(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 839**

(21) Número de solicitud: 200702057

(51) Int. Cl.:
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación: **24.07.2007**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2009**

Fecha de la concesión: **16.06.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **08.07.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **08.07.2010**

(73) Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid**
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Domínguez Bernal, Gustavo;**
Bartolomé Avarza, Almira;
Tierrez Martínez, Alberto;
Martínez Pulgarín, Susana;
Orden Gutiérrez, José Antonio y
Fuente López, Ricardo de la

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis como vacuna y vehículo vacunal para el ganado porcino.**

(57) Resumen:
Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis como vacuna y vehículo vacunal para el ganado porcino. La presente invención proporciona una nueva cepa vacunal viva y atenuada, incapaz de producir el factor alternativo sigma (RpoS) y que, además, funciona como vehículo vacunal de antigenos heterólogos. La construcción de la cepa se ha realizado mediante la deleción en fase de la totalidad del gen que codifica el factor alternativo sigma, *rpoS*, mediante doble recombinación homóloga. La cepa es avirulenta, genéticamente estable, sin marcadores de resistencia antibiótica y se diferencia fácilmente de las cepas silvestres.

ES 2 323 839 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis como vacuna y vehículo vacunal para el ganado porcino.

Campo técnico

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Sanidad Animal. De forma más concreta, la invención se refiere a la producción de una cepa viva de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (*S. choleraesuis*) atenuada mediante la deleción de un gen, genéticamente estable y sin marcadores de resistencia a antibióticos. Constituye una nueva cepa vacunal frente a salmonelosis en porcino y un nuevo vehículo vacunal frente a enfermedades del cerdo.

Estado de la técnica

Salmonella es un patógeno intracelular que puede ocasionar gastroenteritis, fiebre entérica o bacteriemia tanto en animales como en el hombre. Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos móviles, Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentran filogenéticamente próximas a los géneros *Escherichia, Shigella* y *Citrobacter*.

En cuanto a su taxonomía, es importante destacar la falta de unanimidad a la hora de denominar a las especies de *Salmonella* y la notable confusión existente con los nombres *S. choleraesuis* y *S. enterica*.

En 1980 se aprobó el nombre de *S. choleraesuis* como único nombre de especie y con varias subespecies; por otro lado, en 1987, se propuso que la única especie del género se llamara *S. enterica* por ser *S. choleraesuis* un término confuso al pertenecer también a uno de los numerosos serovares que integran el género *Salmonella*; al mismo tiempo, otros autores reconocían varias especies, y entre ellas *S. choleraesuis*, mientras que, en 2000, la única especie de *Salmonella* reconocida por el Código Bacteriológico era *S. choleraesuis*. En resumen, ha habido durante mucho tiempo una propuesta acorde al Código Bacteriológico que iba cayendo en desuso (*S. choleraesuis*); y una propuesta ilegítima que se iba utilizando cada vez más (*S. enterica*).

Por fin, en 2005, la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas decidió que el género *Salmonella* está formado por tres especies: *S. enterica, S. bongori* y *S. subterranea*, y entre los numerosos serovares de la especie *S. enterica*, se encuentra *S. enterica* serovar Choleraesuis (Tindall, *et al*., 2005, *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 521-4; Shelobolina, *et al.*, 2004, *Appl Environ Microbiol*, **70**: 2959-65; Euzéby, 2005, *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 547-9).

Debido a esta confusión, muchos de los documentos anteriores a 2005 en los que se cita a *S. choleraesuis* no se refieren a este serovar en concreto sino a la especie tipo tal y como se denominaba anteriormente y que ahora es *S. enterica*.

El tipo de enfermedad causada por *Salmonella* depende del serovar y del hospedador implicados, por lo que una clasificación práctica de serovares se basa en su espectro de hospedador. Siguiendo este criterio, los serovares de *Salmonella* se dividen en tres grupos: de hospedador restringido, se asocian casi exclusivamente con un hospedador concreto (como Typhi -humanos-, Abortusequi -caballos-, o Abortusovis -ovejas-); adaptados a un hospedador, se asocian principalmente con una especie aunque también pueden causar enfermedades en otras (como Dublin -ganado vacuno- y Choleraesuis -cerdos-); de hospedador no restringido, son ubicuos (como Typhimurium y Enteritidis) y pueden causar enfermedades en una amplia gama de hospedadores no relacionados.

La salmonelosis es una de las enfermedades entéricas y septicémicas con mayor importancia económica para la industria porcina y el serovar más frecuentemente aislado a partir de los animales afectados es Choleraesuis. La preocupación generalizada de las diversas administraciones por la elevada prevalencia de *Salmonella* en el sector porcino ha originado el establecimiento de una directiva europea (2003/99/CE) que obliga a este sector a aplicar medidas de vigilancia epidemiológica para controlar las infecciones por *Salmonella* a partir de enero de 2007.

