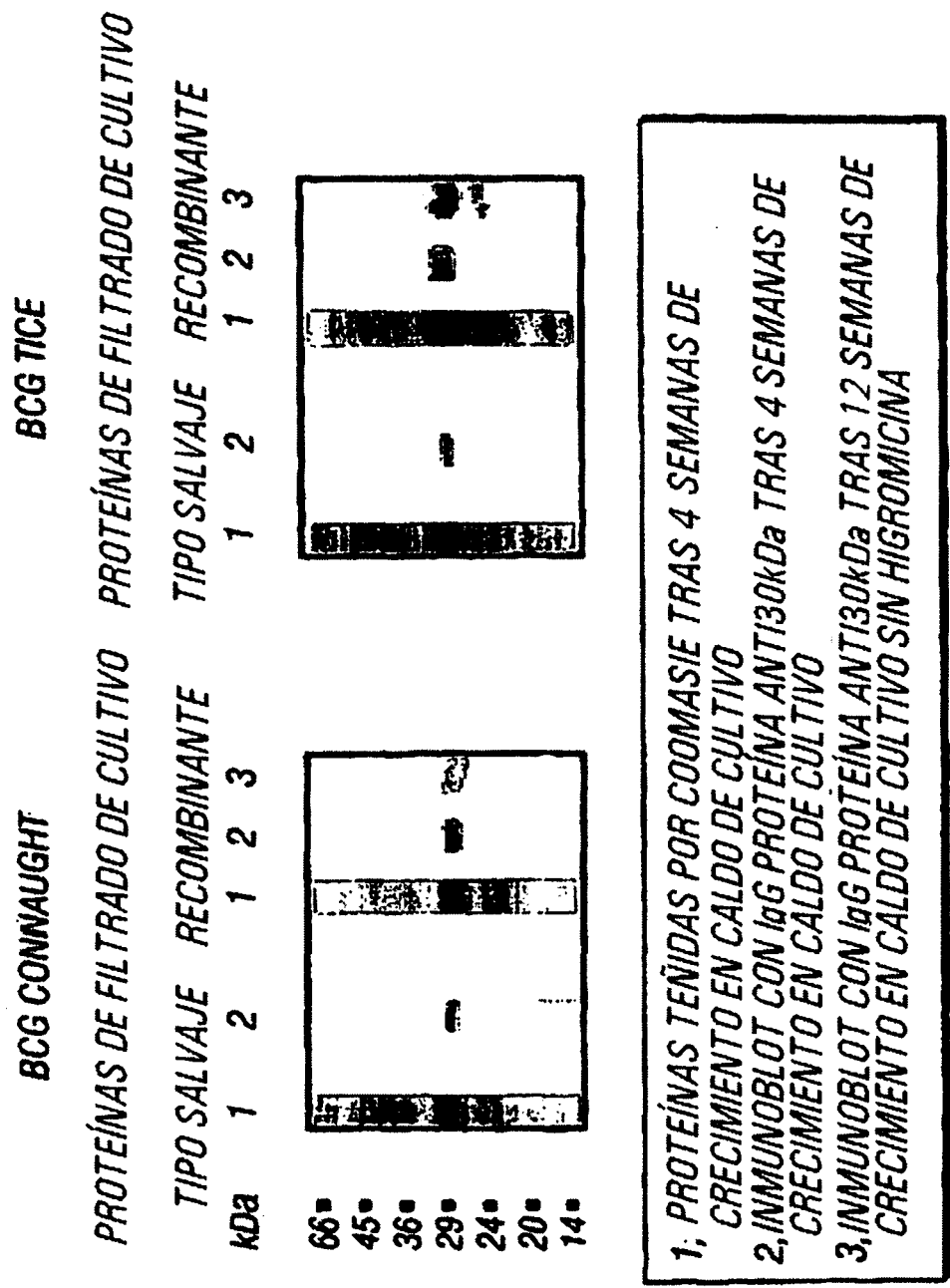
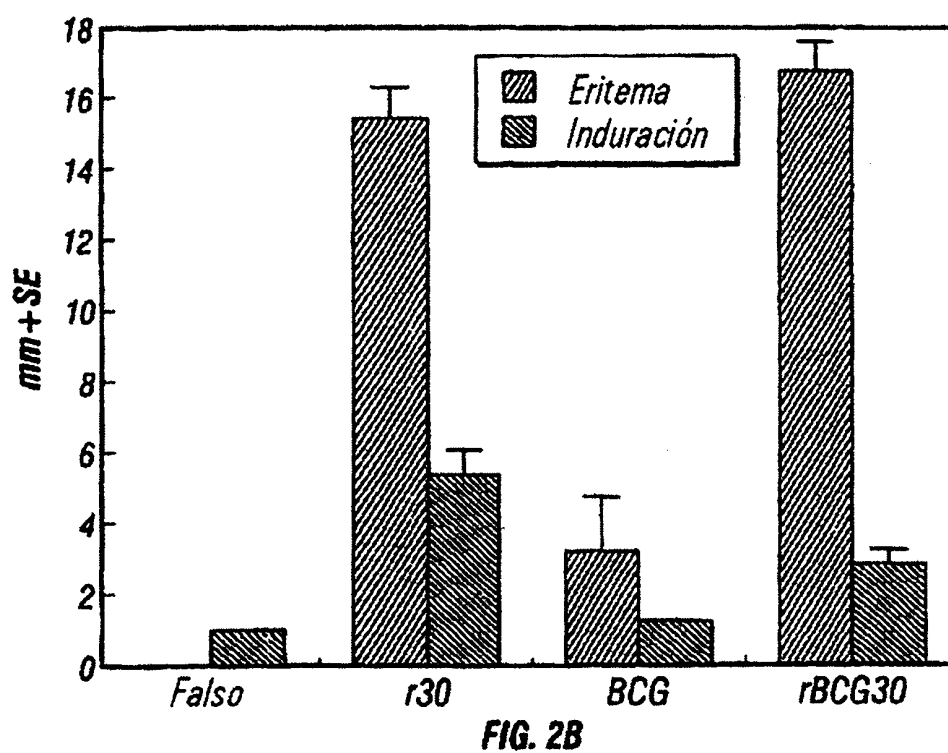
