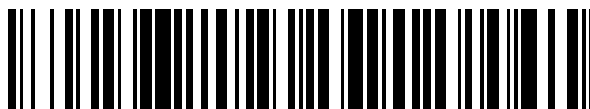


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 421**

51 Int. Cl.:

C12N 1/36 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2012** **PCT/IB2012/001609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014** **WO14023992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2012** **E 12761807 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2882845**

54 Título: **Vacuna contra la peste**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2018

73 Titular/es:
INSTITUT PASTEUR (100.0%)
25-28 Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR

72 Inventor/es:
CARNIEL, ELISABETH;
DEMEURE, CHRISTIAN y
DERBISE, ANNE

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 655 421 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la peste

5 Campo de la invención

La solicitud se refiere a un medio, que es notablemente útil para la vacunación contra la peste bubónica y contra la peste pulmonar, así como a las aplicaciones biotecnológicas y médicas del mismo. El medio de la solicitud comprende de forma notable células o cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, que expresan al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*. Más particularmente, el medio de la solicitud comprende células o cepas de *Yersinia pseudotuberculosis*, que expresan la proteína F1 o cápsula de *Y. Pestis*.

Antecedentes de la invención

15 *Yersinia pestis*, el agente causante de la peste, está entre los agentes infecciosos más mortíferos que afectan a los seres humanos. Transmitida por pulgas infectadas, *Y. pestis* causa principalmente la peste bubónica. La enfermedad evoluciona ocasionalmente a peste pulmonar, la forma más mortífera y contagiosa de la infección, que entonces se transmite de un ser humano a otro por aerosoles. Desde el inicio de la década de los 90, la peste se ha incluido en la lista de enfermedades reemergentes e *Y. pestis* se clasifica como un arma biológica potencial para uso terrorista. Como se han observado cepas resistentes a antibióticos de *Y. pestis* o podrían modificarse por ingeniería para un mal uso, la vacunación contra la peste podría llegar a ser el único medio para combatir la enfermedad. La mayoría de los esfuerzos hechos en los últimos años se centraron en formulaciones de subunidades que combinan el antígeno F1 capsular y el antígeno V (LcrV). Dichas vacunas, sin embargo, requieren el uso de un adyuvante e inyecciones repetidas para conferir una protección principalmente dependiente de anticuerpos.

Otras estrategias incluyen la atenuación de *Y. pestis* viva por ingeniería genética, la introducción de antígenos de *Y. pestis* en *Salmonella* o vectores víricos, y vacunación de ADN. Sin embargo, dichas vacunas no son suficientemente seguras y/o eficaces contra la peste bubónica y también la peste pulmonar.

Derbise *et al.* 2012 [referencia bibliográfica (1)], que se ha publicado el 14 de febrero de 2012, describe la construcción de una vacuna viva contra la peste. De forma más precisa describe la clonación del operón de *caf* de *Yersinia pestis*, que codifica la expresión superficial del antígeno F1 oligomérico de *Y. pestis* y la inserción de dicho operón en un plásmido para la electroporación en una cepa atenuada de *Yersinia pseudotuberculosis*. En la cepa de *Y. pseudotuberculosis* resultante (cepa V674pF1), el ácido nucleico que codifica la expresión superficial de la unidad monomérica de F1 de *Y. pestis* (es decir, al menos el polipéptido Caf1) está contenido en dicho plásmido.

En las células o cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* de la solicitud, el ácido nucleico que codifica la expresión superficial del polipéptido Caf1 está contenido en el cromosoma de dichas células o cepas de *Y. pseudotuberculosis*. La solicitud demuestra una eficacia de vacunación excepcionalmente alta contra la peste bubónica y también la peste pulmonar. La solicitud proporciona además datos experimentales comparativos, que demuestran de forma notable que las células o cepas de la solicitud son más eficaces que la cepa V674pF1 descrita en Derbise *et al.* 2012.

45 Sumario de la invención

La presente solicitud se refiere a la materia definida en las reivindicaciones como se presenta y como se describe en este documento. Más particularmente, la solicitud se refiere a una o más células, una o más cepas, una o más composiciones, una o más composiciones farmacéuticas, una o más composiciones inmunogénicas, una o más vacunas, así como a las aplicaciones biotecnológicas y médicas de las mismas, más particularmente a las aplicaciones *in vitro* e *in vivo* de las mismas, más particularmente a las aplicaciones inmunogénicas y/o de vacuna de las mismas.

Una célula de la solicitud es una célula de *Yersinia pseudotuberculosis*, más particularmente una célula recombinante de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Cuando se usa con fines terapéuticos, la célula de *Yersinia pseudotuberculosis* de la solicitud es avirulenta, más particularmente atenuada, aún más particularmente genéticamente atenuada.

La célula de *Yersinia pseudotuberculosis* de la solicitud comprende un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Yersinia pestis*. Más particularmente, dicho ácido nucleico codifica la proteína F1 de *Yersinia pestis*, aún más particularmente la cápsula de *Y. pestis*.

Dicho ácido nucleico codificante está comprendido en, más particularmente integrado en, el cromosoma de la célula de *Yersinia pseudotuberculosis* de la solicitud.

Una célula de la solicitud es notablemente útil como inmunógeno contra la peste, más particularmente contra la peste bubónica y también la peste pulmonar.

La inserción cromosómica de dicho ácido nucleico codificante da lugar a niveles inesperadamente más altos de protección contra la peste bubónica y también la peste pulmonar, más particularmente contra la peste bubónica.

Una célula de *Y. pseudotuberculosis* genéticamente atenuada de la solicitud tiene de forma notable las siguientes ventajas:

- estabilidad genética: el genoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* es mucho más estable que el de *Y. pestis*;
- inocuidad: dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede estar altamente atenuada, por ejemplo, por eliminación (parcial o completa) de uno o más genes esenciales para el mecanismo o mecanismos de virulencia, más particularmente de tres genes esenciales para distintos mecanismos de virulencia;
- diversidad molecular: cuando se usa como una vacuna de células completas vivas, ofrece una alta complejidad antigénica, que garantiza una respuesta contra una amplia gama de dianas antigénicas; los antígenos están en su forma nativa, procesados adecuadamente y producidos *de novo* siempre que la bacteria persista;
- fácil fabricación: una vez desarrolladas y validadas, las vacunas vivas no requieren equipos y técnicas sofisticados para producirse;
- inmunogenicidad: no se requieren adyuvantes, ya que los antígenos bacterianos (LPS y otras características asociadas con el patógeno) activan el sistema inmunitario innato; además de antígenos comunes a *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede producir de forma estable la cápsula F1 de *Y. pestis*, que es una diana de vacuna principal contra *Y. pestis*;
- administración de una dosis: esta es una ventaja principal ya que facilita enormemente las campañas de vacunación y permite una rápida protección;
- vacunación posible por dos vías: dependiendo del contexto, puede preferirse una vía subcutánea u oral de vacunación.

Los autores de la presente invención consideran que el nivel de protección contra la peste bubónica y la peste pulmonar que se consigue mediante la solicitud es una de las más eficaces, y probablemente la más eficaz jamás presentada.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Mapa genético del plásmido recombinante pUC18R6KTn7-*caf*-Cm^R, que porta el operón *caf* [*caf1M*, *caf1A* y *caf1* (bajo el control de *caf1R* como secuencia reguladora)] insertado en el minitransposón Tn7.
- Figura 2: Mapa genético del minitransposón Tn7-*caf*-Cm^R integrado en el cromosoma de una cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*.
- Figura 3: Detección de la producción de F1 de *Y. pestis* por una cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*, en que el operón *caf* se ha insertado en el genoma (cepa V674TnF1). V674 es la cepa precursora que no posee un operón *caf*. CO92 es la cepa de *Y. pestis* usada para la clonación del operón *caf*.
- Figura 4: Detección de cápsulas F1 alrededor de células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, que comprenden el operón *caf* de *Y. pestis* en un plásmido (cepa de *Y. pseudotuberculosis* V674pF1; panel de la izquierda) o insertado en el cromosoma (*Y. pseudotuberculosis* V674TnF1; panel de la derecha). En V674pF1, numerosas bacterias no están rodeadas por una cápsula (algunos ejemplos se muestran con una flecha), mientras que todas las células V674TnF1 están encapsuladas.
- Figuras 5A, 5B y 5C: Células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, que portan el operón *caf* de *Y. pestis*, persisten en la flora intestinal (figura 5A), las placas de Peyer (figura 5B) y el bazo (figura 5C) de ratones vacunados por vía oral con 10⁸ o 10⁹ UFC.
- Cuadrados = células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, donde el operón *caf* de *Y. pestis* está portado en un plásmido (cepa de *Y. pseudotuberculosis* V674pF1).
- Triángulos = células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, donde el operón *caf* de *Y. pestis* está insertado en el cromosoma (cepa de *Y. pseudotuberculosis* V674TnF1).
- Figuras 6A y 6B: Protección conferida por una única vacunación oral con células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, que portan el operón *caf* de *Y. pestis* en un plásmido (cepa V674pF1) o insertado en el cromosoma (cepa V674TnF1), contra la peste pulmonar después de una exposición moderada (figura 6A) o intensa (figura 6B) intranasal con *Y. pestis* (peste pulmonar).
- Figura 7A y 7B: Protección conferida por una única vacunación oral con células atenuadas de *Y. Pseudotuberculosis*, que portan el operón *caf* de *Y. pestis* en un plásmido (cepa V674pF1) o insertada en el cromosoma (cepa V674TnF1), contra la peste bubónica después de una exposición moderada (A) o intensa (B) subcutánea con *Y. pestis* (peste bubónica).
- Figura 8: Protección conferida por una única inoculación subcutánea de 10⁷ o 10⁸ UFC de células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, donde el operón *caf* de *Y. pestis* se ha insertado en el cromosoma (cepa V674TnF1), contra la peste bubónica (infección subcutánea) con una exposición intensa de *Y. pestis* (cepa CO92).

Figura 9: Protección conferida por una única inoculación subcutánea de diversas dosis de células atenuadas de *Y. pseudotuberculosis*, donde el operón *caf* de *Y. pestis* se ha insertado en el cromosoma (cepa V674TnF1), contra la peste pulmonar (infección intranasal) con una exposición intensa de *Y. pestis* (cepa CO92).

5 Descripción detallada de la invención

La solicitud se refiere a una célula de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Dicha célula de *Yersinia pseudotuberculosis* es una célula recombinante.

10 Dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede ser de cualquier serotipo, por ejemplo, de serotipo I, II, III, IV o V, por ejemplo, de serotipo I. Dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede ser una célula de cualquier cepa de *Y. pseudotuberculosis*.

15 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula o cepa de *Y. pseudotuberculosis* es de serotipo I.

Las cepas de *Y. pseudotuberculosis* están disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, de colecciones de microorganismos (por ejemplo, CRBIP, DSMZ, ATCC, NCTC), de fuentes comerciales o por aislamiento de material biológico contaminado (por ejemplo, de agua o suelo contaminado) o de un organismo contaminado (por ejemplo, un ser humano infectado o un animal no humano infectado).

20 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula o cepa de *Y. pseudotuberculosis* es *Y. pseudotuberculosis* IP32953 que proviene de la colección del *Yersinia* Research Unit and National Reference Laboratory [la secuencia genómica de la cepa IP32953 está disponible con el n.º de acceso NC_006155, más particularmente NC_006155.1].

Y. pseudotuberculosis es un patógeno entérico. La infección por *Y. pseudotuberculosis* (o pseudotuberculosis) da lugar a enfermedad digestiva aguda, a veces seguida por septicemia y, a veces, pero de manera infrecuente, síntomas articulares y/o cutáneos.

30 La infección por *Y. pseudotuberculosis* en seres humanos habitualmente da lugar a gastroenteritis. En algunos países tales como Rusia y Japón, cepas específicas de *Y. pseudotuberculosis* causan fiebre escarlata del lejano Oriente (FESLF), caracterizada por erupción cutánea eritematosa, de escamación, exantema, lengua hiperémica, artritis reactiva, síndrome del choque tóxico, septicemia.

