

Jesus Gonzalo Asensio<sup>1</sup>  
Ainhoa Arbues<sup>1</sup>  
Dessi Marinova<sup>1</sup>  
Carlos Martín<sup>1</sup>

## Uma nova vacina viva contra a tuberculose com base na inativação do *phoP*

### *A new live tuberculosis vaccine based on *phoP* inactivation*

A BCG viva atenuada é a atual vacina contra a tuberculose (TB). Embora venha sendo usada há mais de 80 anos, esta vacina não é eficaz na proteção contra a TB pulmonar no adulto, sendo necessárias novas vacinas e novas estratégias de vacinação que ofereçam melhor proteção contra esta doença do que a vacina BCG existente. As vacinas vivas atenuadas estão entre as mais eficazes contra doenças infecciosas humanas devido à resposta imune alargada e de longa duração por elas induzida.

Na última década verificou-se um ressurgimento global de tuberculose, e as estratégias pioneiras para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes levaram à descoberta de subunidades de vacinas que provaram não oferecer melhor proteção do que a BCG em vários modelos animais, mas melhoravam a eficácia da BCG quando usadas numa estratégia de vacinação *prime-boost*. Formas diferentes de BCG *prime* e *boost* com estratégias de subunidades estão a ser utilizadas em ensaios clínicos, com o objetivo de melhorar a

The attenuated live BCG is the current vaccine against tuberculosis (TB). It has been used for more than 80 years but is ineffective at providing protection against adult pulmonary TB. New tuberculosis vaccine candidates and TB vaccination strategies conferring better protection against pulmonary tuberculosis than the current vaccine BCG are needed. Live attenuated vaccines are among the most effective vaccines against human infectious disease due to the broad and long-lived immune response they induce.

In the recent decade, a global pipeline of novel TB candidates has emerged. Pioneering strategies for the development of more effective vaccines today have led to the discovery of subunit vaccines, which have proved ineffective at providing better protection than BCG in various animal models, but could improve the efficacy of BCG used in a prime-boost strategy. Different heterologous prime BCG and boost with subunit strategies are in clinical trials with

<sup>1</sup> Department of Microbiology, University of Zaragoza. Spain  
<http://genmico.unizar.es>

eficácia da BCG. Mais recentemente, iniciaram-se ensaios clínicos com vacinas BCG recombinantes, com o intuito de encontrar candidatas para serem usadas como vacinas *prime* preventivas. Outra estratégia inovadora, as vacinas vivas baseadas no *Mycobacterium tuberculosis* racionalmente atenuado, são candidatas promissoras (algumas delas no fim da investigação pré-clínica), um novo instrumento substituto da BCG, com melhor eficácia protetora contra as formas pulmonares de TB.

Com base na observação de que a codificação pelo gene *phoP* do fator de transcrição PhoP é essencial para a virulência do *M. tuberculosis* (Perez *et al.*, 2001), atenuámos racionalmente o bacilo da TB por inativação do *phoP*. O mutante demonstrou forte atenuação em modelos celular e animal e resultou mais atenuado do que a BCG em ratinhos SCID imunocomprometidos (Martin *et al.*, 2006). A vacina candidata protegeu porquinhos-da-índia e primatas não humanos contra a infeção tuberculosa (Martin *et al.*, 2006, Verreck *et al.*, 2009).

Estudos moleculares recentes (Gonzalo Asensio *et al.*, 2008) demonstraram que o fator de transcrição *phoP* controla a expressão de aproximadamente 80 genes (muitos dos quais implicados na virulência do *M. tuberculosis*), responsável por cerca de 2% da *open reading frame* (ORF) no genoma do *M. tuberculosis*. Com base nestes estudos, pode pensar-se que o fenótipo atenuado e a imunidade protetora conferida pelo mutante *phoP* podem ser explicados pelo mecanismo de ação alterado do fator de transcrição *phoP*, conforme descrito e resumido na Fig. 1.

