

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 366**

21 Número de solicitud: 201430421

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

25.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.10.2015

Fecha de la concesión:

30.08.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.09.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070219

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)
Campus Plaza San Fº (Edf. Interfacultades)
C/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza (Zaragoza) ES

72 Inventor/es:

SOLANS BERNAD, Luis;
AGUILO ANENTO, Juan Ignacio;
URANGA MAIZ, Santiago;
GICQUEL, Brigitte y
MARTIN MONTAÑES, Carlos

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **TRIPLE MUTANTE DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS erp-, phoP- y DIM-**

57 Resumen:

Triple mutante del complejo Mycobacterium tuberculosis erp-, phoP- y DIM-.

La presente invención se refiere a un microorganismo aislado del complejo Mycobacterium tuberculosis que comprende la inactivación o delección del gen erp, del gen phoP y de un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerosol (DIM). Dicho microorganismo es útil para el tratamiento o prevención de la tuberculosis, para el tratamiento del cáncer de vejiga y como vector o adyuvante. Además, también se refiere a la composición farmacéutica que lo comprende y a su uso como vacuna, vector o adyuvante; así como al método de producción de dicho microorganismo.

ES 2 549 366 B1

Triple mutante del complejo *Mycobacterium tuberculosis* *erp*-, *phoP*- y DIM-**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a un microorganismo aislado del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que comprende la inactivación o delección de del gen *erp*, del gen *phoP* y de un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerol (DIM). Dicho microorganismo es útil para el tratamiento o prevención de la tuberculosis, para el tratamiento del cáncer de vejiga y como vector o adyuvante. Por
10 lo tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la medicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La tuberculosis (TB) se mantiene como uno de los problemas de salud pública global más importantes y *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la TB humana,
15 infecta un tercio de la población mundial. En 2011 8,7 millones de nuevos casos fueron detectados y 1,4 millones de personas murieron a causa de la enfermedad. Con la TB causando un cuarto de las muertes provocadas en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la emergencia causada por el incremento de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos, una vacuna efectiva es más necesaria que nunca para reducir el peso de la enfermedad (Glaziou
20 P, et al. Semin Respir Crit Care Med 2013 Feb;34(1):3-16)

La vacuna actual usada contra la tuberculosis, *Mycobacterium bovis* Bacille-Calmette Guérin (BCG), ha sido administrada desde 1921 confiriendo protección contra las formas más severas de la enfermedad (meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar) en
25 niños pero pierde efectividad protegiendo contra la forma pulmonar de la enfermedad, la forma más común de transmisión (*WHO. Information Sheet: observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette-Ghérin (BCG) vaccine. Global Vaccine Safety, Immunization and Biologicals 2012 April 2012*). Aunque BCG es considerada como una vacuna muy segura y es administrada de forma global, estados de
30 inmunodeficiencia severa han sido relacionados con un incremento del riesgo de una diseminación en el sistema de BCG post-vacunación (Murphy D, et al. Tuberculosis (Edinb) 2008 88(4):344-57). Aquellos grupos de riesgo para los que la vacunación con BCG está contraindicada incluyen pacientes con inmunodeficiencias, tanto primarias como secundarias y personas infectadas con el virus VIH, incluidos neonatos (*WHO.*

Information Sheet: observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette-Gh rin (BCG) vaccine. Global Vaccine Safety, Immunization and Biologicals. 2012 April 2012). Ha habido una especial preocupación acerca de la implicación del VIH en la seguridad de la vacunación con BCG (Mak TK, *et al.* Lancet 2008 Sep 6;372(9641):786-7). Una reciente retrospectiva ha documentado una alta frecuencia de infecciones de BCG en niños infectados con VIH (Hesseling AC, *et al.* Vaccine 2007 Jan 2;25(1):14-8). La política actual de vacunación de la Organización Mundial de la Salud recomienda la no vacunación con BCG en niños que se sabe infectados de VIH, con o sin síntomas manifestados.

5

10

Una de la ventajas del uso de vacunas vivas atenuadas basadas en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* es que mantienen la mayoría de los antígenos ausentes en *M. bovis* y otros que BCG perdió durante el proceso de los cultivos sucesivos (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73; Brosch R, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2007 104(13):5596-601), por ello representan una alternativa racional para reemplazar a BCG. Además, el uso de BCG est  contraindicado en pacientes con inmunodeficiencias, tanto primarias como secundarias, incluyendo aquellos infectados con VIH (WHO. *Information Sheet: observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette-Gh rin (BCG) vaccine. Global Vaccine Safety, Immunization and Biologicals. 2012 April 2012).* El desarrollo de nuevas vacunas más seguras que BCG que puedan ser usadas en esta población es necesario.

15

20

El principal reto en el desarrollo de vacunas vivas es conseguir un grado satisfactorio de atenuación y seguridad manteniendo la inmunogenicidad y la protección de la vacuna. Hay ejemplos en la literatura de mutantes vivos atenuados de *M. tuberculosis* como candidatos a vacuna que aunque atenuados, confieren protección contra la enfermedad similar a BCG. Por ejemplo, se ha descrito un mutante simple auxótrofo de *M. tuberculosis* deficiente en la biosíntesis de leucina (Δleu) presenta atenuación *in vitro* e *in vivo* pero se caracteriza por una baja eficacia protectora comparado con BCG (Hondalus MK, *et al.* Infect Immun 2000 68(5):2888-98).

25

La vacuna denominada MTBVAC, es una vacuna viva de *M. tuberculosis* basada en deleciones en los genes *phoP* y *fadD26* y es la primera vacuna que cumple con el criterio de Ginebra (Kamath AT, *et al.* Vaccine 2005 23(29):3753-61). MTBVAC confiere mayor protección que BCG en modelo de ratón y tiene un perfil de seguridad

30

similar (Arbues A, *et al.* *Vaccine* 2013 31(42):4867-73). MTBVAC es la primera vacuna basada en *M. tuberculosis* atenuada que ha entrado en ensayos clínicos (identificador del ensayo clínico en *ClinicalTrials.gov*: NCT02013245). Sin embargo, MTBVAC no está recomendada para su uso en pacientes con riesgo de inmunosupresión.

5 Durante la pasada década numerosos esfuerzos fueron puestos en la construcción de nuevas vacunas contra la tuberculosis, incluyendo vacunas capaces de ser usadas en pacientes inmunodeprimidos (Marinova D, *et al.* *Vaccines* 2013 Dec:12(12):1431-48). Para ello se ha usado diferentes aproximaciones, incluyendo cepas de BCG recombinantes, administración de potenciadores después de la vacunación con BCG
10 o cepas vivas atenuadas de *M. tuberculosis*, todas ellas están en diferentes fases de ensayos clínicos o preclínicos. Sin embargo, se hace necesaria una vacuna que sea lo suficientemente efectiva y esté lo suficientemente atenuada para poder ser utilizada en pacientes con riesgo de inmunosupresión, incluso en recién nacidos con riesgo de inmunosupresión.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante perteneciente al complejo *M. tuberculosis* que comprende la inactivación o delección del gen *erp*, del gen *phoP* y de un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerol
20 (*pthicerol dimycocerosates*, DIM). Las tres mutaciones presentan un efecto sinérgico en su extrema atenuación, el triple mutante está sorprendentemente altamente atenuado y mantiene la capacidad de protección contra la tuberculosis. Por lo tanto, es útil en todos los pacientes, incluso en pacientes con riesgo de inmunosupresión.