35 En animales no humanos, *Y. pseudotuberculosis* es una causa frecuente de morbilidad y a veces mortalidad.

40 Por lo tanto, cuando la célula de *Y. pseudotuberculosis* de la solicitud está destinada para una aplicación terapéutica, es avirulenta (o se ha hecho avirulenta), es decir, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* es suficientemente segura para administrarse sin ningún peligro de infección clínica, para el destinatario o para cualquier contacto del destinatario. En otras palabras, el riesgo asociado con la administración de dicha *Y. pseudotuberculosis* se minimiza, si no se elimina totalmente.

45 Más particularmente, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* ha perdido la capacidad de causar pseudotuberculosis, más generalmente de causar enfermedad entérica y septicemia.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* avirulenta aún tiene capacidad de crecimiento, más particularmente de replicación en un organismo hospedador (tal como un ser humano o un mamífero no humano), pero ha perdido la capacidad de causar dicha enfermedad en dicho organismo hospedador.

50 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* es avirulenta para un mamífero sano, más particularmente para un ser humano sano.

55 Dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede ser avirulenta de forma natural o puede ser avirulenta por atenuación genética y/o química. Los métodos para la atenuación de bacterias patógenas son conocidos en la técnica. La atenuación genética puede conseguirse inactivando uno o más genes implicados en las rutas metabólicas de la bacteria, más particularmente en uno o más mecanismos patogénicos de la bacteria, y/o inactivando uno o más genes implicados en o responsables de la producción de uno o más factores de virulencia de la bacteria.

60 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está genéticamente atenuada.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está atenuada de forma irreversible.

65 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está atenuada genéticamente y de forma irreversible.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula *Y. pseudotuberculosis* está atenuada por eliminación parcial o completa de uno o más genes, aún más particularmente por eliminación parcial o completa de uno o más genes implicados en o responsables de la producción de uno o más factores de virulencia de *Y. pseudotuberculosis*. Dichos genes comprenden los genes de las islas de alta patogenicidad (HPI), el gen *yopK* y el gen *psaA*.

La eliminación parcial o completa de genes puede conseguirse, por ejemplo, por intercambio de alelos seguido por recombinación homologa (véanse, las referencias bibliográficas (1) y (8), es decir, Derbise *et al.* 2012 y 2003).

La eliminación parcial se consigue a un grado suficiente para inactivar la función del gen.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* se atenúa por el eliminación parcial o completa de uno o más genes seleccionados de los genes HPI, el gen *yopK* y el gen *psaA*, por ejemplo, por eliminación parcial o completa de dos o más genes seleccionados de los genes HPI, el gen *yopK* y el gen *psaA*. De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* se atenúa:

- por eliminación parcial o completa de al menos uno de los genes *yopK* y el gen *psaA*, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de al menos uno de los genes HPI, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de al menos un gen HPI, que es un gen YPTB, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de al menos los genes HPI YPTB1585 a YPTB1602 (genes YPTB definidos en la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953, cuya secuencia genómica está disponible en NC_006155, más particularmente en NC_006155.1), aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de varios genes HPI que es suficiente para atenuar la virulencia inducida por HPI, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de todos los genes HPI, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de al menos uno de los genes *yopK* y *psaA* y por eliminación parcial o completa de al menos uno, al menos dos o todos los genes HPI, o al menos de YPTB1585 a YPTB1602, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de al menos uno de los genes *yopK* y *psaA* y por eliminación parcial o completa de al menos YPTB1585 a YPTB1602, aún más particularmente
- por eliminación parcial o completa de los genes *yopK* y *psaA* y por eliminación parcial o completa de al menos uno, al menos dos o todos los genes HPI;
- por eliminación parcial o completa de los genes *yopK* y *psaA* y por eliminación parcial o completa de al menos YPTB1585 a YPTB1602.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* se atenúa por eliminación parcial o completa de los genes HPI YPTB1585 a YPTB1602, de gen *yopK* y del gen *psaA*, aún más particularmente por eliminación parcial de los genes HPI del gen *yopK* y del gen *psaA*.

Las secuencias génicas de HPI ilustrativas de *Y. pseudotuberculosis* están disponibles y se identifican en la secuencia genómica de la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (secuencia genómica NC_006155, más particularmente NC_006155.1). Por ejemplo, las secuencias YPTB1585 a YPTB1602 se prolongan desde la posición 1 914 026 hasta la posición 1 949 600 de dicha secuencia genómica. Una secuencia génica de *yopK* ilustrativa de *Y. pseudotuberculosis* está disponible y se identifica en la secuencia plasmídica pYV de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (secuencia plasmídica NC_006153, más particularmente NC_006153.2). Por ejemplo, la secuencia de *yopK* se prolonga desde la posición 28 491 a la posición 29 039 de dicha secuencia plasmídica de *Y. pseudotuberculosis* (secuencia complementaria).

Una secuencia génica de *psaA* ilustrativa de *Y. pseudotuberculosis* está disponible y se identifica en la secuencia genómica de la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (secuencia genómica NC_006155, más particularmente NC_006155.1). por ejemplo, la secuencia de *psaA* se prolonga desde la posición 1 588 872 hasta la posición 1 589 348 de dicha secuencia genómica.

De acuerdo con una realización alternativa o complementaria de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está fuertemente atenuada, por ejemplo, DL₅₀ para ratones es mayor de 10¹⁰ UFC por vía oral.

Dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* puede ser una célula inactivada o una célula viva.

De acuerdo con una realización ventajosa de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* es una célula viva. De acuerdo una realización ventajosa de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* ha retenido la capacidad de replicación *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, replicación *in vitro* en un medio de cultivo tal como el medio de caldo Luria Bertani (LB) y/o replicación *in vivo* en un mamífero no humano tal como un ratón o en un ser humano.

La célula de *Y. pseudotuberculosis* de la solicitud comprende un ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*.

Más particularmente, la célula de *Y. pseudotuberculosis* de la solicitud comprende un ácido nucleico que codifica la expresión superficial de la menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o la expresión superficial de al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*.

5 Caf1 de *Yersinia pestis* es un polipéptido que se expresa por células de *Y. pestis* de origen natural.

Caf1 de *Y. pestis* es la subunidad monomérica que forma el componente principal de la cápsula del patógeno, es decir, el antígeno de la fracción 1 (F1) de *Y. pestis*.

10 Se sabe que F1 de *Y. pestis* está implicada en la resistencia de *Y. pestis* a fagocitosis.

El proceso de biogénesis de origen natural sigue una ruta de chaperona/acomodador, de acuerdo con lo cual los polipéptidos Caf1 de *Y. pestis* se transportan desde la membrana interior hasta la membrana exterior, y se ensamblan en forma oligomérica en la superficie bacteriana, formando de ese modo la proteína F1.

15 En el periplasma, una proteína chaperona (Caf1M) se une a un polipéptido Caf1 y lo transporta a la membrana exterior. Los complejos de chaperona:Caf1 entonces se abordan por la proteína acomodadora (Caf1A), localizada en la membrana exterior, donde el péptido señal de Caf1 se escinde y donde los polipéptidos Caf1 maduros se unen juntos para formar una cadena creciente, que posteriormente se trasloca a través de la membrana exterior hasta la superficie de la bacteria.

20 El monómero de Caf1 tiene un peso molecular (PM) de aproximadamente 17,6 kDa antes de la escisión del péptido señal.

25 Después de la escisión de la secuencia del péptido señal, el monómero de Caf1 maduro tiene un PM de aproximadamente 15,5-16,5 kDa. El pI calculado es de aproximadamente 4,3.

El oligómero de Caf1 que se forma en la superficie bacteriana generalmente tiene un PM mayor de 1000 kDa.

30 *Y. pestis* puede clasificarse en al menos tres biotipos [*Antiqua* (A), *Medievalis* (M) o *Orientalis* (O)] basándose en su capacidad de usar glicerol y de reducir nitrato.

En la solicitud, *Y. pestis* puede ser cualquier biotipo, por ejemplo, del biotipo A o del tipo M o del biotipo O, por ejemplo, del biotipo M u O, más particularmente del biotipo O.

35 Las cepas de *Y. pestis* están disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, de colecciones de microorganismos, de fuentes comerciales o por aislamiento de un organismo contaminado (por ejemplo, de un ser humano infectado o de un animal no humano o mamífero infectado o de un insecto infectado tal como una pulga infectada).

40 La *Y. pestis* ilustrativa, por ejemplo, comprende:

- la cepa CO92 (biotipo O);
- la cepa KIM10+ (biotipo M);
- 45 - la cepa de *Y. pestis* que está disponible en la NCTC según el n.º NCTC 5923;
- la cepa de *Y. pestis* que está disponible en la NCTC según el n.º NCTC 2868;
- la cepa de *Y. pestis* que está disponible en la NCTC según el n.º NCTC 10329;
- la cepa de *Y. pestis* que está disponible en la NCTC según el n.º NCTC 10330;

50 Se conocen medios para clonar el gen *caf1* (y/o para clonar el operón *caf*) de células de *Y. pestis* y están disponibles para los expertos en la materia. Dichos medios, por ejemplo, comprenden los descritos en los siguientes ejemplos.

Una secuencia ilustrativa de Caf1 de *Y. pestis* es:

- 55 - la secuencia que está disponible con el número de acceso P26948 (170 aminoácidos), que comprende el péptido señal de Caf1 (los primeros 21 aminoácidos N-terminales) y la Caf1 madura (aminoácidos 22-170), es decir la secuencia de la SEQ ID NO: 10, que es:
- MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGAPITIMDNGNIDTELLVGTLLGGYKTGTTSTS
VNFTDAAGDPMYLTFTSQDGNHQQFTTKVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLA
60 AGKYTDAVTVTVS NQ; o
- la secuencia de la proteína Caf1 madura correspondiente, es decir la secuencia de la SEQ ID NO: 12, que es la SEQ ID NO: 10 eliminada de la secuencia del péptido señal, es decir:

ADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGAPITIMDNGNIDTELLVGTLTLGGYKTGTT
STSVNFTDAAGDPMYLTFTSQDGNNHQFTTKVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDD
VVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ.

Una secuencia ilustrativa que codifica Caf1 de *Y. pestis* está disponible y se identifica en el operón *caf* de *Y. pestis* (secuencia de operón X61996.1). Por ejemplo, la secuencia de *caf1* se prolonga desde la posición 4618 hasta la posición 5130 de dicha secuencia de operón *caf* de *Y. pestis*, es decir, la secuencia de la SEQ ID NO: 9 (que codifica la secuencia de la SEQ ID NO: 10) que es:

ATGAAAAAATCAGTTCCGTTATCGCCATTGCATTATTTGGAACCTATTGCAAC
TGCTAATGCGGCAGATTAACTGCAAGCACCCTGCAACGGCAACTCTTGTTG
AACCAGCCCGCATCACTCTTACATATAAGGAAGGCGCTCCAATTACAATTATG
GACAATGGAAACATCGATACAGAATTACTTGTTGGTACGCTTACTCTTGGCGG
CTATAAACAGGAACCACTAGCACATCTGTAACTTTACAGATGCCGCGGGTG
ATCCCATGTACTTAACATTTACTTCTCAGGATGGAAATAACCACCAATTCCT
ACAAAAGTGATTGGCAAGGATTCTAGAGATTTTGATATCTCTCCTAAGGTAAA
CGGTGAGAACCTTGTTGGGGGATGACGTCGTCTTGGCTACGGGCAGCCAGGATT
TCTTTGTTTCGCTCAATTGGTTCCAAAGGCGGTAACTTGCAGCAGGTAAATAC
ACTGATGCTGTAACCGTAACCGTATCTAACCAATAA;

O la secuencia de la SEQ ID NO: 11 (que codifica la secuencia de la SEQ ID NO: 12), que es la secuencia de la SEQ ID NO: 9 eliminada de la secuencia del péptido señal, es decir:

GCAGATTAACTGCAAGCACCCTGCAACGGCAACTCTTGTTGAACCAGCCCG
CATCACTCTTACATATAAGGAAGGCGCTCCAATTACAATTATGGACAATGGAA
ACATCGATACAGAATTACTTGTTGGTACGCTTACTCTTGGCGGCTATAAAACA
GGAACCACTAGCACATCTGTAACTTTACAGATGCCGCGGGTGATCCCATGTA
CTTAACATTTACTTCTCAGGATGGAAATAACCACCAATTCCTACAAAAGTGA
TTGGCAAGGATTCTAGAGATTTTGATATCTCTCCTAAGGTAAACGGTGAGAAC
CTTGTTGGGGGATGACGTCGTCTTGGCTACGGGCAGCCAGGATTTCTTTGTTTCG
CTCAATTGGTTCCAAAGGCGGTAACTTGCAGCAGGTAAATACACTGATGCTG
TAACCGTAACCGTATCTAACCAATAA.