Actualmente, existe una cepa vacunal frente a esta enfermedad, carente del plásmido de virulencia, (Enterisol SC-54) comercializada por Boehringer Ingelheim (patente US5436001) cuya utilización ha sido aprobada en EEUU y Alemania, pero no en otros países, como Taiwán, donde la incidencia de *S. choleraesuis* es enorme y no se ha aprobado el uso de la vacuna por problemas de seguridad (Ku, *et al*., 2005, *Infect Immun*, **73**: 8194-203).

Debido, fundamentalmente, a la posibilidad de trabajar con el ratón como modelo experimental sencillo y económico, gran parte de los trabajos realizados en cuanto a la atenuación de las cepas de *Salmonella* se han basado en el serovar Typhimurium. Sin embargo, los expertos están de acuerdo en que los factores de virulencia no se pueden extrapolar de un serovar a otro y, mucho menos, de un hospedador a otro. Por eso, recientemente, se han abierto líneas de investigación que han dado lugar a cepas vacunales contra *Salmonella* para cerdos basadas en genes metabólicos (Kelly, *et al*., 1992, *Infect Immun*, **60**: 4881-90) o a mutantes atenuados afectados en genes esenciales para la persistencia de Choleraesuis en cerdo (Ku, *et al*., 2005, *Infect Immun*, **73**: 8194-203).

Por otro lado, se han utilizado bacterias invasivas vivas como vehículos vacunales de expresión de antígenos heterólogos (es decir, de antígenos procedentes de otros organismos) y entre las bacterias utilizadas se encuentran algunos casos del género *Salmonella* (Daudel, *et al*., 2007, *Expert Rev Vaccines*, **6**: 97-110). Así, en la solicitud de patente US20030170211-A1, entre otras bacterias, se utiliza una cepa de *S. typhi* como sistema de liberación de ADN de alphavirus en células animales; la patente US5877159-A1 presenta bacterias invasivas vivas para expresar genes heterólogos en células animales mediante un casete de expresión eucariota y, entre las posibles bacterias invasivas, nombra a *Salmonella*; la patente US6764687-B1 se refiere a bacterias vivas atenuadas como vacunas que también pueden ser portadoras de genes heterólogos, construidas mediante la mutación del gen *cra* y, por lo tanto, por interferencia en el metabolismo de los carbohidratos, tanto de *Escherichia* como de *Salmonella*; en CN1730650 se describe una vacuna viva recombinante contra el virus de la fiebre aftosa construida en *S. choleraesuis*; US6905691-B1 hace referencia a bacterias atenuadas mediante la mutación del gen *surA*, acompañada o no de la mutación en otro gen, utilizadas como vacunas o como vehículos de expresión de antígenos heterólogos y, especialmente, de un fragmento de la toxina tetánica; WO9011687 se refiere a mutantes de *Salmonella* en el gen *phoP* o en el gen *phoP* y, simultáneamente, en los genes *cya* y *crp* que se emplean como vacunas o bien como portadores de antígenos de otros microorganismos patógenos.

Tanto la vacuna como el vehículo vacunal ideal deberían ser seguros, fuertemente inmunogénicos, bien caracterizados genéticamente y estables. Existe una necesidad urgente de desarrollar cepas que funcionen como vehículos vacunales, que ofrezcan un excelente perfil de seguridad y que sean capaces de estimular una respuesta celular efectiva.

Descripción de la invención

Un aspecto de esta invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis construida mediante la mutación del regulador RpoS. Se considera cepa viva atenuada aquella estirpe que mantiene su capacidad de invadir y multiplicarse en el interior de su hospedador, pero sin desarrollar el cuadro patogénico. La nueva cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia) donde le ha sido asignado el número de depósito 7268. Se ha utilizado *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (según la nomenclatura vigente desde 2005) por ser un serovar que está especialmente adaptado al ganado porcino. Por comodidad, a partir de aquí la nombraremos como *S. choleraesuis*.

Si bien los mutantes en *rpoS* de *S. typhimurium* y de *S. typhi* son menos virulentos para el ratón y el hombre, respectivamente (Rychlik and Barrow, 2005, *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 1021-40; Robbe-Saule, *et al*., 1995, *FEMS Microbiol Lett*, **126**: 171-6), también se ha descrito, en ensayos de inhibición competitiva, cómo la deleción del gen *rpoS* en *S. typhimurium* y *S. enteritidis* no modifica la virulencia de las cepas en pollos (Rychlik and Barrow, 2005, *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 1021-40). Por otro lado, se ha demostrado que cepas atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Typhi por modificación de uno o más genes, con fenotipo RpoS+ son prometedoras como vacunas y vehículos vacunales porque el fenotipo RpoS+ incrementa su poder inmunogénico (US7083794-B2). Queda claro, por lo tanto, que el comportamiento de los mutantes en *rpoS* de *Salmonella* depende del serovar y del hospedador estudiados. En el área que nos ocupa, es fundamental trabajar con cepas específicas para el cerdo.