En la presente invención se ha realizado la triple mutación en *M. tuberculosis* y los
25 resultados son extrapolables a los demás miembros del complejo *M. tuberculosis*. El experto en la materia conoce que los miembros del complejo *M. tuberculosis*, entre los que se encuentran *M. tuberculosis* (principal agente causante de tuberculosis en humanos), *M. bovis* (responsable de TB en bovinos y que incluye la cepa BCG), *M. africanum* (el principal causante de TB en África), *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*,
30 y *M. canetti* representan una única especie debido a las similitudes entre ellos (Cole ST, *et al.* *Nature* 1998 393: 537-544; Imaeda T, *International Journal of Systematic*

Bacteriology 1985 35 (2):147-150; Van Soolingen D, *et al.* International Journal of Systematic Bacteriology 1997 47(4):1236-1245; Brosch R, *et al.* PNAS 2002 99(6):3684-3689). Por otra parte, como bien conoce el experto en la materia, entre los distintos miembros del complejo *M. tuberculosis*, es conocida la existencia del gen *phoP*, de varios genes que producen DIM (entre ellos el gen *fadD26*) y del gen *erp* (Berthet FX, *et al.* Science 1998 Oct 23;282(5389):759-62; Bigi F, *et al.* Tuberculosis (Edinb) 2005 Jul;85(4):221-6) y también de la gran similaridad entre ellos (Zahrt TC y Deretic V, PNAS 2001 98(22):12706-12711; Soto CY, *et al.* J Clin Microbiol 2004 42(1):212-219; Camacho LR, *et al.* Mol Microbiol 1999 34(2):257-267, Camacho LR, *et al.* J Biol Chem 2001 276(23):19845-19854; Cox JS, *et al.* Nature 1999 402:79-83).

La presente invención también se refiere al uso del microorganismo de la invención y de la composición farmacéutica que la comprende para las mismas indicaciones que el experto en la materia conoce para la vacuna BCG. Por lo tanto, el microorganismo de la invención y la composición farmacéutica de la invención se pueden utilizar para el tratamiento o prevención de tuberculosis, para el tratamiento frente al cáncer de vejiga (Lamm DL, *et al.* The Journal of Urology 2000; 163:1124-1129; Saint F, *et al.* European Urology 2003; 43:351-361), y como adyuvante o vector (Stover CK, *et al.* Nature 1991; 351(6):456-460 y Bastos RG, *et al.* Vaccine 2009; 27:6495-6503).

Por lo tanto, un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo aislado perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, de aquí en adelante este microorganismo aislado se denominará microorganismo de la presente invención, que comprende la inactivación o delección de:

- a. el gen *erp*,
- b. el gen *phoP* y
- c. un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerol (DIM).

El microorganismo de la invención se denomina por lo tanto, "*erp-phoP-DIM*".

En una realización preferida, el microorganismo aislado de la presente invención se caracteriza por que el gen que previene la producción de DIM es el gen *fadD26*. Este microorganismo más referido de la invención se denomina por lo tanto, "*erp-phoP-fadD26*", también denominado en la presente invención "*MTBVAC erp*" cuando deriva de la cepa de *M. tuberculosis* Mt103.

En la presente invención se entiende por complejo “*Mycobacterium tuberculosis*” los microorganismos del género *Mycobacterium* que causan tuberculosis en mamíferos como *M. tuberculosis* (principal agente causante de tuberculosis en humanos), *M. bovis* (responsable de TB en bovinos y que incluye la cepa BCG), *M. africanum* (el principal causante de TB en África), *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, y *M. canetti* y que representan una única especie debido a las similitudes entre ellos (Cole ST, *et al.* Nature 1998393: 537-544; Imaeda T International Journal of Systematic Bacteriology 1985 35(2):147-150; Van Soolingen D, *et al.* International Journal of Systematic Bacteriology 199747(4):1236-1245; Brosch R, *et al.* PNAS 2002 99(6):3684–3689).

10

En otra realización de la invención, el microorganismo aislado de la invención se selecciona de la lista que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. microti*. En otra realización más preferida aún, el microorganismo aislado de la invención es *M. tuberculosis*.

15

En la presente invención se entiende por “inactivación” la disrupción de la expresión de un gen mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, por la inserción de un marcador de resistencia a antibióticos o por delección del gen. En la presente invención se entiende por “delección” la eliminación de parte de un gen o de un gen completo que hace que se pierda la expresión de dicho gen y fenotipo en la cepa delecionada.

20

En la presente invención se entiende por gen “*erp*” al gen denominado Rv3810 conocido por el experto en la materia, también conocido por *pirG*. Por ejemplo, en el caso de *M. tuberculosis* cepa H37Rv se refiere al gen con número de referencia del GenBank L38851.1, (NC_002755.2 en caso de la cepa de *M. tuberculosis* CDC1551), en al caso de *M. bovis* cepa AF2122/97 al gen con numero de referencia del GenBank NC_002945.3, identificación del gen 1093509 (GenBank) y en el caso de *M. africanum* cepa GM041182 al gen con numero de referencia del GenBank NC_015758.1, identificación gen 10957490 (GenBank).

25

30

En la presente invención se entiende por gen “*phoP*” al gen denominado Rv0757 conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, en el caso de *M. tuberculosis* cepa H37Rv se refiere al gen con número de referencia del GenBank NC_000962.3 en *M. tuberculosis* H37Rv, en al caso de *M. bovis* cepa AF2122/97 al gen con numero de referencia del GenBank NC_002945.3, identificación del gen 1092447 (GenBank) y en

35

el caso de *M. africanum* cepa GM041182 al gen con numero de referencia del GenBank NC_015758.1 identificación del gen 1095513 (GenBank).

En la presente invención, los genes que previenen (evitan) la producción de DIM
 5 (dimicocerosatos de tiocero) son los conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, los descritos en Camacho LR, *et al.* J Biol Chem. 2001 276(23):19845-54). Estos genes se pueden seleccionar de la lista que comprende: *fadD26*, *fadD28*, *ddrC* y *mmpL7*. En una realización particular es el gen *fadD26* (denominado por el experto en la materia Rv2930). Por ejemplo, el gen *fadD26* de *M. tuberculosis* de la cepa
 10 H37Rv con número de referencia del GenBank NC_000962.3, en el caso de *M. bovis* cepa AF2122/97 al gen con numero de referencia del GenBank NC_002945.3 identificación del gen 1092151 (en GenBank) y en el caso de *M. africanum* cepa GM041182 al gen con numero de referencia del GenBank NC_015758.1 identificación del gen 10956394 (GenBank).

15

El microorganismo de la invención puede o no comprenden marcadores de resistencia a antibióticos, como por ejemplo, marcador de resistencia a kanamicina.

20

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del microorganismo aislado de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica. Alternativamente, la presente invención también hace referencia al microorganismo aislado de la invención para su uso como medicamento.

25

En una realización preferida, el uso del microorganismo de la invención se caracteriza por que la composición farmacéutica o medicamento, es una vacuna.

30

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del microorganismo aislado de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de tuberculosis. Alternativamente, la presente invención también se refiere al microorganismo aislado de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de tuberculosis.

35

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del microorganismo aislado de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer de vejiga. Alternativamente, la presente invención también se refiere al

microorganismo aislado de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga.

5 El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprenda el microorganismo aislado de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas, entre ellas vacunas y antivirales. La combinación
10 de dicha composición farmacéutica con vacunas o antivirales podría hacer más efectiva la respuesta inmune que generan, actuando así como adyuvante. El término composición farmacéutica y medicamento se utilizan en esa invención de manera indistinta.

15 En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmune a la enfermedad causada por una bacteria o por un virus. Es un preparado de antígenos que, una vez dentro del organismo, provoca la respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos y genera memoria inmunológica produciendo
20 inmunidad permanente o transitoria.

La vacuna de la presente invención puede estar viva o inactivada.

25 En la presente invención el término "antiviral" se refiere a cualquier sustancia que no permita la replicación, ensamblaje o liberación de virus, como por ejemplo interferón o ribavirina.

30 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas. Aquellas necesarias de tratamiento incluyen las ya asociadas con alteraciones así como en aquellas en las que se previene la alteración. Una "alteración" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la composición de la invención, tal y como se describe en el presente documento.

35 En una realización preferida, los diferentes usos del microorganismo de la presente invención, descritos hasta el momento, se caracterizan porque se llevan a cabo en un individuo con riesgo de inmunosupresión. Un individuo con riesgo de inmunosupresión

puede ser un sujeto portador del VIH, o que tiene alteraciones de la inmunidad celular (por ejemplo por, por trasplante de órganos sólidos, linfomas o insuficiencia renal crónica) o con otras causas de inmunodepresión, como neoplasias sólidas y leucemias. En una realización preferida, el individuo es portador del VIH.

5

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso del microorganismo aislado de la invención como vector o adyuvante.

10

En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a una vacuna. El microorganismo de la presente invención puede ser utilizado como adyuvante de otros antígenos vacunales procedentes de otras enfermedades infecciosas como por ejemplo, difteria, tétano, tosferina, o enfermedades degenerativas como esclerosis lateral amiotrófica entre otras.