Los fragmentos antigénicos de dicha Caf1 de *Y. pestis* comprenden de forma notable aquellos fragmentos de Caf1 que han retenido la capacidad de inducir o estimular una respuesta inmunitaria mediada por células en un ser humano o en un mamífero no humano, más particularmente la capacidad de inducir o estimular linfocitos T en un ser humano o en un mamífero no humano.

Los fragmentos antigénicos de dicha Caf1 de *Y. pestis* también comprenden aquellos fragmentos de Caf1, que muestran dicha capacidad cuando se acoplan a un vehículo de inmunogenicidad, tal como hemocianina de la lapa californiana, hemocianina de cangrejo de herradura, seroalbúmina bovina.

Dicho ácido nucleico, que codifica al menos un polipéptido de Caf1 de *Yersinia pestis* y su maquinaria de exportación o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*, está comprendido en (más particularmente, se ha insertado o integrado en) el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*, más particularmente en el ADN cromosómico de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico está comprendido de forma estable en (más particularmente, insertado o integrado en) dicho cromosoma o ADN cromosómico. De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico está comprendido de forma irreversible en (más particularmente, insertado o integrado en) dicho cromosoma o ADN cromosómico.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico está comprendido de forma estable y/o irreversible en (más particularmente, insertado o integrado en) dicho cromosoma o ADN cromosómico.

Los medios para insertar o integrar dicho ácido nucleico en el cromosoma de dicha célula de *Y. Pseudotuberculosis*, más particularmente para insertar o integrar de forma estable y/o irreversible dicho ácido nucleico en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*, están disponibles para los expertos en la materia.

Los medios ilustrativos comprenden:

- medios de integración retroviral;
- medios de transposón.

De forma ventajosa, dichos medios son medios de transposón, más particularmente medios de transposón de ADN, más particularmente medios de minitransposón, aún más particularmente medios de minitransposón Tn7.

Los medios de transposón ilustrativos comprenden un plásmido de vehículo o suministro, donde el ácido nucleico a transponer se inserta entre los extremos del transposón (por ejemplo, entre Tn7L y Tn7R, que son los extremos del minitransposón Tn7). Los medios de transposón ilustrativos pueden comprender además un plásmido auxiliar, que porta los genes transposasa (por ejemplo, los genes de transposasa de Tn7, *tnsABCDE*), para la inserción del transposón en el cromosoma diana. Los medios de transposón ilustrativos son, por ejemplo, como se describe:

- en la referencia bibliográfica (2), es decir, Choi *et al.* 2005, y/o
- en los siguientes ejemplos, y/o
- en la figura 1, y/o
- en la figura 2, y/o
- en la referencia bibliográfica (10), es decir, Grinter 1983, y/o
- en la referencia bibliográfica (11) es decir, Barry *et al.* 1986, y/o
- en la referencia bibliográfica (12) es decir, Bao *et al.* 1991, y/o
- en la referencia bibliográfica (13) es decir, Højberg *et al.* 1999, y/o
- en la referencia bibliográfica (14) es decir, Koch *et al.* 2001.

De acuerdo con una realización ventajosa de la solicitud, dicho ácido nucleico, que codifica al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*, se ha insertado o integrado en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*, más particularmente en el ADN cromosómico de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*, por transposición de ácido nucleico.

De acuerdo con una realización ventajosa de la solicitud, se integra al menos un transposón que porta el operón *caf* en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.

De acuerdo con una realización ventajosa de la solicitud, el cromosoma de la célula de *Y. pseudotuberculosis* comprende dicho ácido nucleico codificante (por ejemplo, el operón de *Y. pestis* que codifica la proteína F1 o cápsula) y dos extremos del transposón (por ejemplo, Tn7L y Tn7R, que son los extremos del transposón Tn7 y del minitransposón Tn7).

El ácido nucleico, que codifica dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, el operón de *Y. pestis* que codifica la proteína F1 o cápsula) o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*, puede insertarse, por ejemplo, en el cromosoma de una cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*, por ejemplo, como se describe anteriormente y en los ejemplos y/o las figuras siguientes.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico, que codifica al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* es un ácido nucleico que codifica la expresión de dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o de dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* en la superficie de dicha célula genéticamente atenuada de *Y. pseudotuberculosis*.

Dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* expresado en superficie puede estar contenido en un oligómero, más particularmente en un oligómero que consiste esencialmente en monómeros de Caf1 de *Y. pestis*.

De forma ventajosa, dicho oligómero es la proteína F1 de *Y. pestis*.

Por tanto, dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* expresado en superficie puede estar contenido o expresado, por ejemplo, en la forma de una proteína F1 de *Y. pestis*.

Dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* expresado en superficie puede expresarse, por ejemplo, como un componente de una cápsula que rodea dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* expresa o puede expresar la proteína F1 de *Y. pestis* en su superficie.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* expresa o puede expresar la cápsula de *Y. pestis*, es decir, la cápsula F1 de *Y. pestis*.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está encapsulada.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está rodeada por la cápsula de *Y. pestis* o por componentes de la misma.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* se reconoce (es decir, se une) por un anticuerpo monoclonal anti-F1 de *Y. pestis*, más particularmente se reconoce específicamente (es decir, se une) por un anticuerpo monoclonal anti-F1 de *Y. pestis* (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal descrito en Chanteau *et al.* 2003 [referencia bibliográfica 3] o el anticuerpo monoclonal disponible en QED Bioscience, Inc.; 10919 Technology Place, Suite C; EE. UU.; según el n.º de catálogo 18740 (YBF19)).

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico que codifica dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*) comprende además uno o más genes, más particularmente uno o más genes estructurales:

- para la expresión de dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*) de acuerdo con una ruta de chaperona/acomodador; y/o
- para la expresión en superficie de dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*), más particularmente para la expresión en la superficie de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.

Dicho gen o genes adicionales pueden ser, por ejemplo:

- al menos un gen que codifica una proteína que puede actuar como chaperona para dicha al menos una Caf1 de *Y. pestis* o fragmento antigénico de Caf1, tal como Caf1M de *Y. pestis* y/o, más particularmente y
- al menos un gen que codifica una proteína que puede actuar como acomodador para dicha al menos una Caf1 de *Y. pestis* o fragmento antigénico de Caf1, tal como Caf1A de *Y. pestis*.

Como alternativa o de forma complementaria, dicho ácido nucleico que codifica dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*) comprende además al menos una secuencia reguladora, tal como la secuencia reguladora *caf1R* de *Y. pestis*, que controla la expresión de al menos un polipéptido de Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*) y/o la expresión de dicho gen o genes adicionales.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicho ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, al menos una proteína F1 de *Y. pestis* o una cápsula de *Y. pestis*) es un operón.

Dicho operón comprende de forma ventajosa dicho gen o genes adicionales y/o dicha al menos una secuencia reguladora, más particularmente dicho gen o genes adicionales y dicha al menos una secuencia reguladora.

Dicho operón puede comprender, por ejemplo, al menos un gen que codifica (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1, más particularmente (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis*, y:

- al menos un gen que codifica una proteína que puede actuar como chaperona para dicha Caf1 de *Y. pestis*, tal como Caf1M de *Y. pestis* y/o, más particularmente y
- al menos un gen que codifica una proteína que puede actuar como acomodador para dicha Caf1 de *Y. pestis*, tal como Caf1A de *Y. pestis*.

Por ejemplo, dicho operón comprende de forma ventajosa al menos un gen que codifica Caf1 de *Y. pestis*, al menos un gen que codifica la proteína chaperona Caf1M de *Y. pestis* y al menos un gen que codifica la proteína acomodadora Caf1A de *Y. pestis*.

- 5 Dicho operón puede comprender además una secuencia reguladora, tal como la secuencia reguladora *caf1R* de *Y. pestis*, para controlar la expresión de dicho gen o genes.

Un operón ilustrativo está contenido en el plásmido pMT1 (número de acceso AL117211; 96 210 pb) de la cepa de *Y. pestis* CO92, que codifica (*inter alia*) la proteína F1 de *Y. pestis*.

- 10 Una secuencia de la proteína Caf1M de *Y. pestis* ilustrativa es la secuencia con el número de acceso P26926 (258 aminoácidos), es decir, la secuencia de la SEQ ID NO: 14, que es:

MILNRLSTLGIITFGMLSFAANSAQPDIKFASKEYGVTIGESRIIYPLDAAGVMVSV
KNTQDYPVLIQSRIYDENKEKESEDPFVVTPLFRLDAKQQNSLRQAAGGVFPRD
KESLKWLCVKGIPKDEDIWDVDDATNKQKFNPKDVGVFVQFAINNCIKLLVRPN
ELKGTPIQFAEKLSWKVDGGKLIENPSPFYMNIGELTFGGKSIPSHYIPKSTWAF
DLPKGLAGARNVSWRIINDQGGLDRLYSKNVTL.

- 15 Una secuencia ilustrativa que codifica una proteína Caf1M de *Y. pestis* es la secuencia de la SEQ ID NO: 13 [CDS (AL117211.1:82567..83343)], que es:

ATGATTTTAAATAGATTAAGTACGTTAGGAATTATTACTTTTCGGCATGCTTAGT
TTTGCTGCGAACTCTGCTCAACCAGATATCAAATTCGCAAGCAAAGAGTATGG
CGTGACTATAGGTGAGAGTAGGATCATATACCCGTTAGATGCTGCTGGCGTTA
TGGTCTCGGTGAAAAACACCCAAGATTATCCGGTCTCATTTCAGTCTAGGATC
TACGACGAGAATAAAGAAAAAGAATCAGAGGATCCTTTTCGTGGTCACTCCGC
CATTGTTTCGATTGGATGCTAAGCAACAAAATTCTTTGCGTATAGCTCAGGCT
GGAGGTGTTTTCCCGCGAGATAAAGAGAGCCTAAAGTGGTTATGCGTAAAAG
GGATTCCACCAAAGGATGAAGATATATGGGTTGATGATGCGACAAATAAGCA
AAAATTCAATCCAGACAAAGATGTGGGAGTGTTTCGTGCAATTCGCAATTAATA
ATTGCATTAAGCTTTTGGTTCGACCGAATGAATTAAGGAACCCCTATACAG
TTTGCTGAAAACCTTAAGCTGGAAAGTTGATGGGGGAAGCTAATTGCTGAAA
ACCCCTCACCTTTCTACATGAACATAGGTGAATTAACATTTGGAGGGAAAAGT
ATTCCTTCTCACTATATTCCACCTAAATCGACGTGGGCTTTTGATTTGCCAAAA
GGACTAGCGGGAGCACGTAATGTTTCGTGGAGAATAATTAATGATCAGGGAG
GGTTGGATCGTTTGTATTCCAAAAATGTGACTTTATGA.