O mutante *phoP* diminui a regulação da biossíntese dos complexos lípidos da parede celular micobacteriana, incluindo a diacil-

the aim to improve efficacy of BCG. More recently, clinical trials with recombinant BCG vaccines have started with the aim to find candidates to be used as prime, preventive vaccines. Another innovative strategy, live vaccines based on rationally attenuated *Mycobacterium tuberculosis* are promising candidates (some of which in late preclinical investigation), is a promising new BCG-replacement tool with better protective efficacy against pulmonary forms of TB.

Based upon the observation that the *phoP* gene coding for the transcription factor *phoP* is essential for *M. tuberculosis* virulence (Perez *et al.*, 2001), we rationally attenuated the tubercle bacillus by inactivating *phoP*. The mutant demonstrated strong attenuation in cellular and animal models and resulted more attenuated than BCG in immunocompromised SCID mice (Martin *et al.*, 2006). The vaccine candidate protected guinea pigs and non-human primates against tuberculosis infection (Martin *et al.*, 2006, Verreck *et al.*, 2009).

Recent molecular studies (Gonzalo Asensio *et al.*, 2008) have demonstrated that *phoP* transcription factor controls the expression of approximately 80 genes (many of which implicated in *M. tuberculosis* virulence), accounting for about 2% of the open reading frame (ORF) in *M. tuberculosis* genome. Based on these studies it could be deduced that the attenuated phenotype and the protective immunity conferred by the *phoP* mutant can be explained by the altered mechanism of action of the transcription factor *phoP*, as described below and summarized in Fig. 1.

The *phoP* mutant decreases byosynthesis regulation of complex mycobacterial cell-wall lipids, including diacyltrehalose (DAT)

~2% ORF no genoma do *M. tuberculosis* sob controlo do *phoP* / ~2% ORFs in the *M. tuberculosis* genome under *phoP* control