15

En esta memoria, el término “vector” se refiere a que el microorganismo de la invención puede comprender otros antígenos vacunales procedentes de otras enfermedades infecciosas como por ejemplo, difteria, tétano, tosferina, o enfermedades degenerativas como esclerosis lateral amiotrófica entre otras.

20

Otro aspecto descrito en la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende el microorganismo aislado de la invención.

25

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención, puede además comprender un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización más preferida aún, la composición farmacéutica de la invención puede comprender además, un adyuvante.

30

En la presente invención, cuando el microorganismo está acompañado de un adyuvante éste podría ser por ejemplo, los conocidos por el experto en la materia, por ejemplo aunque sin limitarse, las sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” adyuvante completo de Freud o el escualeno.

35

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica que comprende el microorganismo aislado de la invención,

la estabiliza o ayuda en su preparación en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

10

Un “vehículo farmacológicamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

20

En otra realización preferida, la composición de la invención puede comprender además, otro principio activo, por ejemplo antígenos vacunales procedentes de otras enfermedades infecciosas como por ejemplo, difteria, tétano, tosferina, o enfermedades degenerativas como esclerosis lateral amiotrófica entre otras.

25

Como se emplea aquí, el término “principio activo” (“sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo”) significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

35

La composición farmacéutica o medicamento proporcionado por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Por dicho motivo, una realización preferida por este aspecto de la invención se refiere a la
5 composición farmacéutica donde dicha composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración por vía transdérmica, parenteral, intranasal, respiratoria, perioral, sublingual, oral o tópica.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se
10 caracteriza por que está en forma liofilizada, sólida o líquida.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse bien en una sola dosis o bien a dosis repetidas a elección del experto en la materia.

15 Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica descrita anteriormente para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un sujeto.

20 En una realización preferida del uso de la composición farmacéutica de la invención, ésta se administra como vacuna o como vector o adyuvante, preferentemente para el tratamiento o prevención de tuberculosis, y/o para el tratamiento del cáncer de vejiga. Así, alternativamente la composición farmacéutica de la invención se usa para el tratamiento o prevención de la tuberculosis y/o para el tratamiento del cáncer de
25 vejiga.

En una realización preferida, el individuo o sujeto a tratar es un individuo con riesgo de inmunosupresión, preferentemente portador del virus de la inmunodeficiencia humana, o que tiene alteraciones de la inmunidad celular (trasplante de órganos sólidos, linfomas, insuficiencia renal crónica) u otras causas de inmunodepresión como
30 neoplasias sólidas y leucemias. En otra realización preferida el individuo es un neonato con o sin riesgo de inmunosupresión y también puede ser un neonato portador del VIH.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método para construir el microorganismo aislado de la presente invención que comprende la inactivación o delección de:

- a. el gen *erp*,
- 5 b. el gen *phoP* y
- c. de un gen que previene la producción de DIM.

En una realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que el gen que previene la producción de DIM es el gen *fadD26*.

10

En otra realización preferida, el método de la invención se caracteriza por que el microorganismo aislado se selecciona de la lista que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. microti*, siendo preferido el microorganismo *M. tuberculosis*.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

FIG. 1 Describe la construcción y caracterización de los mutantes por delección *erp*⁻. A) Esquema de las delecciones construidas, Mt103 *erp*⁻ y MTBVAC *erp*⁻. B) Caracterización de los mutantes obtenidos. El DNA fue amplificado usando los pares de cebadores, *erpMUT1/res1* y *erpMUT2/res2*. Los mutantes 1 y 2 fueron obtenidos de Mt103 y mutantes 3 y 4 fueron obtenidos de MTBVAC. Los mutantes 2 y 4 fueron seleccionados dado que se obtuvo amplificado en las dos PCRs. C) El perfil de atenuación del mutante simple de *erp* en Mt103 se midió mediante un ensayo de competición inoculando de forma intra-peritoneal una cantidad igual de Mt103 y Mt103 *erp*⁻ CFU en ratones con una inmunodeficiencia severa y combinada (SCID). Tres semanas post-infección, Mt103 había desplazado a Mt103 *erp*⁻ un orden en base 10, indicando que la inactivación de *erp* estaba alterando la capacidad de replicación de la bacteria *in vivo*.

30

35

FIG. 2. Se muestra que la híper-atenuación de MTBVAC *erp*⁻ es debida a un efecto no aditivo sino sinérgico. A) Replicación intracelular en línea celular MH-S, grafico representativo de un triplicado B) Experimento de supervivencia en ratones (** equivalente a $p < 0,001$), las diferencias entre todos los grupos fueron significativas $p < 0,001$.

FIG. 3. Se muestra que MTBVAC *erp*⁻ protege frente a tuberculosis. A) Protección inducida en pulmones 4 semanas post infección, B) protección inducida en bazo 4 semanas post infección (* equivalente $p < 0,005$, ** equivalente $p < 0,001$, *** equivalente $p < 0,0001$)

FIG. 4. Se muestra la inmunidad inducida en ratones C57BL6. A) Niveles de activación de células $CD4^+/IFN\gamma^+$ en bazo 4 semanas post infección. B) Niveles de activación de células $CD8^+/IFN\gamma^+$ en bazo 4 semanas post infección. C) Niveles de activación de células $CD4^+/IFN\gamma^+$ en pulmón 4 semanas post infección. D) Niveles de activación de células $CD8^+/IFN\gamma^+$ en pulmón 4 semanas post infección (* equivalente $p < 0,005$).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Generación del triple mutante *phoP- DIM- erp-*

1.1 Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. *Escherichia coli* HB101 y las cepas micobacterianas *M. tuberculosis* H37Rv (Cepa de referencia del Instituto Pasteur), *M. tuberculosis* Mt103 (aislado clínico) (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73), *M. bovis* BCG Pasteur y MTBVAC (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73) fueron usadas en la presente invención. Las cepas micobacterianas fueron crecidas a 37°C en medio 7H9 (Difco) suplementado con 0,2% glicerol, 0,05% Tween® 80 y 10%

albumina-dextrosa-catalasa (ADC, Middlebrook), en placas 7H10 en medio suplementado con 0,5% glicerol y 10% albumina-dextrosa-catalasa (ADC, Middlebrook) o en placas 7H11 con medio suplementado con 0,5% glicerol y 10% albumina-dextrosa-catalasa (ADC, Middlebrook), polimixina B 50 U/ml, trimetoprima 0,02mg/ml y anfotericina B 0,01 mg/ml (por favor, casas comerciales). Los mutantes resultantes fueron cultivados en el mismo medio. *E. coli* HB101, usada para los procedimientos de clonaje, fue crecida a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) liquido o en placas de LB agar. Cuando se requirió, se usó kanamicina (Km) a una concentración de 20µg/ml, gentamicina a una concentración 10 µg/ml para el medio 7H10 o 20 µg/ml para el medio LB y sacarosa al 4% (peso/volumen).

Construcción de plásmidos y reemplazamiento alélico. Un fragmento de 2,2 kilobases (kb) que contenía el gen *erp* fue amplificado usando DNA genómico de Mt103 usando como cebadores, *erpF* (AGCGGGCCCTCGATGCGGTGGTCAGC) (SEQ ID NO: 1) y *erpRv* (AAGGGGCCCATACTCGGTCTGATACACGG) (SEQ ID NO: 2). Fue clonado en un vector pGEM-Teasy®. Un marcador de resistencia a Km, flanqueado por sitios *res* para poder eliminar posteriormente el marcador de resistencia, procedente del plásmido pCG122 (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73) fue clonado en los sitios *BamHI* y *EcoRI* del gen *erp* resultando una delección de 431 pares de bases (pb o) en el marco de lectura (pLZ2). El plásmido suicida pLZ3 fue construido insertando un fragmento de 8955 pb que contenía el fragmento *erp::km* procedente de pLZ2 en el sitio *Apal* del plásmido pJQ200-*xyIE* (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73). Se diseñaron dos cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para caracterizar las nuevas construcciones y confirmar la doble recombinación en el genoma, *erpMUT1* (ACGTCGAGATCGTTGTAGTTCATCAC) (SEQ ID NO: 3), situado en 5' de la región recombinada, y *erpMUT2* (CCAAGTTCCACGGACCCGT) (SEQ ID NO: 4) situado en 3', *res 1* and *res 2* (Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73), ambos fueron usados con el mismo propósito.