- 20 Una secuencia de la proteína Caf1A de *Y. pestis* ilustrativa es la secuencia con el número de acceso P26949 (833 aminoácidos), es decir, la secuencia de la SEQ ID NO: 16, que es:

MRYSKLFLCAGLTLATLPCWGRAYTFDSTMLDTNSGESIDVSLFNQGLQLPGNYF
VNVFVNGRKKVDSGNIDFRLEKHNGKELLWPCLSSLQLTKYGIDIDKYPDLIKSGTE
QCVDLLAIPHSDVQFYFNQQKLSLIVPPQALLPRFDGIMPMQLWDDGIPALFMNY
NTNMQTRKFREGGKSLDSYYAQLQPGLNIGAWRFRSSTSWWKQQGWQRSYIYA
ERGLNTIKSRLTLGETYSDSSIFDSIPIKGIKIASDESMVPYYQWNFAPVVIRGIARTQ
ARVEVLRDGYTVSNELVPSGPFELANLPLGGGSGELKVIIHESDGTKQVFTVPYDT
PAVALRKGYFEYSMMGGEYRPANDLTQTSYVGVFGMKYGLPRNFTLYGGLQGS
QNYHAEALGIGAMLGDFGAISTDVTQADSQKNKQKKESGQRWRVRYNKYLQSG
TSLNIASEEYATEGFNKLADTLNTYCKPNTRNDCRFDYAKPKNKVQFNLSQSIPGS
GTLNFSGYRKNYWRDSRSTTSFSVGYNHFFRNGMSLTLNLSKTQNINKYGEKTSE
LLSNIWLSFPLSRWLGNNSINSNYQMTSDSHGNTTHEVG VYGEAFDRQLYWDVR
ERFNEKGRKYTSNALNLNYRGTYGEISGNYSYDQTQSQLGIGVNGNMVITQYGIT
AGQKTGDTIALVQAPDISGASVGYWPGMKTD FRGYTNYGYLTPYREYKVEINPV
TLPND AEITNNIVSVIPTKGAVVLAKFNARIGGRLFLHLKRSDNKPVPFGSIVTIEG
QSSSSGIVGDNSGVYLTGLPKKSKILVKWGRDKNQSCSSNVVLPEKTDISGAYRLS
TTCILNN.

Una secuencia ilustrativa que codifica una proteína Caf1A de *Y. pestis* es la secuencia de la SEQ ID NO: 15 [CDS (AL117211.1:83368..85869)], que es:

ATGAGGTATTCAAAGCTGTTCTGTGTGCAGGGTTAACTTTGGCAACATTGCC
 TTGTTGGGGACGCGCATATACTTTTGACTCTACTATGCTTGATACGAATAGTG
 GAGAGAGTATAGATGTATCTCTTTTTTAATCAAGGACTTCAACTTCCAGGTAAT
 TATTTTGTTAATGTTTTTGTAAATGGTCGAAAGGTAGACTCTGGAAATATCGA
 CTTCCGTCTAGAAAAACATAATGGAAAAGAACTTCTTTGGCCATGCCTATCAT
 CCTTACAATTGACAAAGTATGGCATTGATATAGATAAATATCCTGATTTAATA
 AAATCTGGTACAGAGCAATGTGTTGATTTATTAGCAATACCACATTCAGATGT
 GCAGTTTTATTTTAATCAGCAGAAATTATCGTTAATTGTGCCACCACAGGCAC
 TTTTACCTAGATTTGATGGCATTATGCCAATGCAATTGTGGGATGACGGCATT
 CCTGCTCTGTTCATGAATTATAATACGAACATGCAGACAAGAAAATTCAGAGA
 AGGAGGCAAGTCTCTGGACTCTTATTATGCTCAGTTGCAACCGGGATTAAACA
 TAGGGGCTTGGCGCTTTCGTAGTTCAACCTCATGGTGGAAACAACAAGGATGG
 CAGCGTTCGTATATTTATGCCGAGCGAGGATTGAATACAATTAAGAGCCGTTT
 GACATTGGGGGAAACCTATTCTGATAGCAGTATCTTTGACAGTATCCCGATTA
 AGGGGATAAAAATTGCTTCAGATGAATCGATGGTTCCTTATTACCAATGGAAT
 TTTGCTCCAGTTGTTTCGCGGTATCGCACGTACACAAGCCAGGGTAGAGGTTTT
 AAGAGATGGCTACACTGTAAGTAATGAGTTGGTGGCCTCGGGACCATTTGAGT
 TAGCAAATCTTCCTCTGGGTGGGGGGAGTGGTGAGCTGAAAGTCATCATT CAT
 GAAAGTGATGGAACAAAGCAAGTTTTTACAGTTCCATATGACACACCAGCAG
 TGGCATTACGGAAGGGCTATTTTCAATATTCAATGATGGGGGGAGAATATCGT
 CCAGCTAATGATCTTACACAAACATCGTATGTTGGCGCTCTTGGGATGAAATA
 TGGTTTGCCAAGGAATCTTACGTTATATGGTGGACTACAAGGGTCCCAAATT
 ATCATGCCGCAGCTCTGGGTATCGGTGCTATGTTGGGTGATTTTGGTGCCATAT
 CTACAGATGTTACTCAAGCAGACAGCCAGAAAAATAAACAAAAAAAAGAAA
 GCGGCCAACGTTGGCGCGTTCGATATAATAAGTACTTGCAGAGTGGAACATCG
 TTAAACATTGCTAGCGAGGAATACGCCACAGAAGGATTTAACAAACTCGCTG
 ACACGTAAATACTTATTGTAAACCTAATACTAGAAACGATTGCCGTTTTGAT
 TATGCTAAACCCAAAAACAAAGTGCAATTCAATTAAAGTCAAAGCATACCTGG
 TTCGGGGACGCTTAATTTTCAAGTGGCTACAGAAAAAACTATTGGCGTGACAGTA
 GGAGCACAACTTCTTTTTCTGTAGGCTATAACCATTTTTTTTAGGAATGGTATGT

CATTGACTTTAAATTTATCGAAGACACAGAATATCAATAAGTATGGAGAAAA
 AACTAGTGAGCTATTATCTAATATCTGGTTGAGTTTTCTCTCAGTCGCTGGCT
 AGGTAATAACTCAATAAATTCAAATTACCAAATGACATCAGATTCTCATGGTA
 ACACTACCCATGAGGTAGGTGTGTACGGTGAAGCCTTTGATCGCCAATTATAC
 TGGGACGTTTCGCGAACGTTTTAATGAAAAGGGCAGAAAATATACCTCCAATG
 CACTGAATTTGAATTATCGAGGAACTTATGGGGAGATCAGTGGTAACTACAGC
 TACGATCAAACCCAAAGCCAACTTGGTATAGGTGTAAATGGCAATATGGTAAT
 AACTCAGTACGGTATAACGGCTGGCCAAAAAACTGGAGATACTATTGCATTA
 GTACAAGCCCCTGATATAAGCGGTGCTTCAGTGGGATACTGGCCAGGCATGA
 AAACAGACTTTAGGGGGTACACCAATTATGGTTACTTAACCCCTTACAGAGAG
 AATAAGGTAGAAATTAACCCAGTTACTTTACCCAATGATGCAGAGATAACAA
 ATAATATTGTTAGCGTGATCCCGACAAAGGGAGCTGTAGTATTAGCAAAATTT
 AACGCAAGGATTGGTGGACGATTGTTTTTACATTTAAAACGCTCTGACAATAA
 ACCTGTTCCATTTGGTTCTATAGTTACCATTGAAGGGCAATCATCCAGCTCTGG
 CATTGTCGGAGATAATAGCGGTGTCTATTTGACTGGACTACCTAAAAAATCAA
 AAATACTTGTTAAGTGGGGGAGAGATAAAAAATCAATCATGTTTCATCTAATGTA
 GTTCTACCAGAAAAAACGGATATTTCTGGTGCTTATAGGTTATCCACAACCTG
 CATCTTAAATAACTGA.

Una secuencia de la proteína Caf1R de *Y. pestis* ilustrativa es la secuencia con el número de acceso P26950 (301 aminoácidos), es decir la secuencia de la SEQ ID NO: 18, que es:

5 MLKQMTVNSIIQYIEENLESKFINIDCLVLYSGFSRRYLQISFKEYVGMPIGTYIRVR
 RASRAAALLRLTRLTHIEISAKLFYDSQQTFTRFKKIFGYTPRQYRMIPFWSFKGL
 LGRREINCEYLQPRICYLKERNIIGQCFNFRDLVFYSGIDSKCRLGKLYDSLKKNTA
 ITVSNRIPFHDKTNDIARTVWDRNKHFS DSEIKVDKGLYAYFFFNDTYDQYVH
 HMYNIYYNSLPIYNLNKRDGYDVEVIKRRNDNTIDCHYFLPIYCDDMEFY NEMQ
 VYHNNIVKPEMSVTLGLPKS.

Una secuencia ilustrativa que codifica una proteína Caf1R de *Y. pestis* es la secuencia de la SEQ ID NO: 17 [complemento (AL117211.1:81352..82257)], que es:

10 ATGCTAAACAGATGACTGTAAATTCAATTATTCAATATATAGAAGAGAATCT
 CGAGTCGAAATTCATTAACTTACTGTTTGGTTTTGTATTCAGGATTCAGCAG
 AAGGTATTTGCAAATTTCTTTAAGGAATATGTCGGAATGCCTATTGGAACAT
 ATATTAGAGTTAGAAGGGCTAGTAGAGCTGCTGCACTATTACGGCTTACCAGG
 CTGACAATAATAGAGATATCAGCAAAGCTTTTTTATGATTTCGCAACAGACATT

CACCAGAGAATTTAAGAAAATATTTGGTTATACCCACGGCAGTATAGGATGA
 TCCCTTTTTGGTCCTTTAAAGGTTTGTGGGTAGAAGGGAAATTAAGTGTGAAT
 ACCTTCAACCACGAATCTGTTACCTTAAAGAGAGAAATATAATTGGTCAATGC
 TTTAATTTTAGGGATTTAGTGTCTACTCTGGGATAGATTCAAAATGTAGATTG
 GGTAAGTTATATGATTCGTTGAAGAAAAATACAGCTATAACAGTATCAAACA
 GAATCCCCTTTCATGATAAAACGAATGACATTATTGCAAGAACGGTTGTTTGG
 GATAGGAATAAGCATTTTCAGCGATAGTGAAATAAAGGTAGATAAAGGCCTGT
 ATGCTTATTTTTTCTTCAATGATACATATGATCAGTATGTTTCATCACATGTACA
 ACATATATTATAACTCTTTCCTATTATAATTTAAATAAGCGGGATGGTTACG
 ATGTGGAGGTCATAAAAAGACGAAATGACAATACTATTGATTGTCATTATTTT
 CTCCCGATTTATTGTGATGACATGGAGTTTTACAATGAAATGCAGGTATATCA
 CAATAATATTGTGAAGCCGGAAATGTCAGTAACATTAGGATTACCAAAGAGTT
 AA.

De acuerdo con una realización, dicho ácido nucleico comprende al menos un gen que codifica (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1, más particularmente (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis* y (por ejemplo, organizado en un operón):

- al menos un gen que codifica la proteína Caf1M de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 14, por ejemplo, el ácido nucleico *caf1M* de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 13, y/o, más particularmente y
- al menos un gen que codifica la proteína Caf1A de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 16, por ejemplo, el ácido nucleico *caf1A* de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 15.

De acuerdo con una realización, dicho ácido nucleico comprende al menos un gen que codifica (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis* o al menos un fragmento antigénico de Caf1, más particularmente (al menos uno) Caf1 de *Y. pestis* y (por ejemplo, organizado en un operón):

- al menos un gen que codifica la proteína Caf1M de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 14, por ejemplo, el ácido nucleico *caf1M* de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 13, y/o, más particularmente y
- al menos un gen que codifica la proteína Caf1A de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 16, por ejemplo, el ácido nucleico *caf1A* de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 15, y/o, más particularmente y
- al menos un gen que codifica la proteína Caf1R de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 18, por ejemplo, el ácido nucleico *caf1R* de *Y. pestis* de la SEQ ID NO: 17.

De acuerdo con una realización, la solicitud se refiere a una célula avirulenta de *Yersinia pseudotuberculosis*, más particularmente a una célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis*, que deriva de una célula de *Y. pseudotuberculosis*, más particularmente de una célula de la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (cuya secuencia cromosómica es la secuencia disponible con el número de acceso NC_006155), por:

- eliminación o inactivación de uno o más genes seleccionados de HPI, *yopK* y *psaA* (como se describe anteriormente y/o se ilustra a continuación) y por
- inserción cromosómica de dicho ácido nucleico que codifica la expresión de al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* o fragmento antigénico en la superficie de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* (como se describe anteriormente y/o se ilustra a continuación).