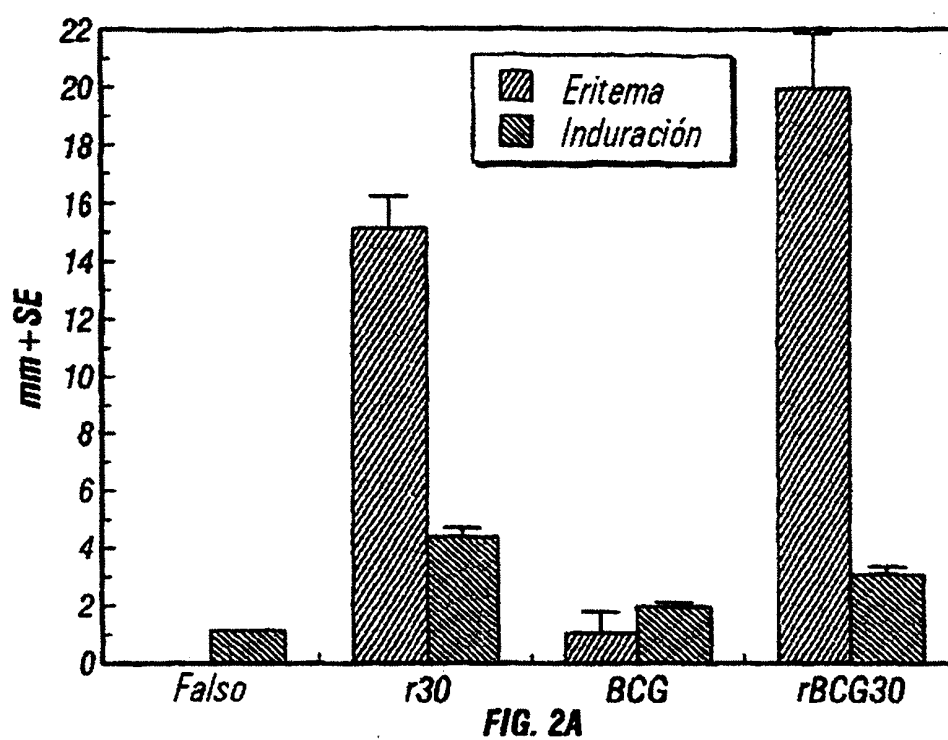
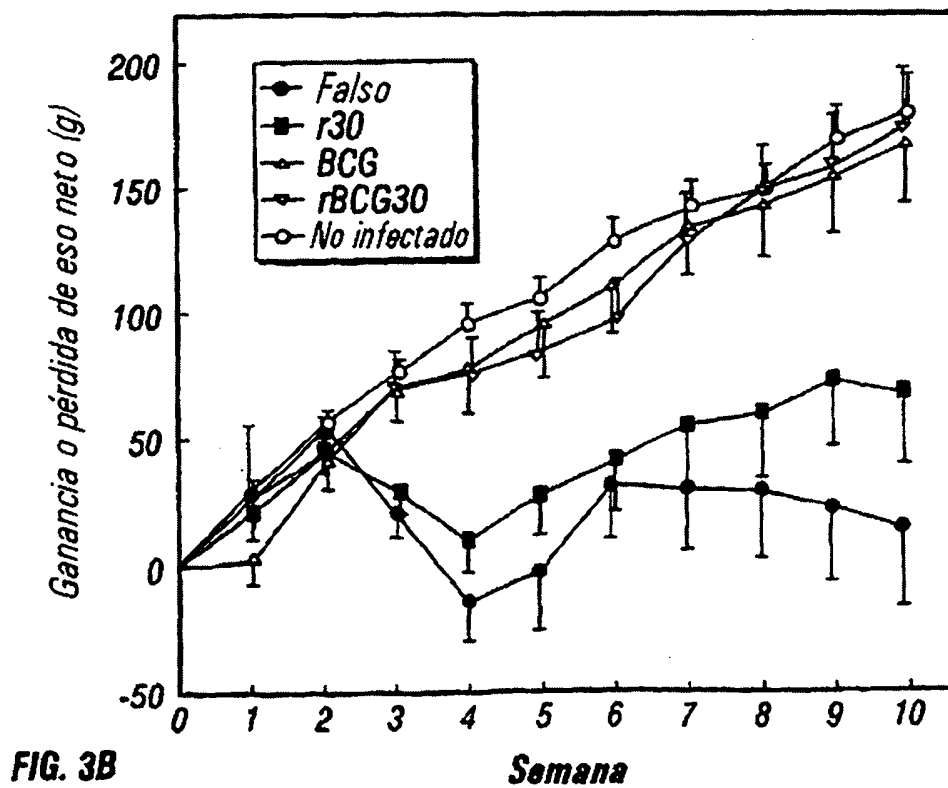