Construcción de los mutantes. Diferentes mutantes *erp* (Figura 1A) se obtuvieron usando en método clásico de doble recombinación homóloga (Lamrabet O, *et al.* Tuberculosis (Edinb) 2012 92(5):365-76). Se electroporó, en Mt103 y MTBVAC, un vector suicida que contenía, un gen *sucB* (letal en micobacterias), un gen *xyIE* (da coloración en presencia de catecol), *Gm^r* (confiere resistencia a gentamicina) y una

copia del gen *erp* deleccionado que incluía un marcador de resistencia a kanamicina (Km^r); los mutantes de recombinación simple fueron seleccionados en placas que contenían kanamicina y gentamicina, no eran capaces de crecer en presencia de sacarosa y presentaban una coloración amarilla en presencia de catecol. Los mutantes de doble recombinación fueron seleccionados en placas que contenían kanamicina, incapaces de crecer en placas que contenían gentamicina, no presentaban coloración amarilla en presencia de catecol y sobrevivían en presencia de sacarosa. Una correcta recombinación se analizó mediante PCR usando como cebadores *erpMUT1* (SEQ ID NO: 3) y *erpMUT2* (SEQ ID NO: 4) (flanqueaban la región recombinada) y unos cebadores situados en los sitios “res” de la construcción (como los descritos en Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73), Las colonias seleccionadas fueron aquellas que se obtuvo amplificado en las dos PCRs (Figura 1B).

Infección de línea celular de macrófago alveolar de ratón, MH-S. 2×10^4 células MH-S (ATCC® CRL-2019™) fueron sembradas en placas de 24 pocillos (TPP) en medio DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino y glutamina 2mM y fueron infectadas con suspensiones bacterianas de Mt103, MTBVAC o MTBVAC *erp*⁻ a una multiplicidad de infección de 1:1. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. Después de 4h de infección, las monocapas de células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar cualquier bacteria no internalizada. A varios tiempos post-infección (4h, 24h, 72h o 168h) las células infectadas fueron lisadas con 0,1% tritón™ X_100 y diluciones apropiadas fueron sembradas en placas de 7H10 para contar unidades formadoras de colonia (cfu) de bacterias intracelulares.

Competición de Mt103 y Mt103 *erp*⁻ en ratones SCID. Un grupo de 5 ratones CB17 SCID de 8 semanas de vida fue infectado intraperitonealmente con 10^6 bacterias viables de las cepas Mt103 y Mt103 *erp*⁻. Tres semanas post-infección, los ratones fueron sacrificados siendo recogidos los pulmones y los bazo para medir en número de cfus sembrando en 7H11 y 7H11 más Km 20 μ g/ml para discriminar entre Mt103 y Mt103 *erp*⁻.

Determinación de supervivencia en ratones SCID. Grupos de 5 ratones CB17 SCID de 8 semanas de vida fueron infectados intraperitonealmente con 10^6 bacterias viables de las cepas: Mt103, Mt103 *erp*⁻, *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, MTBVAC y

MTBVAC *erp*⁻. El punto final del experimento se estableció mediante la supervivencia del animal, un peso menor de 17g fue establecido como punto de sacrificio. El análisis estadístico se realizó usando el software *GraphPad Prism*.

Vacunación y eficacia protectora. Grupos de seis ratones C57BL/6JRj fueron vacunados con 10⁵ bacterias viables de las cepas apropiadas por vía intradérmica. A las cuatro semanas post-infección; los ratones fueron infectados con aproximadamente 10³ cfu de *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. A las 8 semanas post-infección, los ratones fueron sacrificados siendo recogidos los pulmones y los bazo para medir en número de cfus sembrando en placas 7H11. El análisis estadístico se realizó usando el software *GraphPad Prism*.

Inmunogenicidad inducida por los candidatos en ratones C57 BL/6. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados subcutáneamente con 10⁵ bacterias viables de las cepas adecuadas. Los ratones fueron mantenidos en grupos de 5 individuos durante cuatro semanas, momento en el que fueron sacrificados y extraídos los pulmones y el bazo. Los bazo fueron triturados y las suspensiones celulares fueron tratadas con tampón *red blood cell lysing buffer* (SIGMA) para eliminar eritrocitos. Los pulmones fueron homogeneizados en el tampón: HEPES-NaOH 10mM pH 7,4. NaCl 150 mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1,8 mM; triturados con *gentleMACS dissociator* (MACS) e incubados con tampón *red blood cell lysing buffer* (SIGMA). 10⁶ de esplenocitos o de células pulmonares fueron sembradas en placas de 96 pocillos (TPP) e incubadas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml and β-mercaptoetanol 50 µM; en presencia de PPD (SSI) 1 µg/ml a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. A las 18h de incubación, las células fueron marcadas con α-IFN-APC (BD) y α-CD4-FITC (BD) usando el kit de BD *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron analizadas por citometría de flujo usando FACSAria™ (BD). El análisis estadístico se realizó usando el software *GraphPad Prism*.

Ejemplo 2: Estudios *in vivo* con el triple mutante *phoP*- *DIM*- *erp*-

2.1 La inactivación de *erp* atenúa *M. tuberculosis* *in vivo*

En la presente invención se demuestra que la triple mutación *phoP*- *DIM*- *erp*- atenúa *M. tuberculosis in vivo* de manera sorprendente. *M. tuberculosis* ejemplifica a las demás micobacterias del complejo *M. tuberculosis* tal y como se ha indicado anteriormente, por lo que la invención se refiere a los mutantes *phoP*- *DIM*- *erp*- del complejo *M. tuberculosis*.

El perfil de atenuación del mutante simple de *erp* en Mt103 se midió mediante un ensayo de competición inoculando de forma intra-peritoneal una cantidad igual de Mt103 y Mt103 *erp*⁻ CFU en ratones SCID. Tres semanas post-infección, Mt103 había desplazado a Mt103 *erp*⁻ un orden en base 10 (Figura 1C), indicando que la inactivación de *erp* estaba alterando la capacidad de replicación de la bacteria *in vivo*.

2.2 La hiper-atenuación de MTBVAC *erp*⁻ es debida a un efecto sinérgico de las tres mutaciones

Primero nos propusimos estudiar si la inactivación *erp* en MTBVAC confería una atenuación adicional en modelo celular (utilizando el protocolo de Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73). Para ello se usó la línea celular MH-S como modelo de macrófago alveolar para replicación en experimentos en los que se estudiaron Mt103, MTBVAC y MTBVAC *erp*. Mt103 fue capaz de replicar dos órdenes en 72 horas en las células MH-S alcanzando tres después de siete días de infección, el comportamiento de MTBVAC y MTBVAC *erp*⁻ fue muy similar siendo incapaces de replicar más de un logaritmo siete días post-infección (Figura 2A).

Después, estudiamos la atenuación de la cepa MTBVAC *erp*⁻ en ratones CB17 SCID comparándola con Mt103, Mt103 *erp*⁻, BCG Pasteur y MTBVAC. La comparativa de supervivencia de los animales vacunados con Mt103 o Mt103 *erp*⁻ confirmó los datos obtenidos en el ensayo de competición, los ratones inoculados con la cepa mutante sobrevivieron significativamente dos semanas más. Los ratones SCID vacunados con MTBVAC *erp*⁻ sobrevivieron de 42 a 51 semanas (Figura 2B), siendo capaces de recuperar bacterias viables en pulmón y bazo después de ese periodo (datos no mostrados). Cuando se analizó la supervivencia de los grupos vacunados con MTBVAC y MTBVAC *erp*⁻, los datos revelaron un sorprendente acusado perfil de atenuación de la cepa MTBVAC *erp*⁻, sobreviviendo estos animales aproximadamente un año mientras que los ratones vacunados con MTBVAC sucumbieron a los 120

días. Los resultados mostrados en la figura 2 indican claramente que el perfil de atenuación de MTBVAC *erp*⁻ es debido a un efecto sinérgico de la inactivación de los tres genes (Figura 2A y 2B). Por último, MTBVAC *erp*⁻ fue significativamente más seguro que BCG Pasteur en este modelo.