La solicitud también se refiere a una pluralidad de células, que comprende al menos una célula de *Yersinia pseudotuberculosis* de la solicitud, así como a una cepa de *Yersinia pseudotuberculosis*, que comprende al menos una célula de la solicitud o que consiste o consiste esencialmente en células de la solicitud.

La solicitud también se refiere a una cepa de *Yersinia pseudotuberculosis*, donde más de un 50 %, más particularmente más de un 55 %, aún más particularmente más de un 60 %, aún más particularmente más de un 65 %, aún más particularmente más de un 70 %, aún más particularmente más de un 75 %, aún más

particularmente más de un 80 %, aún más particularmente más de un 85 %, aún más particularmente más de un 90 %, aún más particularmente más de un 95 % de las células de dicha cepa están encapsuladas por una pseudocápsula de *Y. pestis*.

5 Dicha cepa de *Y. pseudotuberculosis* es de forma ventajosa una cepa avirulenta de *Y. pseudotuberculosis* como se describe y/o ilustra en este documento. Dicha cepa de *Y. pseudotuberculosis* puede consistir o consistir esencialmente en células de la solicitud.

10 La solicitud también se refiere a dicha célula, dicha pluralidad de células o a dichas cepas, para su uso como inmunógeno, más particularmente para su uso como inmunógeno contra la peste, aún más particularmente contra la peste bubónica y/o la peste pulmonar, aún más particularmente contra la peste bubónica o la peste pulmonar, aún más particularmente contra la peste bubónica y la peste pulmonar.

15 En la solicitud, dicho ácido nucleico u operón, que codifica dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* (por ejemplo, la proteína F1 de *Y. pestis* o cápsula) o dicho al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*, más particularmente dicho ácido nucleico u operón, que codifica la expresión superficial del mismo, se inserta (o integra) en el cromosoma de *Y. pseudotuberculosis*.

20 La inserción cromosómica de dicho ácido nucleico u operón da lugar a niveles inesperadamente más altos de protección contra la peste bubónica y también la peste pulmonar, más particularmente contra la peste bubónica.

Por ejemplo, una única inoculación oral de *Y. pseudotuberculosis* atenuada viva, en que se ha insertado el operón de F1 de *Y. pestis* en el cromosoma, puede conseguir:

25 un 100 % de protección contra la peste pulmonar después de una exposición con 3300 x DL₅₀ de *Y. pestis*, así como
un 100 % de protección contra la peste bubónica después de una exposición con 100 x DL₅₀ de *Y. pestis* [DL₅₀ = dosis letal al 50 %].

30 Por comparación, cuando no se ha insertado el operón de F1 de *Y. pestis* en el cromosoma de *Y. pseudotuberculosis*, pero se proporciona por un plásmido contenido en *Y. pseudotuberculosis*, la protección de vacunación es, en las mismas condiciones experimentales, de:

35 un 80 % contra la peste pulmonar después de una exposición con 3300 x DL₅₀ de *Y. pestis*, y
un 81 % contra la peste bubónica después de una exposición con 100 x DL₅₀ de *Y. Pestis*.

Se cree que el nivel de protección contra la peste bubónica y la peste pulmonar que se consigue por el medio de la solicitud es una de las más eficaces, y probablemente la más eficaz jamás presentada.

40 Una célula de la solicitud puede usarse con o sin adyuvante inmunológico, más particularmente con un adyuvante, que acelera, prolonga o potencia la calidad de las respuestas inmunitarias contra el polipéptido o polipéptidos o proteína o proteínas de *Y. pestis* que se expresan en la superficie de la célula de *Y. pseudotuberculosis* de la solicitud.

45 Los adyuvantes inmunológicos son conocidos para los expertos en la materia. El adyuvante inmunológico ilustrativo comprende adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, el adyuvante Ribi, un adyuvante basado en sales de aluminio (por ejemplo, alumbre) y/o liposomas, LPS bacteriano.

50 De forma ventajosa, una célula de la solicitud puede usarse sin adyuvante inmunológico.

Dicha célula, dicha pluralidad de células o dicha cepa pueden administrarse mediante cualquier vía que pueda encontrar apropiada el experto en la materia.

55 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha vía de administración es una vía no invasiva, más particularmente una vía que no requiere el uso de ninguna cánula u otro instrumento altamente invasivo.

60 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha vía de administración es la vía oral, la vía intranasal, la vía subcutánea, la vía intradérmica, la vía intramuscular. De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha vía de administración es una vía no oral, más particularmente la vía intranasal, la vía subcutánea, la vía intradérmica, la vía intramuscular, más particularmente la vía subcutánea.

65 De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula, pluralidad de células o cepa se administra por pulverización (por ejemplo, pulverización nasal y/u oral) y/o por inyección (por ejemplo, inyección subcutánea y/o intramuscular), más particularmente por inyección (por ejemplo, inyección subcutánea y/o intramuscular), más particularmente por inyección subcutánea.

Además, la inserción cromosómica de dicho ácido nucleico u operón puede dar lugar a una eficacia de vacunación particularmente elevada, cuando las células o cepas de vacunación se administran mediante vías diferentes a la vía oral, más particularmente mediante una administración subcutánea. Mediante dicha administración no oral, se requieren dosis inferiores para conseguir la misma eficacia de vacunación y/o la misma dosis consigue protección contra dosis mayores de *Y. pestis*.

Dicha célula, dicha pluralidad de células o dicha cepa puede administrarse a cualquier dosis que pueda encontrar apropiado un experto en la materia, teniendo en cuenta la vía de administración contemplada y teniendo en cuenta la edad, el peso y el estado de salud del destinatario pretendido.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha célula, pluralidad de células o cepa se administra a una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el organismo receptor, más particularmente en un ser humano o animal no humano o mamífero no humano.

Dicha respuesta inmunitaria puede comprender, por ejemplo, una respuesta humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células, de forma ventajosa tanto una respuesta humoral como una respuesta inmunitaria mediada por células.

De acuerdo con una realización de la solicitud, la dosis a la que dicha célula, pluralidad de células o cepas se administra es suficiente para inducir tanto una respuesta inmunitaria como una respuesta inmunitaria mediada por células tanto a nivel sistémico (por ejemplo, IgG y linfocitos Th1) como a nivel de la mucosa (por ejemplo, IgA y linfocitos Th17).

La solicitud también se refiere a una composición, más particularmente una composición farmacéutica, aún más particularmente una composición inmunogénica o vacuna, que comprende al menos uno de los siguientes elementos:

- al menos una célula de la solicitud,
- al menos una pluralidad de células de la solicitud,
- al menos una cepa de *Y. pseudotuberculosis* de la solicitud.

De acuerdo con una realización de la solicitud, dicha composición, composición farmacéutica, composición inmunogénica o vacuna es un pulverizador, un vial o una jeringa precargada, más particularmente un vial o una jeringa precargada, más particularmente un vial, más particularmente un vial precintado adecuado para almacenar un producto inyectable y para transferir de forma aséptica dicho producto desde dicho vial a una jeringa (por ejemplo, un vial precintado por una membrana de goma o por una membrana de goma y un tapón).

Dicha composición, más particularmente una composición farmacéutica, o más particularmente una composición inmunogénica o vacuna, puede comprender además al menos un vehículo farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable (diluyente, excipiente, aditivo, ajustador del pH, emulsionante o agente dispersante, conservante, tensioactivo, agente gelificante, así como agente tamponante y otros agentes estabilizantes y solubilizantes, etc.), más particularmente al menos un vehículo adecuado para la administración de vacunas a un ser humano o animal no humano o mamífero no humano.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados y formulaciones incluyen todos los vehículos farmacéuticamente aceptables y formulaciones conocidos, tales como los descritos en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20.^a edición, Mack Publishing Co.; y "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", Ansel, Popovich y Allen Jr., Lippincott Williams y Wilkins.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, incluyendo agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, tamponen, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite de sésamo, combinaciones de los mismos o similares como vehículo. El medio también puede contener materiales auxiliares farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares. El vehículo y la composición pueden ser estériles, y la formulación satisface el modo de administración.

Una composición, composición farmacéutica, composición inmunogénica o vacuna de la solicitud puede ser, por ejemplo, una solución líquida, suspensión, emulsión, formulación de liberación sostenida o polvo.

Dicha composición, más particularmente dicha composición farmacéutica, aún más particularmente dicha composición inmunogénica o vacuna, puede comprender además un adyuvante inmunológico, por ejemplo, como se describe anteriormente. Sin embargo, una característica ventajosa de la célula, pluralidad de células o cepas de la solicitud es que dicho adyuvante no se requiere necesariamente para la inducción de un efecto protector.

La solicitud también se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un ser humano, un animal no humano o un mamífero no humano, que comprende administrar a dicho sujeto al menos una célula, pluralidad de células o cepa de la solicitud, más particularmente a una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria como se describe anteriormente.

5 La solicitud se refiere a un método para prevenir o tratar una infección por *Y. pestis* en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero al menos una célula avirulenta de *Yersinia pseudotuberculosis*, pluralidad de células o cepa de la solicitud, más particularmente al menos una célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis*, pluralidad de células o cepa de la solicitud. Dicha al menos una célula avirulenta o atenuada
10 genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis*, pluralidad de células o cepa de la solicitud puede administrarse a dicho mamífero a una dosis suficiente para inducir una respuesta inmunitaria como se describe anteriormente, más particularmente en una única dosis unitaria. Dicho mamífero puede ser un ser humano o un mamífero no humano, más particularmente un ser humano.

15 La solicitud también se refiere a un método de administración de una composición inmunogénica o vacuna contra la peste, que comprende administrar al menos una célula, pluralidad de células o cepa de la solicitud, o al menos una composición, composición farmacéutica, composición inmunogénica o vacuna.

20 La célula, pluralidad de células, cepa o cepas, composición o composiciones, composición o composiciones farmacéuticas, composición o composiciones inmunogénicas, vacuna o vacunas de la solicitud están destinadas más particularmente para su administración a:

- un ser humano, que está en riesgo de entrar en contacto con o estar expuesto a *Y. pestis*, más particularmente a investigadores de laboratorio, doctores, sanitarios, personas que trabajan en o para un laboratorio de análisis
25 médico, personas que trabajan en o para el ejército o en un entorno militar;
- a un animal no humano, más particularmente a un mamífero no humano, más particularmente a un roedor, aún más particularmente a una rata o un ratón.

30 La solicitud también se refiere al uso, más particularmente al uso *in vitro* de una célula de *Y. pseudotuberculosis* como una célula hospedadora para la expresión de al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* o de al menos un fragmento antigénico de Caf1 de *Y. pestis*, donde el ácido nucleico que codifica dicho al menos un polipéptido Caf1 de *Y. pestis* está comprendido en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.

35 En la presente solicitud, CNCM significa Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes. La dirección del CNCM es: Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM); Institut Pasteur; 28, rue du Dr Roux; 75724 París Cedex 15; Francia.

En la presente solicitud, CRBIP significa Biological Resource Center of Institut Pasteur. La dirección del CRBIP es: Institut Pasteur; Centre de Ressources Biologiques; 25-28 rue du Docteur Roux; 75015 París; Francia.

40 En la presente solicitud, NCTC significa National Collection of Type Cultures. La dirección del NCTC es: Health Protection Agency Culture Collections; Health Protection Agency; Microbiology Services; Porton Down; Salisbury; SP4 0JG; Reino Unido.

45 En la presente solicitud, DSMZ significa Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. La dirección del DSMZ es: Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Inhoffenstr. 7B; D-38124 Braunschweig; Alemania.

50 En la presente solicitud, ATCC significa American Type Culture Collection. La dirección de la ATCC es: American Type Culture Collection (ATCC); 10801 University Blvd.; Manassas, Virginia 20110-2209; Estados Unidos de América.

En la solicitud, salvo que se especifique de otro modo o salvo que el contexto indique otra cosa, todos los términos tienen su significado habitual en el campo o campos relevantes.

55 El término "comprender", que es sinónimo de "incluir" o "contener", es no limitado, y no excluye uno o más elementos, ingredientes o etapas de método no indicados adicionales, mientras que el término "consiste en" es un término limitado, que excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente adicional que no se indique de forma explícita.