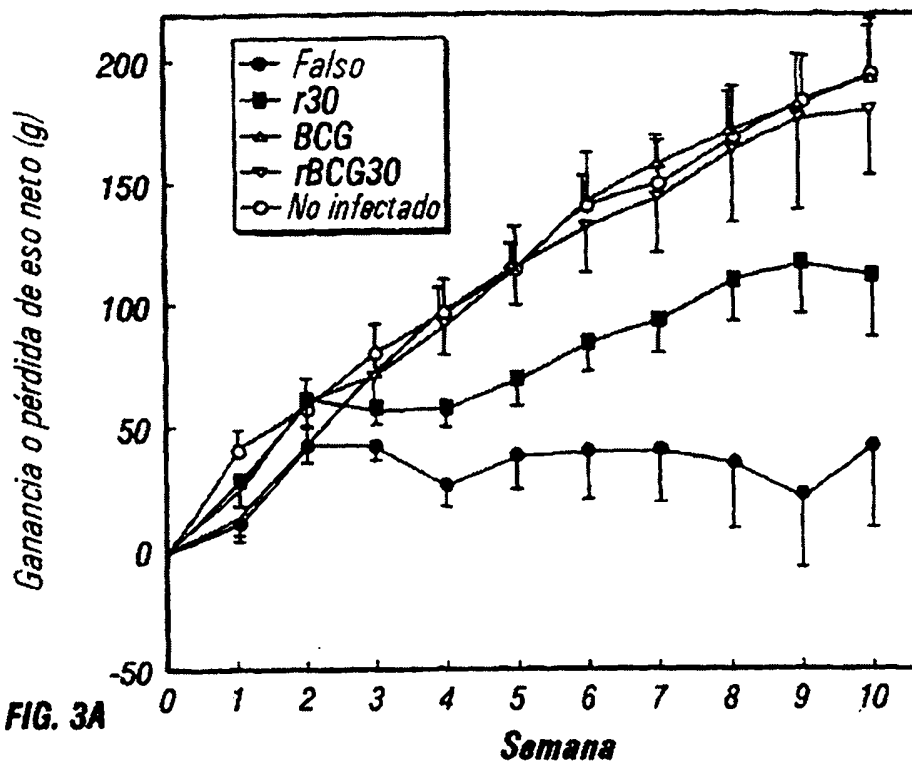


FIG. 1