5 **2.3 MTBVAC *erp*⁻ protege al mismo nivel que BCG contra la tuberculosis**

Un alto nivel de atenuación puede resultar en una caída de la eficacia protectora, por ello analizamos (utilizando el protocolo de Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73) la capacidad protectora que confería MTBVAC *erp*⁻ comparándola con BCG y MTBVAC, usando H37Rv para causar una infección en ratones C57BL/6. Ambas, BCG y MTBVAC *erp*⁻, mostraron similar eficacia en la protección en pulmones, mientras que MTBVAC mostró una mejor protección (figura 3A). Un resultado similar se observó en bazo (figura 3B).

2.4 Inmunogenicidad inducida por el candidato a vacuna MTBVAC *erp*⁻.

Para analizar la inmunogenicidad de MTBVAC *erp*⁻, se midió la activación a las cuatro semanas post-vacunación de las células CD4⁺/IFNγ⁺ y CD8⁺/IFNγ⁺ (utilizando el protocolo de Arbues A, *et al.* Vaccine 2013 31(42):4867-73). Para ello se usaron las cepas *M. bovis* BCG, MTBVAC y MTBVAC *erp*⁻. Se observó un incremento de ambas poblaciones de células, CD4⁺/IFNγ⁺ y CD8⁺/IFNγ⁺, en todos los grupos vacunados (Figura 4). A pesar de ello, se detectó un menor porcentaje de esplenocitos CD4⁺/IFNγ⁺ en el caso de MTBVAC *erp*⁻ siendo significativo cuando se comparaba con MTBVAC. Un perfil similar se observa en los pulmones, pero en este caso no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4A). No se encontraron diferencias significativas en las células CD8⁺/IFNγ⁺ entre los grupos estudiados (Figura 4B, 4D).

25 **CONCLUSIÓN**

En la presente invención se demuestra que un microorganismo recombinante perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que comprende la inactivación o delección del gen *erp*, del gen *phoP* y de un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerol (DIM), ejemplificado mediante el gen *fadD26*, es útil como

vacuna hiperatenuada, haciéndola especialmente útil para individuos con riesgo de inmunosupresión.

5 La sorprendentemente, hiperatenuación de MTBVAC debida a la inactivación de *erp* podría inducir a pensar que de alguna manera afectarían su eficacia drásticamente en su capacidad de conferir protección, sin embargo, no es así. Los datos mostrados en la presente invención demuestran que cuando se compara MTBVAC *erp*⁻ con BCG, la protección frente a la infección es muy similar, a pesar de que MTBVAC *erp*⁻ es mucho más atenuado. El fenotipo de hiper atenuación en ratones SCID observado en el
10 mutante MTBVAC *erp*⁻ es superior al esperado si comparamos Mt103 y el mutante simple Mt103 *erp*⁻. La mutación en *erp* introducida en MTBVAC (*phoP*⁻ *fad26*⁻) presenta un efecto sinérgico de atenuación que no afecta la habilidad protectora de la vacuna contra la infección de tuberculosis cuando se compara con la cepa actual BCG.

15 La vacuna hiper-atenuada de bacterias del complejo *M. tuberculosis* de la presente invención, es por lo tanto útil para su uso en pacientes en riesgo de inmunosupresión, por ejemplo, los infectado con VIH y los coinfectados con VIH y TB.

20 Además, el triple mutante de la invención es también útil en todas las aplicaciones conocidas por el experto en la materia que se realicen de los mutantes de *M. tuberculosis*, por ejemplo, en cáncer de vejiga o como vector o adyuvante.

Debido a la gran similitud entre los miembros del complejo *M. tuberculosis*, se ha elegido a *M. tuberculosis* como representativo del mismo y por lo tanto, los resultados
25 obtenidos demuestran la utilidad del triple mutante de cualquiera de los miembros de dicho complejo.

La vacuna viva atenuada de *M. tuberculosis* MTBVAC ha sido aprobada por las autoridades reguladoras para su uso en humanos en ensayos clínicos (identificador de
30 *ClinicalTrials.gov*: NCT02013245). En la presente invención se ha construido la cepa MTBVAC *erp*⁻ mediante delecciones estables con un marcador de resistencia a kanamicina que confieren fenotipos *phoP*⁻, *Dim*⁻ y *erp*⁻. La guía del consenso de Ginebra para vacunas vivas de *M. tuberculosis* aconseja construir mutaciones estables sin marcador de resistencia (Kamath AT, *et al.* *Vaccine* 2005 23(29):3753-61;

Walker KB, *et al.* *Vaccine* 2010 28(11):2259-70). Por lo tanto la presente invención también se refiere a bacterias del complejo *M. tuberculosis* que no comprenden marcadores de resistencia.

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo aislado perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que comprende la inactivación o delección de:
 - a. el gen *erp*,
 - b. el gen *phoP* y
 - c. un gen que previene la producción de dimicocerosatos de tiocerosol (DIM).
2. Microorganismo aislado según la reivindicación 1 donde el gen que previene la producción de DIM es el gen *fadD26*.
3. Microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde microorganismo aislado se selecciona de la lista que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. microti*.
4. Microorganismo aislado según la reivindicación 3 donde el microorganismo es *M. tuberculosis*.
5. Uso del microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la elaboración de una composición farmacéutica.
6. Uso según la reivindicación 5 donde la composición farmacéutica es una vacuna.
7. Uso del microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de tuberculosis.
8. Uso del microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer de vejiga.
9. Uso del microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como vector o adyuvante.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en un individuo con riesgo de inmunosupresión.

11. Uso según la reivindicación 10 donde el individuo es portador del virus de la inmunodeficiencia humana.
- 5 12. Composición farmacéutica que comprende el microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 que además comprende un adyuvante.
- 15 15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en el que la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía transdérmica, parenteral, intranasal, respiratoria, perioral, sublingual, oral o tópica.
- 20 16. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde la composición está en forma liofilizada, sólida o líquida.
17. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un sujeto.
- 25 18. Uso según la reivindicación 17 como vacuna.
19. Uso según la reivindicación 17 como vector o adyuvante.
- 30 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para el tratamiento o prevención de tuberculosis.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para el tratamiento de cáncer de vejiga.
- 35 22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 en un individuo con riesgo de inmunosupresión.

23. Uso según la reivindicación 22 donde el individuo es portador el virus de la inmunodeficiencia humana.

5 24. Método para construir el microorganismo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la inactivación o delección de:

- a. el gen *erp*,
- b. el gen *phoP* y
- c. un gen que previene la producción de DIM.

10

25. Método según la reivindicación 24 donde el gen que previene la producción de DIM es el gen *fadD26*.

15 26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25 donde microorganismo aislado se selecciona de la lista que comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. microti*.