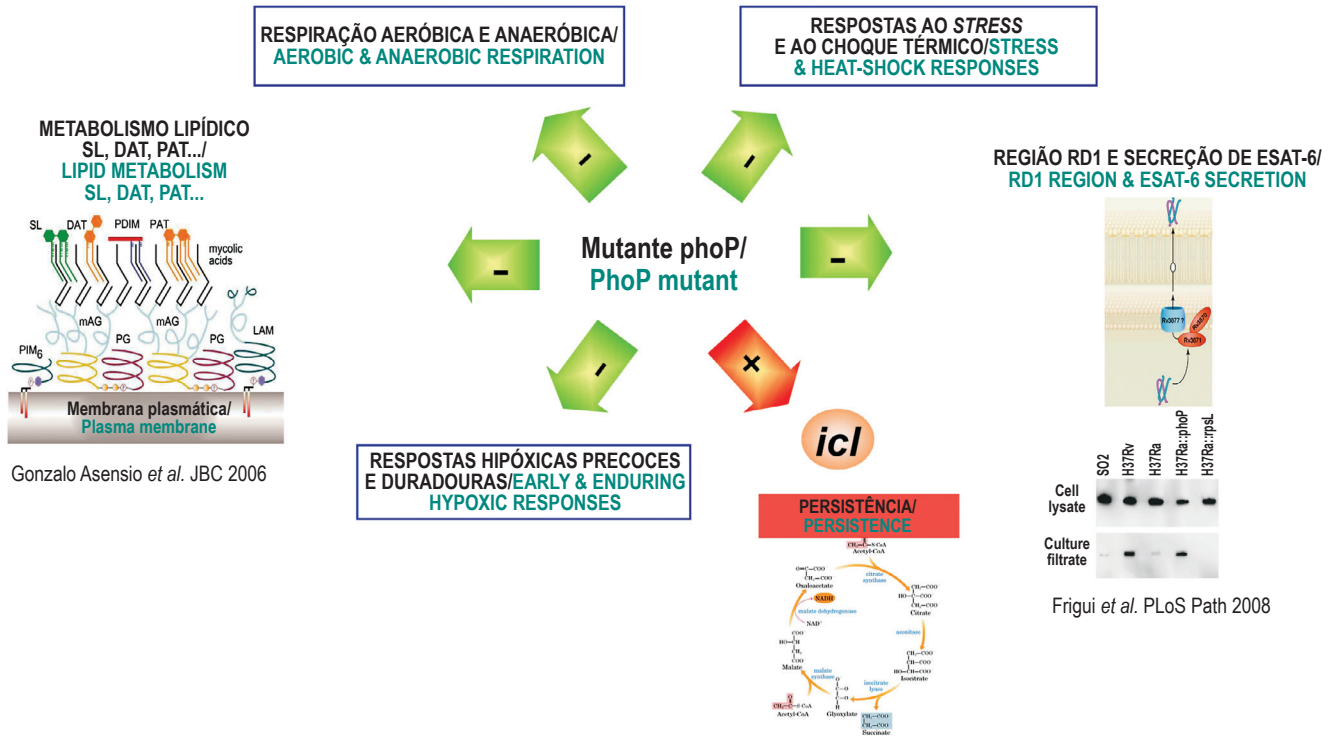


Fig. 1 – Estudos moleculares de vacina baseada em *phoP* (Gonzalo-Asensio, *et al.*, 2008)

Fig. 1 – Molecular studies of *phoP*-based vaccine (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008)

trealose (DAT) e poliactiltrealose (PAT) implicadas na imunomodulação do sistema imunológico hospedeiro (Saavedra R *et al.* 2005), não expressos pelo mutante *phoP* (Gonzalo Asensio *et al.* 2006).

Também se observou desregulação dos genes na região da diferença 1 (RD1) (Gonzalo Asensio *et al.*, 2008) necessária à virulência e à secreção de ESAT-6 no mutante *phoP*, quando comparado com a estirpe do tipo selvagem (Friguie *et al.*, 2008). A RD1 restringe-se às estirpes virulentas do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e perde-se por todas as subestirpes de BCG (Behr *et al.*, 1999, Pym *et al.*, 2003).

and polyacyltrehalose (PAT) implicated in immunomodulation of the host immune system (Saavedra R *et al* 2005), which are not expressed by the *phoP* mutant (Gonzalo Asensio *et al* 2006).

Down regulation of genes within the region of difference 1 (RD1) (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008) required for virulence and ESAT-6 secretion were also observed in the *phoP* mutant when compared to wild-type strain (Friguie *et al* 2008). RD1 is restricted to virulent *M. tuberculosis* complex (MTBC) strains and is lost by all BCG substrains (Behr *et al.*, 1999, Pym *et al.*, 2003).

O mutante *phoP* evidenciou regulação alterada e controlo de outras funções-chave necessárias à sobrevivência dos microrganismos na célula hospedeira. Como se mostra na Fig. 1, estas funções incluem respostas hipóxicas precoces e duradouras, respiração aeróbica e anaeróbica, respostas ao *stress* e ao choque térmico, metabolismo lipídico (normalmente desregulado na estirpe avirulenta H37Ra) e expressão do fator de persistência ICL, importante para a persistência intracelular do *M. tuberculosis* durante a infeção (Gonzalo Asensio *et al.*, 2008). O ICL é regulado positivamente no mutante *phoP* e esta característica poderia explicar o adequado estado de persistência, importante para a apresentação melhorada do antígeno pelo mutante durante a vacinação.