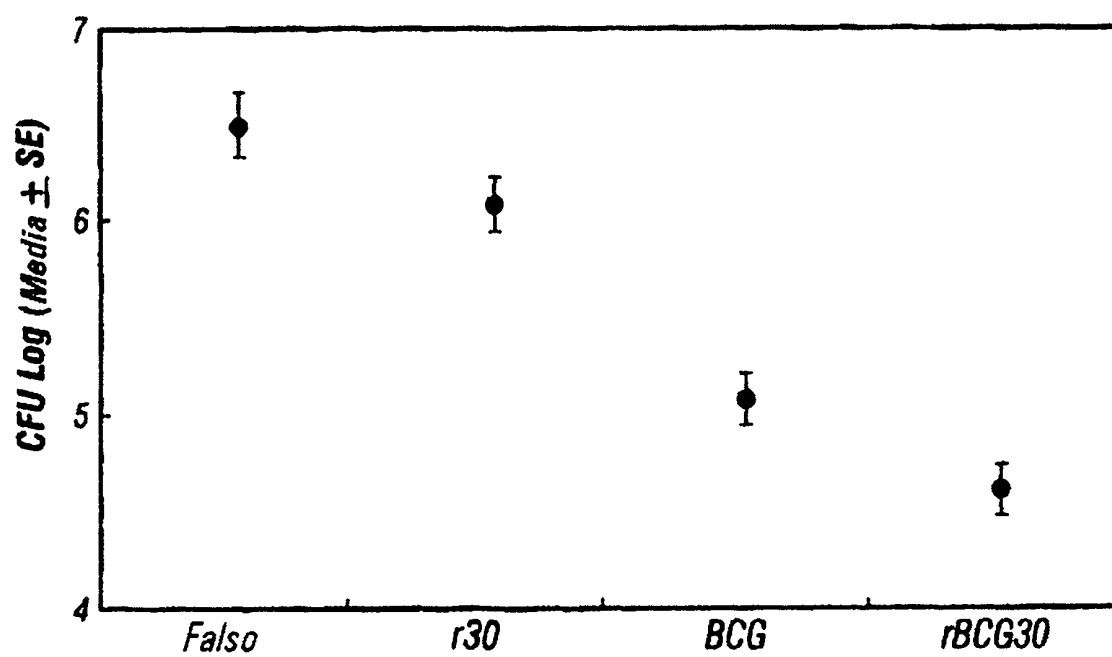


FIG. 4A

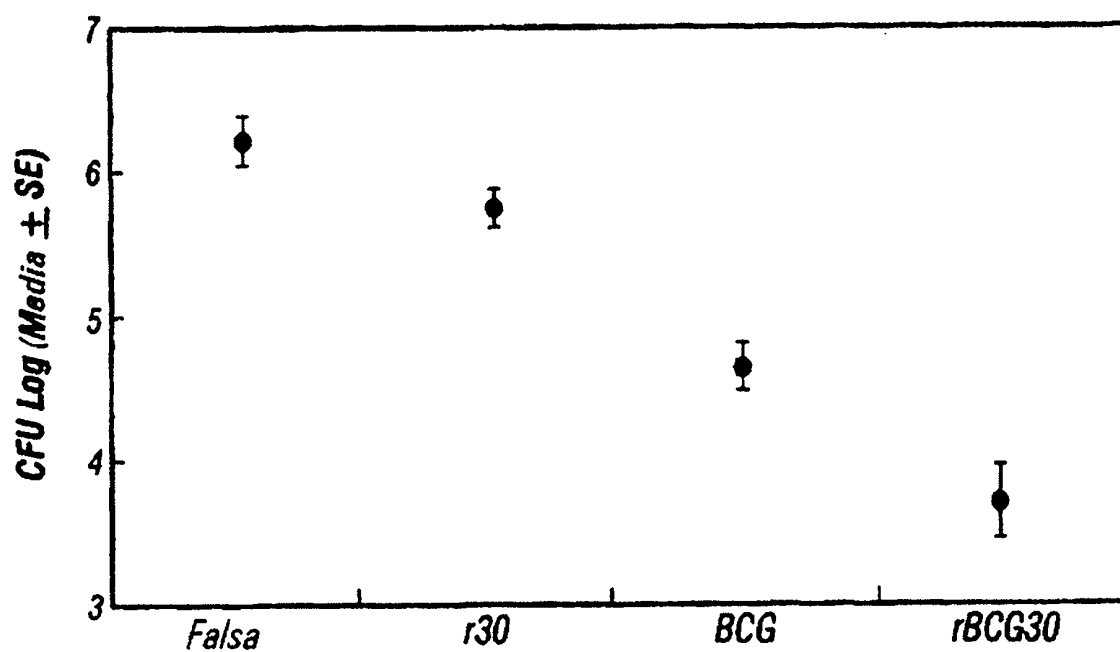