27. Método según la reivindicación 26 donde el microorganismo es *M. tuberculosis*.

20

FIG. 1A

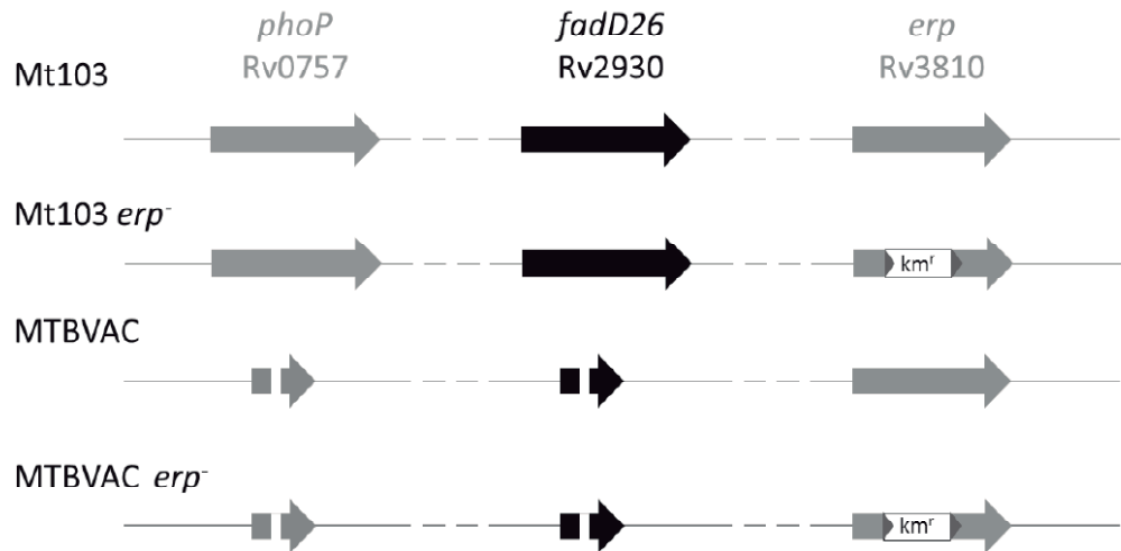


FIG. 1B

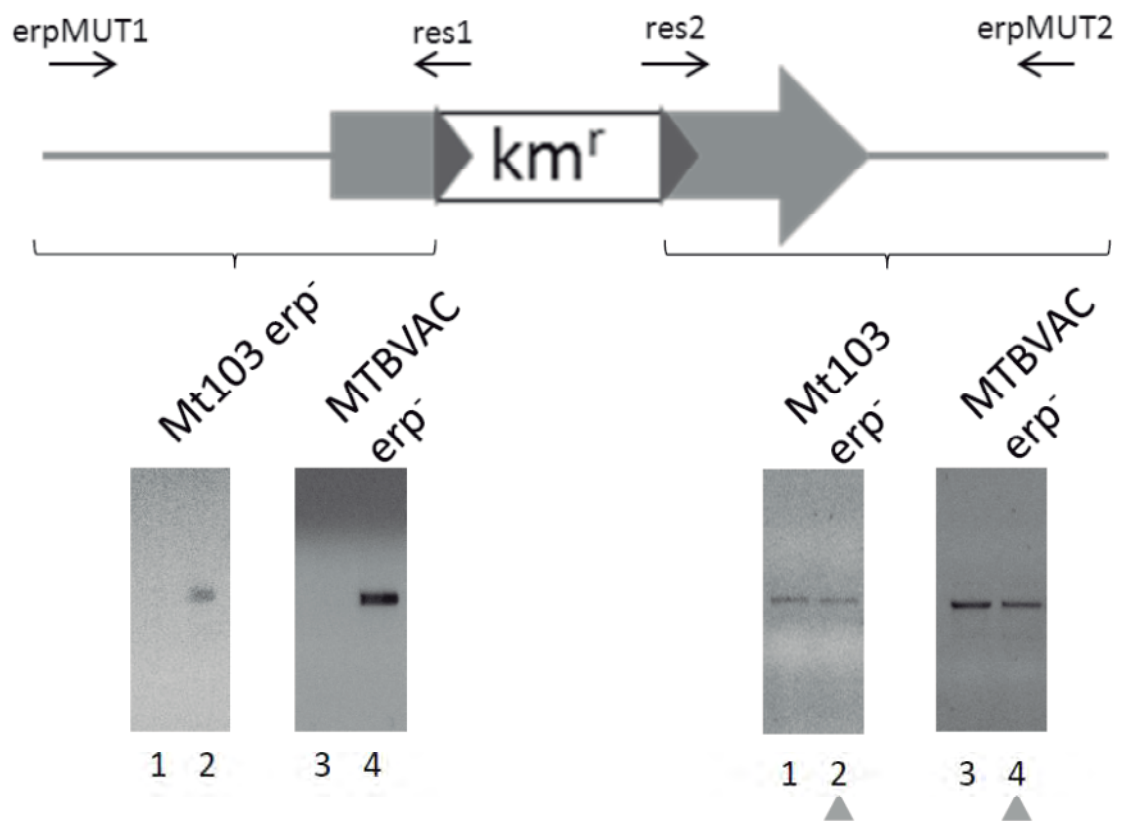


FIG. 1C

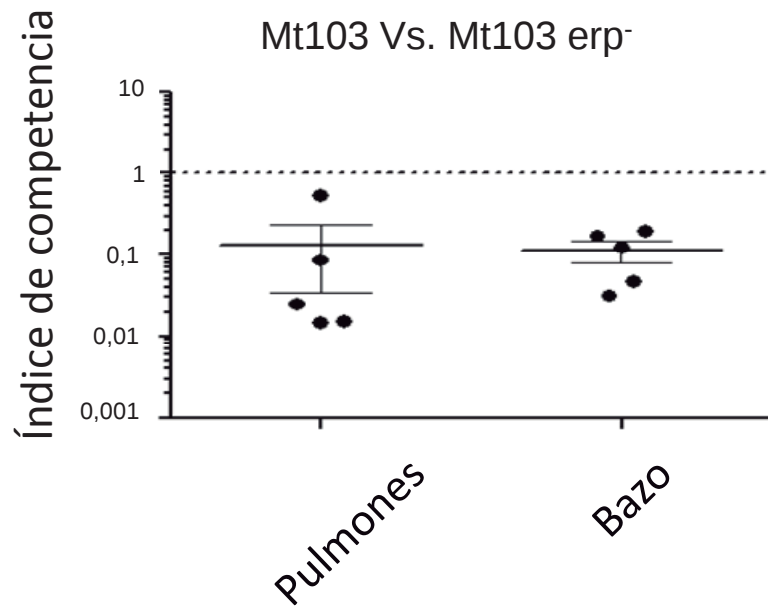


FIG. 2A

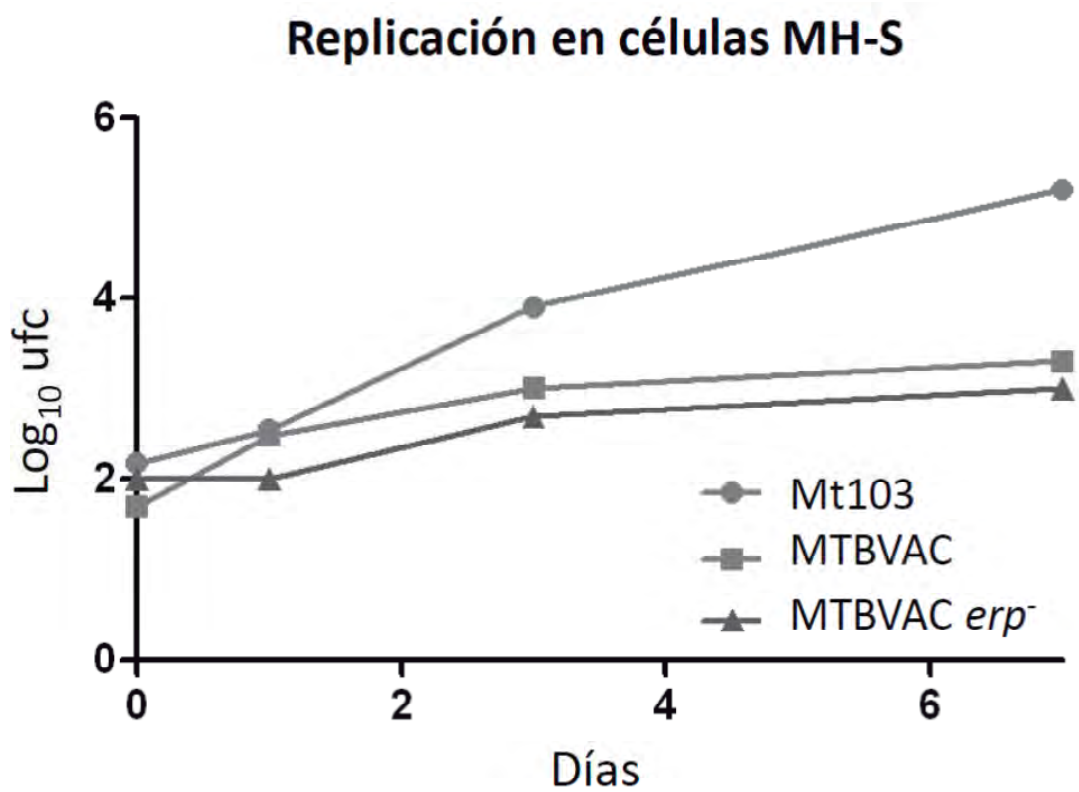


FIG. 2B

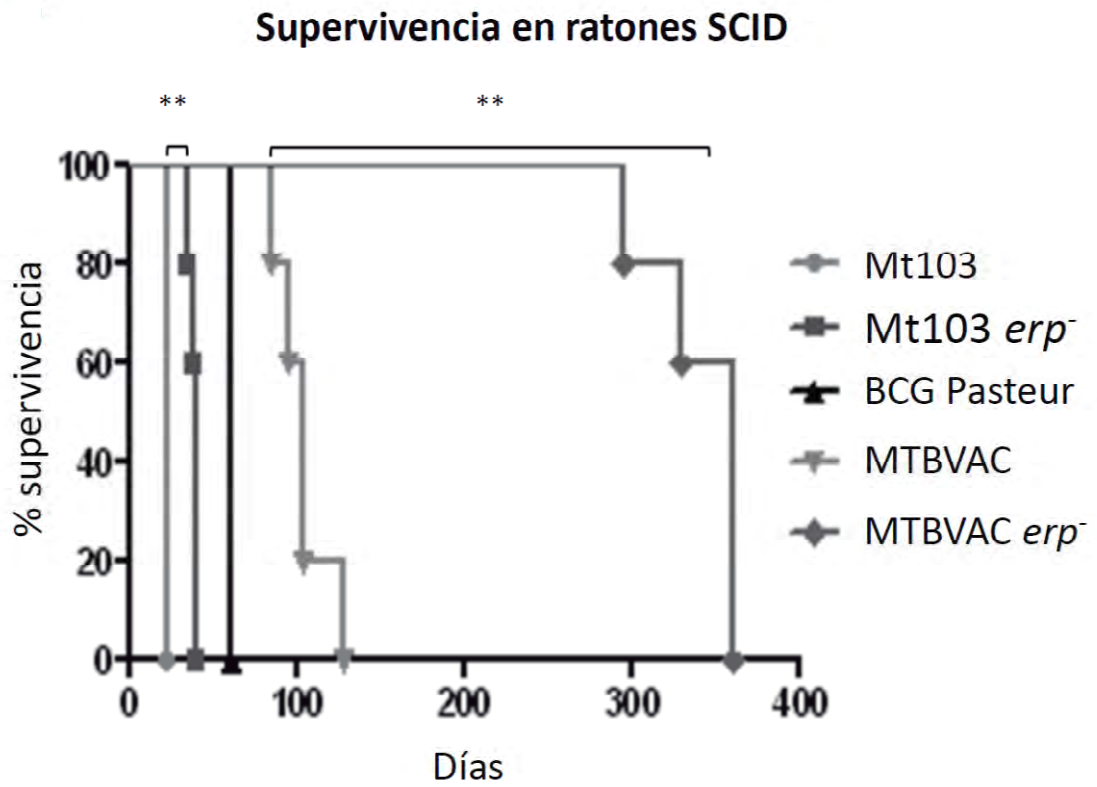


FIG. 3A

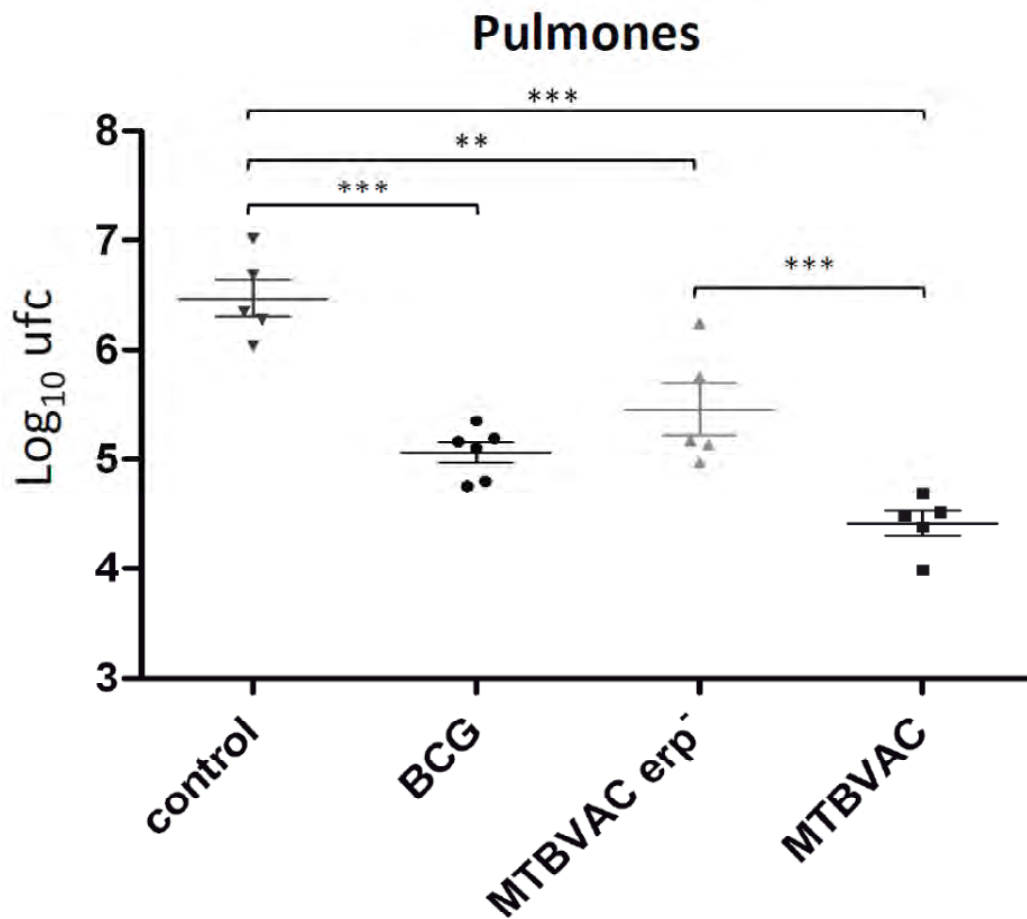


FIG. 3B