Estas observações foram usadas para construir uma nova geração duma vacina viva baseada na inativação do *phoP* com uma segunda mutação adicional que afecta a síntese duma nova família de lípidos associada à virulência da *M. tuberculosis* depois do consenso de Genebra sobre os passos essenciais para o desenvolvimento clínico de novas vacinas micobacterianas vivas atenuadas (Kamath *et al.*, 2005). O elemento final é a primeira candidata a vacina viva atenuada desenvolvida de acordo com o consenso e recomendações de Genebra para vacinas micobacterianas vivas, com o objectivo de a apresentar ao *Millennium Development Goal* no combate à TB. Ensaio pré-clínicos rigorosos feitos até à data com o protótipo da vacina viva baseada no *phoP* demonstraram a sua adequada atenuação, segurança, imunogenicidade e eficácia na protecção contra as formas respiratórias de TB em modelos animais (Perez *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2005, Martín *et al.*, 2006, Aguilar *et al.*, 2007, Cardona *et al.*, 2009, Verreck *et al.*, 2009).

The *phoP* mutant showed altered regulation and control of other key functions required for successful survival of the microorganism within the host cell. As illustrated in Figure 1, these functions include early and enduring hypoxic responses, aerobic and anaerobic respiration, stress and heat-shock responses, lipid metabolism (normally down regulated in the avirulent strain H37Ra), and expression of the persistence factor ICL, important for intracellular persistence of *M. tuberculosis* during infection (Gonzalo-Asensio *et al.* 2008). ICL is positively regulated in the *phoP* mutant and this characteristic could explain the adequate persistence state important for improved antigen presentation by the mutant during vaccination.

These observations were used to construct a new generation of a live vaccine based on *phoP* inactivation carrying a second additional mutation which affects the synthesis of a new family of lipids associated with *M. tuberculosis* virulence following the Geneva consensus on essential steps towards clinical development of new live attenuated mycobacterial vaccines (Kamath *et al.*, 2005). The final construct is the first live attenuated candidate vaccine developed according with and fulfilling the Geneva consensus requirements for live mycobacterial vaccines with the aim to deliver on the Millennium Development Goal to combat TB. Rigorous preclinical studies to date with the live *phoP*-based vaccine prototype have demonstrated proof of principle for adequate attenuation, safety, immunogenicity, and protective efficacy against respiratory forms of TB in stringent animal models (Perez *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2005, Martín *et al.*, 2006, Aguilar *et*

Os estudos moleculares com o mutante *phoP* ajudaram na compreensão do complexo *puzzle* por detrás do mecanismo de ação do fator de transcrição do *phoP* necessário à virulência, persistência e sobrevivência intracelular da estirpe do tipo selvagem durante a infeção, e cuja expressão alterada é provavelmente responsável pela adequada atenuação do fenótipo do protótipo da vacina. Além disso, a eliminação dos lípidos imunomoduladores extraíveis da parede celular (DAT e PAT) resultante da inativação do gene *phoP* e a deficiente síntese da complexa determinante da virulência e dos lípidos da parede celular PDIM (Camacho *et al.*, 1999, Cox *et al.*, 1999), devido à segunda mutação geneticamente conseguida no protótipo da vacina baseada no *phoP*, também contribuem para o fenótipo atenuado desta nova candidata.

Investigação atual de qualidade proporciona forte apoio científico a esta vacina de nova geração em franco progresso e em vias de ser clinicamente avaliada quanto à segurança e eficácia em seres humanos. Tendo em conta a falta de correlativos imunológicos de proteção, é indispensável realizar ensaios clínicos de fase 3 para conhecermos o valor real de qualquer nova vacina usada profilaticamente contra a TB.

A parceria *Stop TB* estima que pelo menos 20 vacinas candidatas deveriam iniciar os ensaios de segurança de fase I antes de 2015, com o propósito de conseguir o licenciamento para uma vacina eficaz contra a TB (Young, Dye, 2006). A descoberta e utilização de uma nova vacina contra a TB que ofereça melhor proteção contra as formas pulmonares da doença do que a atual BCG é crucial para alcançar o objetivo de erradicar a tuberculose até 2050.

*al.*, 2007, Cardona *et al.*, 2009, Verreck *et al.*, 2009).