60 La expresión "que consiste esencialmente en" es un término parcialmente no limitado, que no excluye uno o más elementos, etapas o ingredientes no indicados adicionales, siempre que estos elementos, etapas o ingredientes adicionales no afecten de forma material a las propiedades básicas y novedosas de la invención.

65 El término "comprender" (o "comprende"), por tanto, incluye el término "consistir en" ("consiste en"), así como la expresión "consistir esencialmente en" ("consiste esencialmente en"). Por consiguiente, el término "comprender" (o "comprende") se entiende, en la presente solicitud, abarcando más particularmente la expresión "consistir en", ("consiste en") y la expresión "consistir esencialmente en" ("consiste esencialmente en").

En un intento por ayudar al lector de la presente solicitud, la descripción se ha separado en diversos párrafos o secciones y/o en diversas realizaciones. Estas separaciones no deben considerarse como desconexiones de la esencia de un párrafo o sección y/o de una realización de la esencia de otro párrafo o sección y/o de otra realización. Por el contrario, la presente solicitud abarca todas las combinaciones de las diversas secciones, párrafos y frases que pueden contemplarse. La presente solicitud abarca todas las combinaciones de las diversas realizaciones que se describen en este documento.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se produjo una cepa de *Y. pseudotuberculosis*, que es tanto avirulenta como definida genéticamente para su uso como vacuna contra la peste. Para este fin, se atenuó de forma irreversible la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 por eliminación de los genes que codifican tres factores de virulencia esenciales (la isla de alta patogenicidad, YopK y pH6 Ag/PsaA).

Se clonó el operón *caf* que codifica F1 de *Y. pestis* en un plásmido y se introdujo en la cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*, generando de ese modo un derivado encapsulado de la cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*. La cepa resultante, llamada V674pF1 (1), producía la cápsula F1 *in vitro* e *in vivo*. La inoculación oral de V674pF1 permitió la colonización del intestino sin causar lesiones en las placas de Peyer y el bazo. La vacunación con V674pF1 indujo componentes tanto humorales como celulares de inmunidad, a niveles sistémicos (IgG y linfocitos Th1) y niveles de la mucosa (IgA y linfocitos Th17). Una única dosis oral (10^8 UFC) protegió a un 100 % de los animales contra la peste pulmonar (dosis de exposición de 10^5 UFC, es decir $33 \times DL_{50}$) y un 94 % con una dosis mayor (10^3 UFC, es decir $3300 \times DL_{50}$) (1). Sin embargo, este protocolo de vacunación protegió únicamente un 81 % de los animales contra la peste bubónica con una baja dosis de exposición (10^3 UFC, es decir $100 \times DL_{50}$) (véanse los resultados a continuación y la figura 7A). además, se observó que la producción de la cápsula F1 era inestable.

Se generó otra forma de derivado encapsulado insertando el operón *caf* de *Y. pestis* que codifica F1 en el cromosoma de la cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis*, usando un minitransposón Tn7. La cepa resultante, llamada V674TnF1, se comparó con la cepa V674pF1 para la estabilidad de la producción de F1, la virulencia residual potencial de la cepa y la eficacia protectora.

Ética

Los animales se alojaron en las instalaciones de animales del Instituto Pasteur acreditadas por el Ministerio Francés de Agricultura para realizar experimentos en ratones vivos (acreditación B 75 15-01, expedida el 22 de mayo de 2008), en aplicación de las regulaciones francesas y europeas sobre el cuidado en la protección de los animales de laboratorio (Directiva ED 86/609, Ley francesa 2001-486 promulgada el 6 de junio de 2001). Los protocolos se aprobaron por el personal veterinario de la instalación de animales del Instituto Pasteur y se realizaron en cumplimiento del Aseguramiento de Bienestar Animal de los NIH n.º A5476-01 promulgado el 7 de febrero de 2007.

Cepa de *Y. pestis*

La cepa de *Y. pestis* CO92 es una cepa de tipo silvestre del biotipo *Orientalis* (5).

La secuencia genómica completa de la cepa de *Y. pestis* CO92 está disponible con el número de acceso AL590842. Además, la cepa de *Y. pestis* CO92 contiene tres plásmidos: pMT1 (también llamado pFra; número de acceso AL117211), pCD1 (también llamado pYV; número de acceso AL117189) y pPCP1 (también llamado pPLa; número de acceso AL109969). El plásmido pMT1 contiene el operón *caf* y codifica la cápsula F1.

Cepa de *Y. pseudotuberculosis*

La cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 es una cepa de serotipo I de tipo silvestre (6). La secuencia genómica completa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 está disponible en el NCBI según NC_006155.

La cepa IP32953p se produjo por introducción del plásmido pKOBEG-*sacB* en la cepa IP32953 por electroporación (7). El vector pKOBEG-*sacB* (8) contiene el operón Red expresado bajo el control del promotor pBAD inducible por arabinosa y el gen *sacB* que es necesario para conservar el plásmido (8, 9).

La cepa V674 se produjo a partir de la cepa IP32953p por eliminación de HPI, yopK y psaA, como se describe en (1).

Construcción de V674TnF1 y verificación de la producción de la cápsula F1Clonación del locus *caf*

La clonación del locus *caf* de *Y. pestis* en el minitransposón Tn7 se realizó de la siguiente manera: se amplificó el locus *caf* de 5 kb que codifica la cápsula F1 de *Y. pestis* por PCR con los cebadores A (5'-ATAAGAATGAATTCGTGACTGATCAATATGTTGG-3'; SEQ ID NO: 1) y B (5'-CGTTAGGGCCCCGTCAGTCTTGCTATCAATGC-3'; SEQ ID NO: 2), que añaden un sitio *Apal* y *EcoRI* en los extremos del locus. El producto de PCR se ligó en los sitios correspondientes en el minitransposón Tn7 portado por el plásmido pUC18R6KTn7-Cm^R (figura 1), generando el plásmido pUC18R6KTn7-Cm^R-*caf*. La presencia del locus *caf* se verificó por PCR usando los cebadores 157A (5'-CAGGAACCACTAGCACATC-3'; SEQ ID NO: 3) y 157B (5'-CCCCACAAGGTTCTCAC-3'; SEQ ID NO: 4) internos al gen *caf*1.

Inserción del locus *caf* en el cromosoma de *Y. pseudotuberculosis*

Para insertar el locus *caf* en el cromosoma de *Y. pseudotuberculosis* V674 se usó la herramienta mini-Tn7 (2). Se usaron los plásmidos pUC18R6KTn7-Cm^R-*caf* y pTNS2 (que proporciona transposasa) juntos para electroporar la cepa de vacuna de *Y. pseudotuberculosis* V674 (1) y los transposantes se seleccionaron en placas de agar LB que contenían cloranfenicol.

La presencia del transposón que contiene el locus *caf* (llamado "transposón mini-Tn7-*caf*-Cm^R", figura 2) se verificó por PCR, usando dos pares de cebadores: 744 (5'-CACAGCATAACTGGACTGATTTC-3'; SEQ ID NO: 5) y 747 (5'-GCTATACGTGTTTGCTGATCAAGATG-3'; SEQ ID NO: 6) para la unión izquierda y 745 (5'-ATTAGCTTACGACGCTACACCC-3'; SEQ ID NO: 7) y 746 (5'-ACGCCACCGGAAGAACCGATACCT-3'; SEQ ID NO: 8) para la unión derecha. La cepa recombinante de *Y. pseudotuberculosis* que contiene la región Tn7-*caf*-Cm^R en su cromosoma se llamó V674TnF1.

Como el plásmido que codifica la transposasa no está albergado por V674TnF1 recombinante, no se produce escisión de la región Tn7-*caf*-Cm^R por transposición.

Verificación de la producción de la cápsula F1

Para estimar la producción de cápsula F1 por la vacuna V674TnF1 recombinante, la cepa se cultivó a 37 °C en caldo LB, y se realizó un ensayo de tira reactiva de F1 (3) sobre suspensiones celulares. Como se muestra en la figura 3, se observó una banda en la misma posición que el control positivo de *Y. pestis* con CO92 (control positivo) mientras que no se detectó señal con la cepa precursora V674 (control negativo), lo que indica, por tanto, que V674TnF1 sintetiza la cápsula F1.

Para visualizar adicionalmente la cápsula F1, se examinó microscópicamente la cepa V674TnF1 cultivada a 37 °C. La exclusión de tinta china alrededor de las células bacterianas V674TnF1 confirmó la presencia de la cápsula (figura 4).

Además, todas las células bacterianas estaban rodeadas por un halo, lo que indica que, al contrario que V674pF1, todas las bacterias producían la cápsula F1. Después de 2 subcultivos en LB, todas las células bacterianas seguían produciendo F1. Por lo tanto, la síntesis de F1 es mucho más estable en V674TnF1 que en V674pF1.

Atenuación de la virulencia

La cepa V674 usada para construir V674pF1 y V674TnF1 se había modificado para atenuar su virulencia por la eliminación de tres factores de virulencia (la isla de alta patogenicidad, la fimbria pH6 Ag/PsaA y el factor YopK) por ingeniería genética (1).

Se ensayó la virulencia de las cepas V674pF1 y V674TnF1 después de la administración intragástrica. En ambos casos, la DL₅₀ fue > 10¹⁰ UFC, que demuestra una atenuación muy fuerte de la virulencia. Sin embargo, se apreciaron muertes ocasionales de ratones después de la vacunación intragástrica, que no estaban relacionadas con la dosis de vacuna usada (véase la tabla 1 a continuación) y que muy probablemente se producían por lesiones accidentales causadas por la cánula intragástrica usada para administrar la vacuna.

La virulencia de la cepa V674TnF1 también se ensayó después de administración subcutánea (SC). Después de la inyección subcutánea de dosis de la cepa V674TnF1 hasta 10⁹ UFC, no se observaron muertes. Se observaron pápulas cutáneas en todos los ratones vacunados con 10⁹ UFC de V674TnF1, en aproximadamente un 50 % a 10⁸ UFC y < 10 % a 10⁷ UFC.

Tabla 1:

Dosis de inoculación (UFC)	% de mortalidad (número de muertes/ratones inoculados totales)		
	V674pF1 intragástrico	V674TnF1 intragástrico	V674TnF1 subcutáneo
10^7	0 % (0/16)	4,1 % (1/24)	0 % (0/16)
10^8	2 % (1/48)	3,6 % (2/55)	0 % (0/13)
10^9	0 % (0/56)	2,5 % (1/40)	0 % (0/8)
10^{10}	0 % (0/8)	0 % (0/8)	No realizado

Persistencia de V674TnF1 en ratones tras inoculación oral

- 5 Después de la inoculación oral de 10^8 o 10^9 UFC, las células bacterianas V674TnF1 se detectaron en las heces de únicamente 3 de 8 ratones en D20, y únicamente con la dosis de vacuna de 10^9 UFC (figura 5A), lo que indica una eliminación relativamente rápida de la vacuna de la luz del intestino.

- 10 En las placas de Peyer y el bazo, V674TnF1 se detectó después de 5 días, pero se eliminó después de 15 días (figura 5B y 5C), independientemente de la dosis administrada.
Por el contrario, las células bacterianas V674TnF1 aún eran detectables en las placas de Peyer y en el bazo de 1/5 ratones en D15, lo que indica que V674TnF1 se elimina más rápidamente de los animales vacunados que la cepa V674pF1.

- 15 En conjunto, nuestras observaciones demuestran que V674TnF1 administrado por vía oral es capaz de colonizar el intestino, las placas de Peyer y el bazo, pero esta colonización es únicamente transitoria y las bacterias se eliminan de los órganos profundos antes de D15.

Protección conferida contra las formas bubónica y pulmonar de la peste

- 20 Para evaluar y comparar la eficacia protectora de V674pF1 y V674TnF1, los ratones se vacunaron y se infectaron un mes después por vía intranasal (IN, peste pulmonar) o por vía subcutánea (SC, peste bubónica) con la cepa completamente virulenta de *Y. pestis* CO92 (4). Para cada vía de infección, se ensayaron dos exposiciones letales de CO92, con una dosis moderada y una elevada de la cepa completamente virulenta de *Y. pestis* CO92.