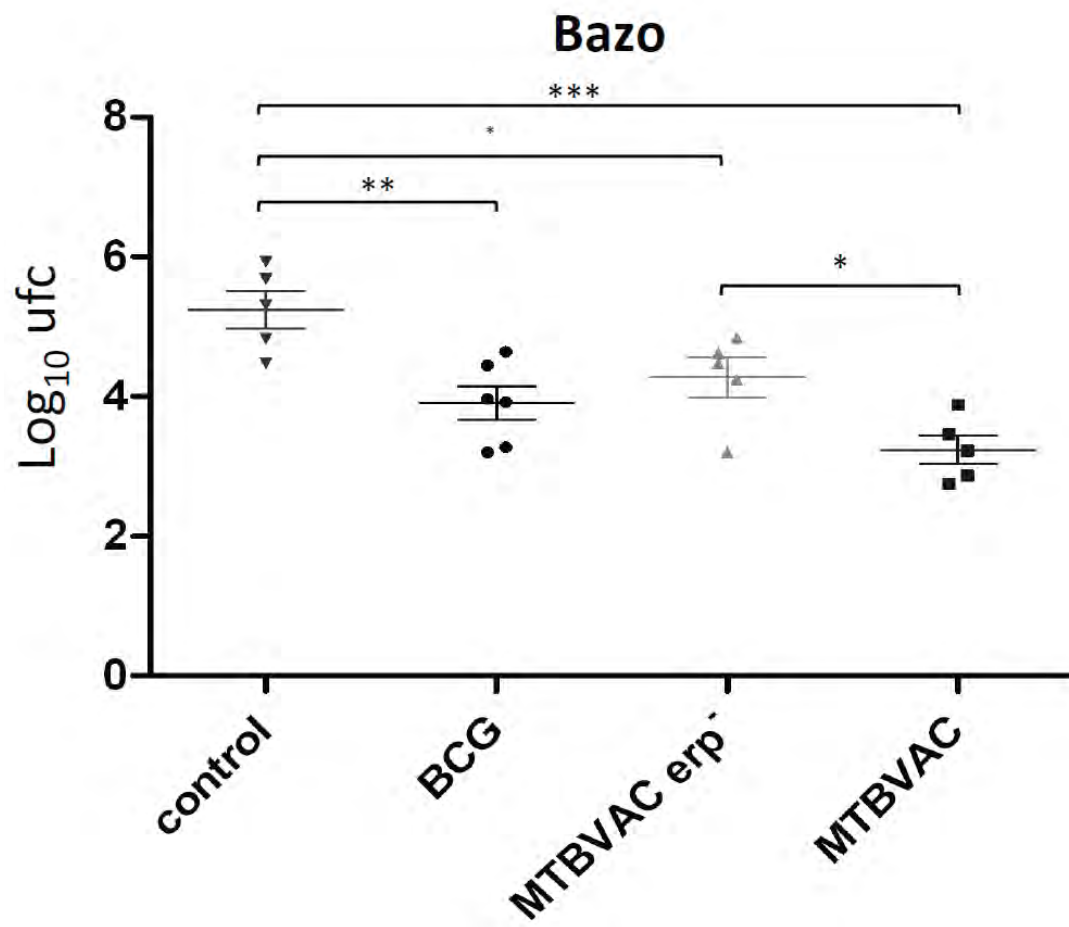


FIG. 4A

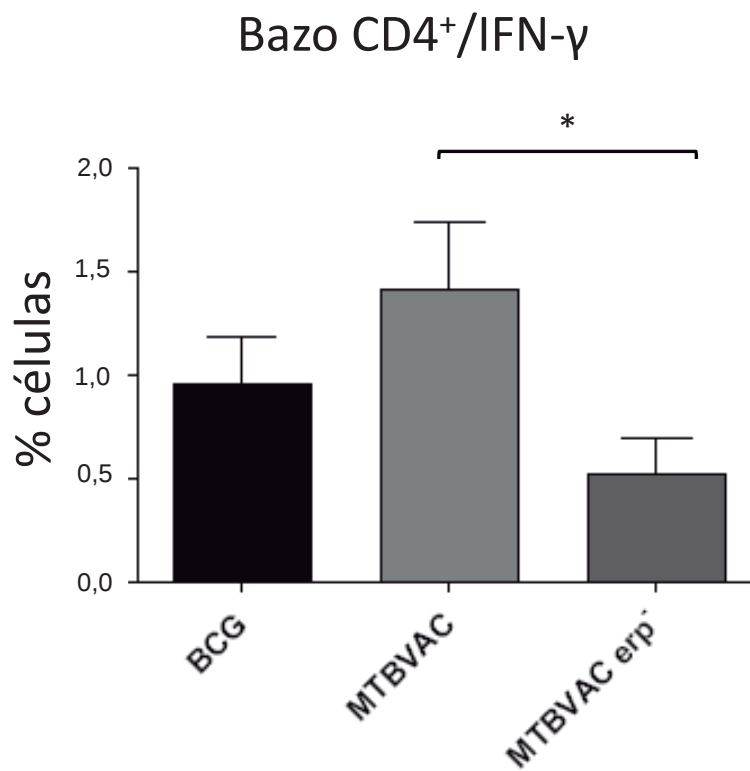


FIG. 4B

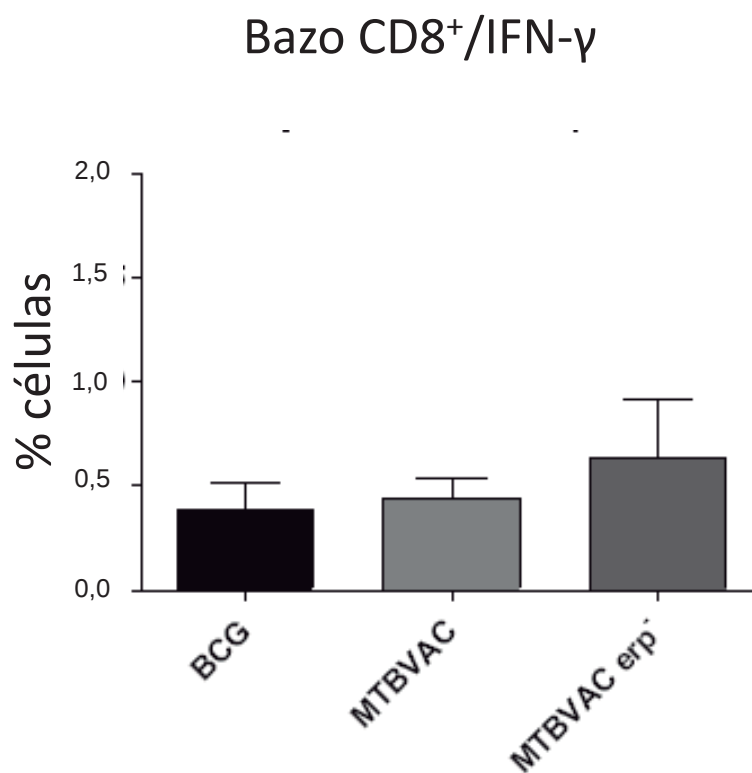


FIG. 4C

Pulmón CD4⁺/IFN- γ

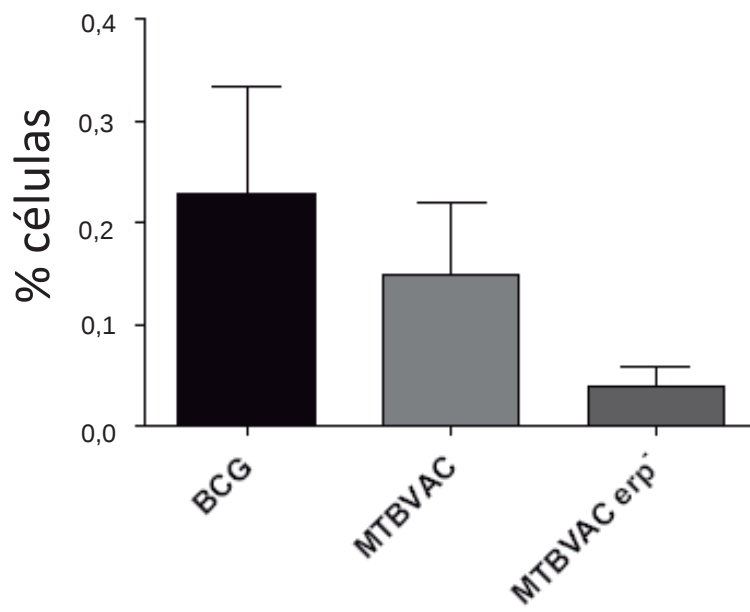
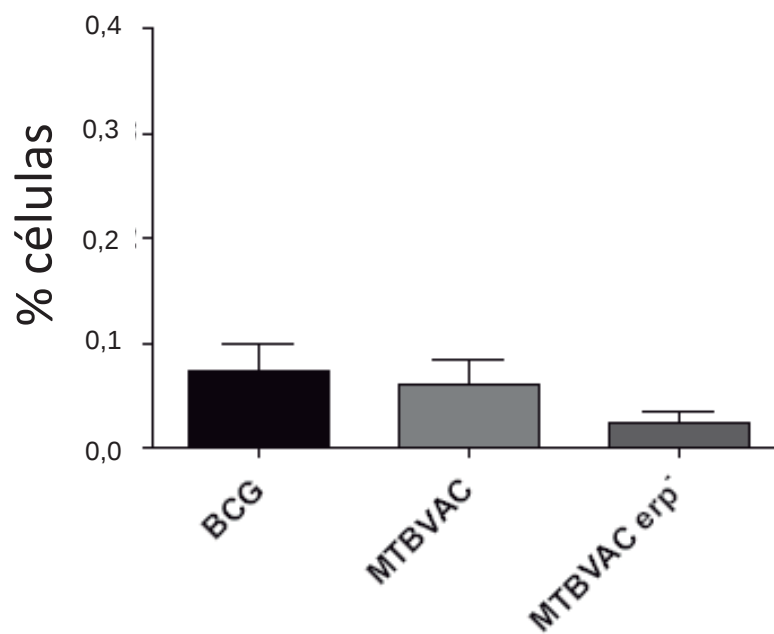


FIG. 4D

Pulmón CD8⁺/IFN- γ



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza

<120> Triple mutante del complejo Mycobacterium tuberculosis erp-,
phoP- y DIM-

<130> ES1510.109

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sentido erpF

<400> 1
agcgggccct cgatgcggtg gtcagc 26

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador antisentido erpRV

<400> 2
aaggggccca tactcgggtct gataccacgg 30

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador erpMUT1

<400> 3
acgtcgagat cgttgtagtt catcac 26

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador erpMUT2

<400> 4
ccaagttcca cggacccgt 19