The molecular studies with the *phoP* mutant have helped begin to understand the intricate puzzle behind the mechanism of action of the PhoP transcription factor required for virulence, persistence and intracellular survival of the wild-type strain during infection and whose altered expression probably accounts for the adequate attenuation phenotype of the prototype vaccine. Moreover, elimination of the extractable immunomodulatory cell-wall lipids (DAT and PAT) as a result of the targeted inactivation of the *phoP* gene, and the impaired synthesis of the complex virulence determinant and cell-wall lipid PDIM (Camacho *et al.*, 1999, Cox *et al.*, 1999) due to the second genetically engineered mutation in the prototype *phoP*-based vaccine further contribute to the attenuated phenotype of this novel candidate.

Strong to date research provides robust scientific support adducing this new generation vaccine well-advanced to progress from research to development and be clinically evaluated for vaccine safety and efficacy for the first time in human. Moreover, considering the lack of immunological correlates of protection, Phase 3 clinical trials are indispensable to tell us the real value of any new vaccine used as a prophylactic tool against TB.

Stop TB partnership estimate that at least 20 vaccine candidates should enter phase I safety trials before 2015 with the goal to reach an effective licensed vaccine against TB (Young and Dye, 2006). The discovery and use of a new TB vaccine that confers improved protection against pulmonary forms of TB than the current BCG is key to reach the 2050 objective of TB eradication.



## Bibliografia/Bibliography

- Aguilar D, Infante E, Martin C, Gormley E, Gicquel B, Hernandez Pando R. Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 330-338.
- Asensio JA, Arbues A, Perez E, Gicquel B, Martin C. Live tuberculosis vaccines based on phoP mutants: a step towards clinical trials. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8:201-211.
- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999; 34: 257-267.
- Cardona PJ, Asensio JG, Arbues A, Otal I, Lafoz C, Gil O, Caceres N, Ausina V, Gicquel B, Martin C. Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on phoP mutant. *Vaccine* 2009; 27: 2499-2505.
- Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999; 402: 79-83.
- Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, Garnier T, Gicquel B, Martin C, Leclerc C, Cole ST, Brosch R. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog* 2008; 4: e33.
- Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, Winter N, Daffe M, Gicquel B, Martin C, Jackson M. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2006; 281: 1313-1316.
- Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernandez-Pando R, Thole J, Behr M, Gicquel B, Martin C. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS ONE* 2008; 3: e3496.
- Kamath AT, Fruth U, Brennan MJ, Dobbelaer R, Hubrechts P, Ho MM, Mayner RE, Thole J, Walker KB, Liu M, Lambert PH. New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine* 2005; 23: 3753-3761.
- Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, Soto CY, Clark SO, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B. The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* 2006; 24: 3408-3419.
- Perez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 2001; 41: 179-187.
- Saavedra R, Segura E, Tenorio EP, López-Marín LM. Mycobacterial trehalos-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells. *Micr Inf* 2006; 8:533-540.
- Verreck FA, Vervenne RA, Kondova I, van Kralingen KW, Remarque EJ, Braskamp G, van der Werff NM, Kersbergen A, Ottenhoff TH, Heidt PJ, Gilbert SC, Gicquel B, Hill AV, Martin C, McShane H, Thomas AW. MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, phoP deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS One* 2009; 4: e5264.
- Williams A, Hatch GJ, Clark SO, Gooch KE, Hatch KA, Hall GA, Huygen K, Ottenhoff TH, Franken KL, Andersen P, Doherty TM, Kaufmann SH, Grode L, Seiler P, Martin C, Gicquel B, Cole ST, Brodin P, Pym AS, Dalemans W, Cohen J, Lobet Y, Goonetilleke N, McShane H, Hill A, Parish T, Smith D, Stoker NG, Lowrie DB, Kallenius G, Svenson S, Pawlowski A, Blake K, Marsh PD. Evaluation of vaccines in the EU TB vaccine cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; 85: 29-38.
- Young D, Dye C. The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell* 2006; 124: 683-687.