FIG. 4B

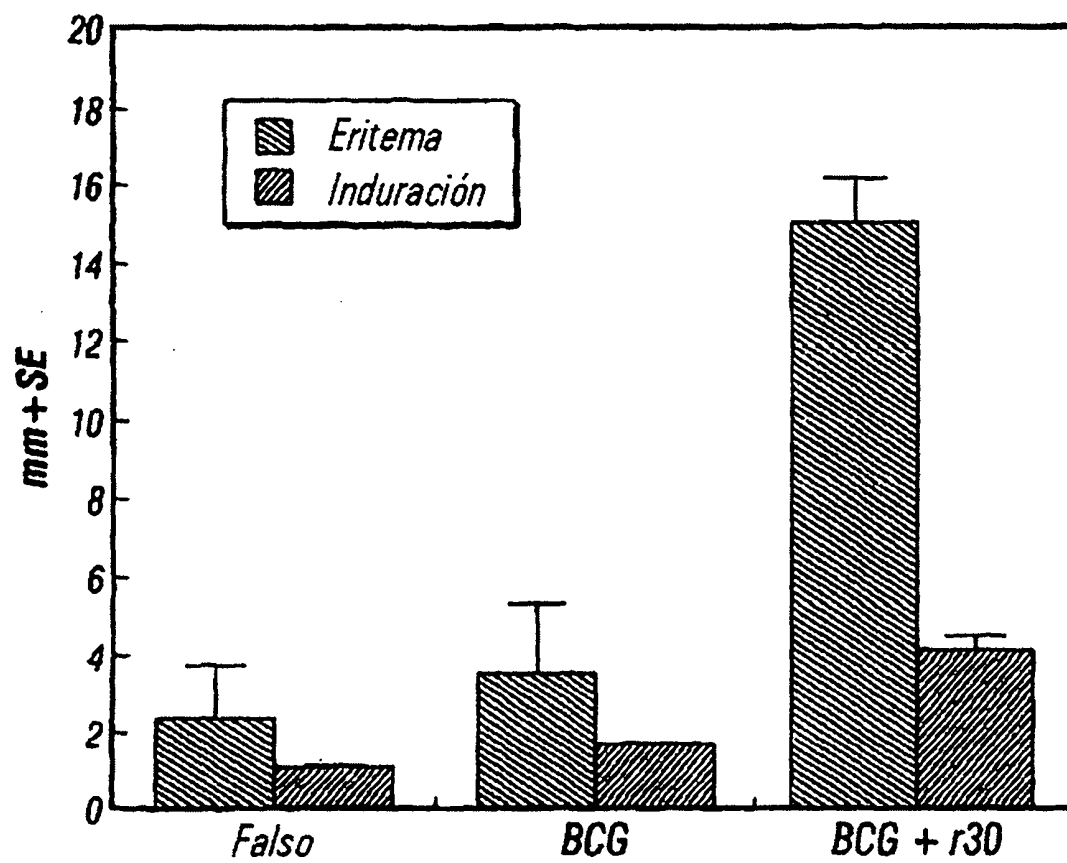


FIG. 5