25

Tabla 2:

	Exposición moderada		Exposición intensa	
	UFC	x DL ₅₀	UFC	x DL ₅₀
IN	10^5	33	10^7	3300
SC	10^3	100	10^5	10 000

Vacunación oral

- 30 - Protección contra peste pulmonar:

Una dosis de 10^7 UFC de la cepa V674pF1 o V674TnF1 no confirió protección completa contra una exposición IN moderada con *Y. pestis* (figura 6A).

- 35 Por el contrario, una dosis de 10^8 UFC de cualquier cepa protegió a un 100 % de los animales contra una exposición similar (figura 6A).

- 40 Como la dosis de 10^8 UFC fue eficaz, se ensayó una exposición bacteriana intensa (figura 6B). Después de esta elevada exposición, únicamente un 80 % de los ratones vacunados con V674pF1 sobrevivieron, mientras que todos los animales vacunados con V674TnF1 sobrevivieron.

- 45 Nuestros resultados muestran, por tanto, el mayor efecto protector de V674TnF1 sobre V674pF1 e indican una única dosis oral de V674TnF1 es suficiente para proteger completamente contra la peste pulmonar, incluso después de exposición a altas cargas de *Y. pestis*.

- Protección contra la peste bubónica:

Una única administración de 10^7 UFC de V674pF1 o V674TnF1 no fue suficiente para obtener un 100 % de protección contra una exposición SC moderada con *Y. pestis* (figura 7A).

- 50 A una dosis de 10^8 UFC, V674pF1 confería un 86 % de protección, mientras que V674TnF1 protegía a un 100 % de los ratones vacunados (figura 7A).

Cuando la dosis de exposición se aumentaba hasta 10 000 x DL₅₀, una única administración oral de 10⁸ UFC de V674TnF1 aún protegía a un 93 % de los animales (figura 7B).

V674TnF1, por tanto, es más eficaz que V674pF1 en la protección contra la peste bubónica.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que una única inoculación oral de 10⁸ UFC de V674TnF1 es muy eficaz en la vacunación de ratones contra la peste pulmonar y también la bubónica, incluso cuando los animales se exponen con dosis muy elevadas de la cepa completamente virulenta de *Y. pestis* CO92.

Vacunación subcutánea

Como uno de los 15 ratones vacunados con V674TnF1 no sobrevivió después de una exposición SC intensa, nos preguntamos si sería posible aumentar incluso más la protección usando otra vía de vacunación.

- Protección contra la peste pulmonar después de vacunación SC

Para ensayar la eficacia protectora de una inoculación SC de V674TnF1, se inyectó una única dosis de vacuna de 10⁵ a 10⁹ UFC y los animales se expusieron a un elevado inóculo IN (10⁷ UFC = 3300 x DL₅₀) de *Y. pestis* CO92. Se obtuvo protección completa con las dosis de vacuna de 10⁷ UFC y mayores (figura 8).

- Protección contra la peste bubónica después de vacunación SC

Después se evaluó la protección conferida por una única inyección SC de V674TnF1 (10⁷ o 10⁸ UFC) contra la peste bubónica (exposición intensa: 10 000 x DL₅₀).

Una única vacunación con cualquier dosis protegió a un 100 % de los animales contra una dosis intensa de exposición (10 000 x DL₅₀) de *Y. pestis* CO92 administrada SC (figura 9), lo que indica una eficacia incluso mayor que la de la vacunación oral contra la peste bubónica.

Conclusiones

La cepa de *Y. pseudotuberculosis* V674TnF1, en que el operón que codifica el antígeno capsular F1 de *Y. pestis* se ha insertado en el cromosoma, es una vacuna eficaz contra la peste bubónica y también la peste pulmonar. La cepa de *Y. pseudotuberculosis* V674TnF1 tiene, de forma notable, las siguientes ventajas:

- estabilidad genética: V674TnF1 es una cepa de *Y. pseudotuberculosis* cuyo genoma es mucho más estable que el de *Y. pestis*;
- inocuidad: V674TnF1 está muy atenuada, debido a la eliminación irreversible de tres genes esenciales para distintos mecanismos de virulencia: adhesión (pH6 Ag/PsaA), captura de hierro (HPI), secreción de toxinas Yop (YopK);
- diversidad molecular: como vacuna de células completas vivas, ofrece una alta complejidad antigénica, que garantiza una respuesta contra una amplia gama de dianas antigénicas; los antígenos están en su forma nativa, procesados adecuadamente y producidos de nuevo siempre que la bacteria persista;
- fácil fabricación: una vez desarrolladas y validadas, las vacunas vivas no requieren equipos y técnicas sofisticados para producirse;
- inmunogenicidad: no se requiere adyuvante, ya que los antígenos bacterianos (LPS y otras características asociadas al patógeno) activan el sistema inmunitario innato; además de los antígenos comunes a *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis*, V674TnF1 produce de forma estable la cápsula F1, que es una diana de vacuna principal contra *Y. pestis*;
- administración de una única dosis: esta es una ventaja principal ya que facilita enormemente las campañas de vacunación y permite una rápida protección;
- vacunación posible por dos vías: dependiendo del contexto, puede preferirse una vía SC u oral de vacunación.

Además, V674TnF1 tiene una alta eficacia de vacuna. Los animales vacunados con V674TnF1 están completamente protegidos contra la peste bubónica y también pulmonar, incluso cuando se exponen a dosis muy elevadas del bacilo de la peste.

En contraste, V674pF1 consigue una eficacia de vacuna inferior, más particularmente con respecto a la peste bubónica.

A nuestro entender, el nivel de protección contra la peste bubónica y pulmonar conferida por una única dosis de la vacuna V674TnF1 es uno de los más eficaces, y probablemente el más eficaz jamás presentado.

Se observó además que V674TnF1 se elimina más rápidamente, de forma sorprendente, del intestino de los animales vacunados que V674pF1, y que la administración subcutáneo u oral de V674TnF1 son vías eficaces de administración dependiendo del uso pretendido en la prevención o el tratamiento urgente.

Referencias bibliográficas

1. Derbise, A., Cerda Marin, A., Ave, P., Blisnick, T., Huerre, M., Carniel, E. y Demeure, C. E. (2012) An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1528
2. Choi, K. H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. y Schweizer, H. P. (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* 2, 443-448
3. Chanteau, S., Rahalison, L., Ralafiarisoa, L., Foulon, J., Ratsitorahina, M., Ratsifasoamanana, L., Carniel, E. y Nato, A. (2003) Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 361, 211-216
4. Chain, P. S., Carniel, E., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Stoutland, P. O., Regala, W. M., Georgescu, A. M., Vergez, L. M., Land, M. L., Motin, V. L., Brubaker, R. R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C., Simonet, M., Chenal-Francisque, V., Souza, B., Dacheux, D., Elliott, J. M., Derbise, A., Hauser, L. J. Y Garcia, E. (2004) Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13826-13831
5. Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Holden, M.T.G., *et al.* (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413: 523-527
6. Chain, P., Regala, W., Mariero, L., Souza, B., Elliott, J., *et al.* (2002) Whole genome sequencing of *Yersinia pseudotuberculosis*: Examining pathogen evolution among the recently emerged *Yersinia*. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology* 102
7. Pouillot, F., Derbise, A., Kukkonen, M., Foulon, J., Korhonen, T.K., *et al.* (2005) Evaluation of O-antigen inactivation on Pla activity and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* harbouring the pPla plasmid. *Microbiology* 151: 3759-3768
8. Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J.M., Carniel, E. (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38(2): 113-116.
9. Datsenko, K.,A., Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(12): 6640-6645.
10. Grinter, N. J. (1983). A broad-host-range cloning vector transposable to various replicons. *Gene* 21: 133-143.
11. Barry, G. F. (1986). Permanent insertion of foreign genes into the chromosome of soil bacteria. *Bio/Technology* 4: 446-449.
12. Bao, Y., D. P. Lies, H. FU y G. P. Roberts (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene* 109: 167-168.
13. Højberg, O., U. Schnider, H. V. Winteler, J. Sørensen y D. Haas (1999). Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4085-4093.
14. Koch, B., L. E. Jensen y O. Nybroe (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J. Microbiol. Meth.* 45: 187-195.

REIVINDICACIONES

1. Una célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis*, en la que uno o más genes seleccionados de HPI, *yopK* y *psaA* están eliminados o inactivados, en la que el ácido nucleico que codifica la expresión de al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* en la superficie de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis* está integrado en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*, y en la que al menos un transposón que porta el operón *caf* está integrado en el cromosoma de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.
2. La célula atenuada genéticamente de *Y. pseudotuberculosis* de la reivindicación 1, que es una célula viva o una célula inactivada.
3. La célula atenuada genéticamente de *Y. pseudotuberculosis* de la reivindicación 1 o 2, que expresa dicha al menos una Caf1 de *Y. pestis* expresada en superficie en forma oligomérica.
4. La célula atenuada genéticamente de *Y. pseudotuberculosis* de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que expresa la proteína F1 de *Y. pestis* en su superficie.
5. La célula atenuada genéticamente de *Y. pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está rodeada por una cápsula de *Y. pestis*.
6. La célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es una célula de la cepa de *Y. pseudotuberculosis* IP32953, cuya secuencia cromosómica es la secuencia disponible con el número de acceso NC_006155, modificada por:
 - eliminación o inactivación de uno o más genes seleccionados de HPI, *yopK* y *psaA*, y por
 - inserción cromosómica de un ácido nucleico que codifica la expresión de al menos un polipéptido Caf1 de *Yersinia pestis* en la superficie de dicha célula de *Y. pseudotuberculosis*.
7. Una cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis*, cuyas células son células de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. La célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7, para su uso como inmunógeno.
9. La célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7, para su uso como inmunógeno contra la peste bubónica y la peste pulmonar.
10. La célula o cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicho inmunógeno está en una forma adecuada para administración oral, subcutánea, intradérmica, intranasal o intramuscular.
11. La célula o cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que dicho inmunógeno está en una forma adecuada para administración mediante una vía no oral.
12. Una composición inmunogénica o vacuna, que comprende al menos una célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o al menos una cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7.
13. La composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 12, que comprende una única dosis unitaria de células atenuadas genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o de la cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7.
14. La composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 12 o 13, que está formulada para administración oral, subcutánea, intradérmica, intranasal o intramuscular.
15. La composición inmunogénica o vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que está formulada para administración no oral.
16. La célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7, o la composición inmunogénica o vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para su uso en el tratamiento o prevención de infección por *Y. pestis* en un mamífero.

17. La célula atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la cepa atenuada genéticamente de *Yersinia pseudotuberculosis* de la reivindicación 7, o la composición inmunogénica o vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para el uso de la reivindicación 16, en la que dicho mamífero es un ser humano.

5

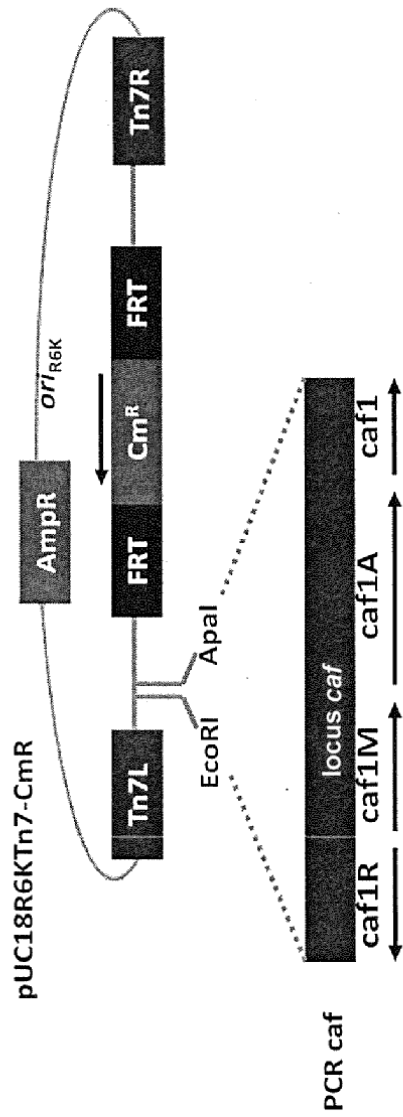


FIGURA 1

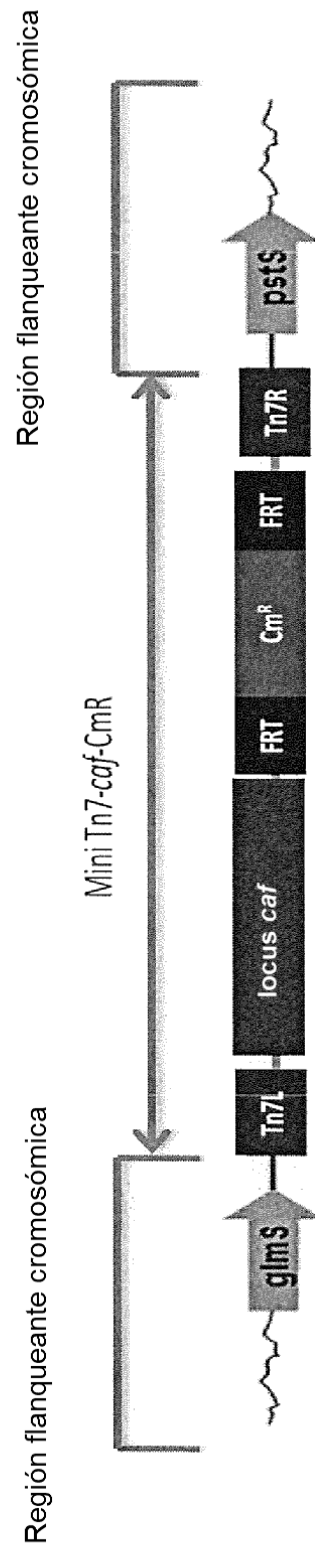


FIGURA 2

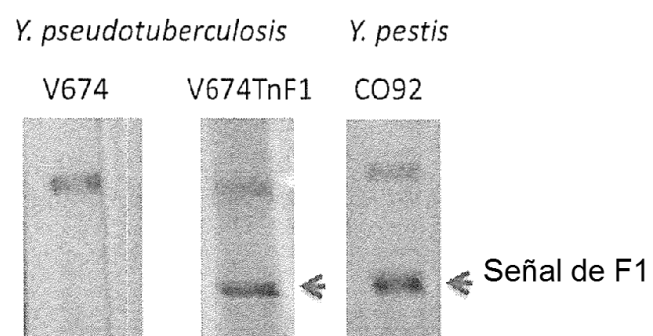


FIGURA 3

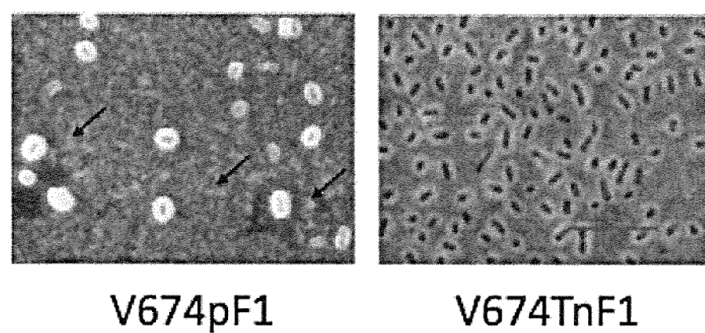
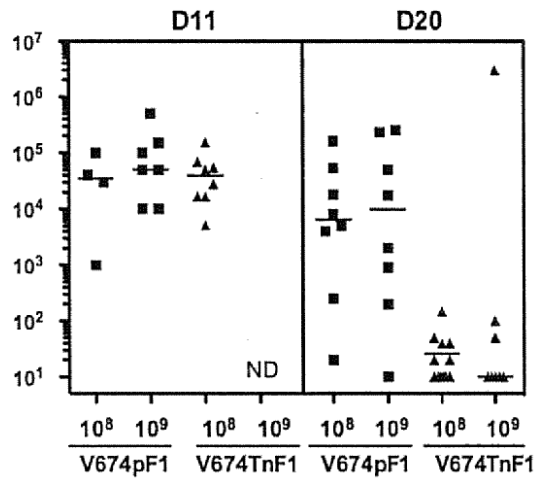
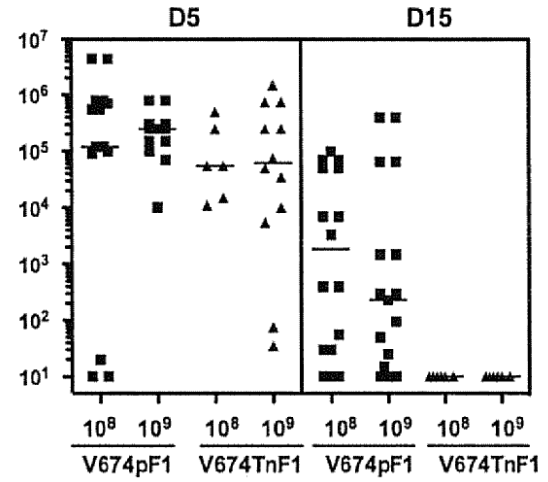


FIGURA 4

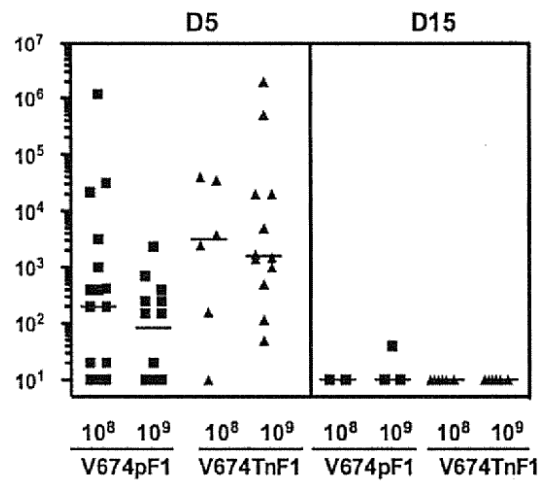
A: Heces



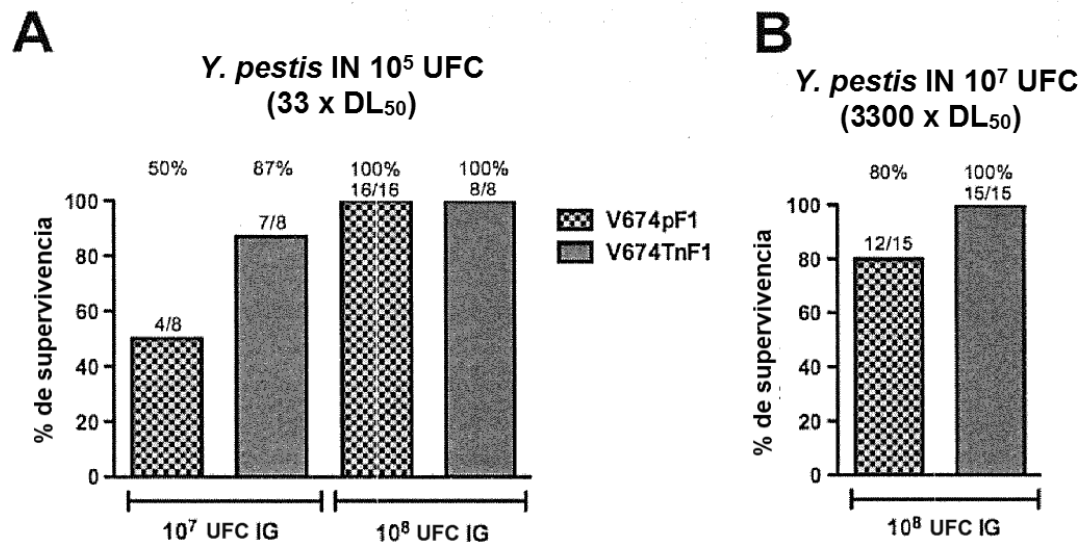
B: Placas de Peyer



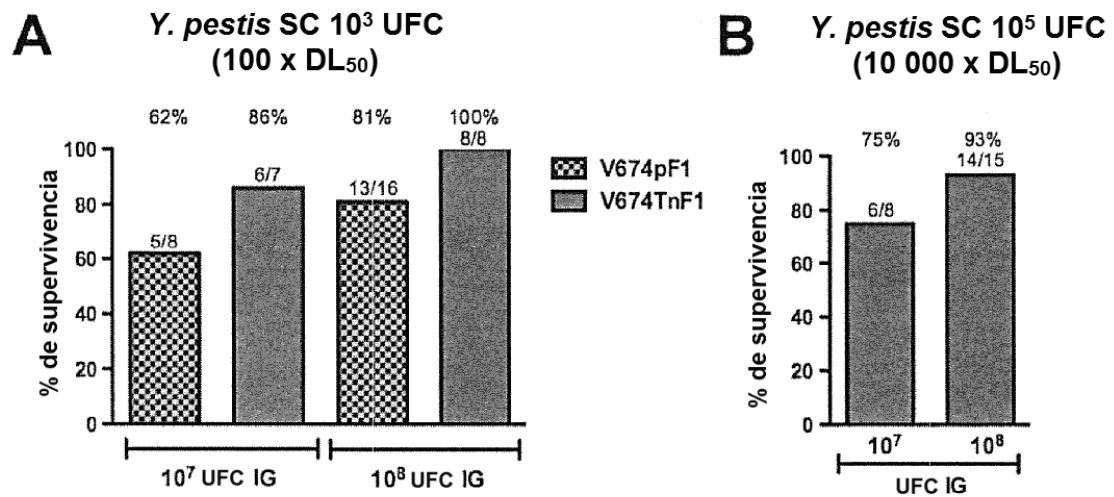
C: Bazo



FIGURAS 5A, 5B y 5C



FIGURAS 6A y 6B



FIGURAS 7A y 7B

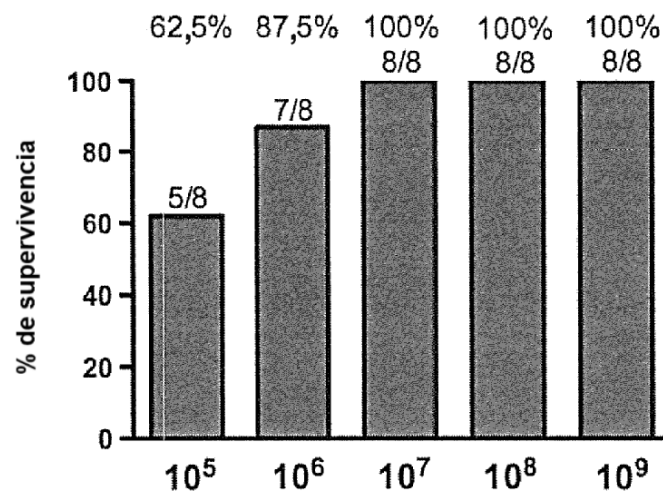


FIGURA 8

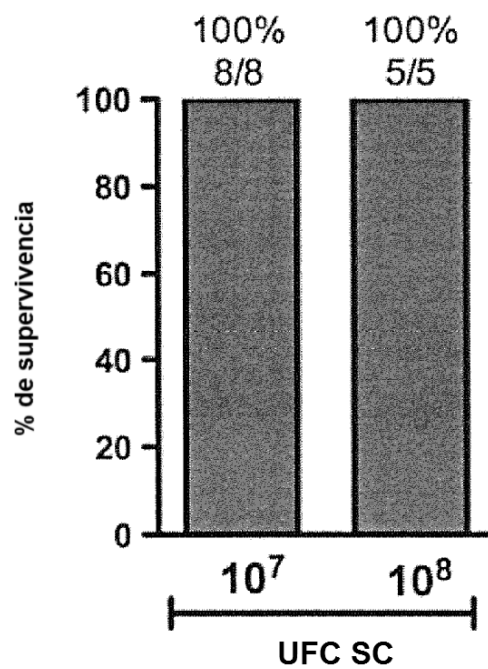


FIGURA 9