La estrategia elegida para la construcción del mutante se basa en la deleción en fase de la totalidad del gen que codifica el regulador RpoS, *rpoS*, mediante doble recombinación homóloga.

Con el mutante CECT 7268 se aprovechan las especiales propiedades de adaptación al hospedador natural (cerdo) de *S. choleraesuis* para ser utilizada como vehículo de antígenos heterólogos dirigidos a esta especie animal y como vacuna frente a la salmonelosis del cerdo. Esta cepa prolifera en fibroblastos y sobrevive en macrófagos viables, células obtenidas a partir de la lámina propia del intestino delgado del cerdo y que constituyen la vía normal de entrada en el hospedador natural de *S. choleraesuis*.

La construcción del mutante CECT 7268 nos ha permitido desarrollar un nuevo concepto de atenuación de la virulencia de *Salmonella*. Así, empleando cultivos celulares primarios de cerdo normalmente no permisivos para el crecimiento de *S. choleraesuis* (fibroblastos de la lámina propia intestinal) la cepa construida presenta un fenotipo de proliferación elevado en células viables, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre e incluso con una vacuna viva atenuada comercial (SC-54). Además, sobrevive en cultivos de macrófagos primarios obtenidos de la lámina propia de la mucosa intestinal, a diferencia de lo que ocurre con la cepa viva atenuada comercial que es eliminada. Ambos resultados aseguran una mayor y más prolongada estimulación de la respuesta inmune.

El método utilizado para realizar esta invención cumple los requerimientos indispensables de seguridad biológica en cuanto a vacunas de nueva generación. Por un lado, asegura la estabilidad de la mutación puesto que la reversión al fenotipo silvestre está totalmente impedida debido a la ausencia de dianas requeridas para la recombinación homóloga o ilegítima a partir de poblaciones naturales de bacterias. Por otro lado, la cepa construida carece de marcadores de resistencia a antibióticos.

La avirulencia de esta cepa evidencia su empleo como cepa vacunal. Por lo tanto, un aspecto de esta invención incluye un kit de vacunación para cerdos contra las enfermedades infecciosas producidas por *S. choleraesuis*, que comprende los elementos y adyuvantes necesarios para contener y vehicular la cepa vacunal. Además, para el control veterinario de la salmonelosis, es importante poder diferenciar la cepa vacunal de las cepas silvestres. Por ello, otro

aspecto de esta invención se refiere a la identificación de la cepa mutante mediante una sencilla reacción de PCR utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias adyacentes al gen *rpoS*, como pueden ser los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4.

Otra aplicación de esta invención consiste en la utilización de la cepa atenuada como vector vacunal de expresión o transporte de antígenos heterólogos favorecido por su mayor persistencia en células del sistema inmune junto a su mayor persistencia en el interior de fibroblastos con respecto a las cepas silvestres de *S. choleraesuis*. Tal y como ocurre en el caso del uso de la cepa CECT 7268 como cepa vacunal, en su aplicación como vehículo vacunal puede diferenciarse de las cepas silvestres de *S. cholerasuis* mediante la técnica de la PCR utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias adyacentes al gen *rpoS*; en este caso también pueden utilizarse los oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 como cebadores de la reacción.

Descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompañan una serie de figuras. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Muestra el esquema de la construcción de la cepa mutante CECT 7268 según se describe en el ejemplo 1.

Figura 2. Supervivencia intracelular de *S. choleraesuis* CECT 7268 en cultivos primarios de macrófagos obtenidos a partir de la lámina propia del intestino delgado porcino, tal y como se describe en el ejemplo 4.

Figura 3. Proliferación intracelular de la cepa silvestre parental de *S. choleraesuis* (en barras negras), y *S. choleraesuis* CECT 7268 (en barras blancas) en cultivos primarios de fibroblastos obtenidos a partir de la lámina propia del intestino delgado porcino (SIF). Se representa el número de bacterias intracelulares en el interior de SIFs a las 2 horas (panel A) y a las 24 horas (panel B) postinfección. Se describe en el ejemplo 5.

Modo de realización de la invención

Las cepas de *S. choleraesuis* empleadas se cultivaron rutinariamente a 37ºC con agitación en medio LB (Luria-Bertani). Las cepas transformadas con plásmidos termosensibles se incubaron a 30ºC para evitar la pérdida del plásmido. Los medios se complementaron con kanamicina (30 μg/ml) o ampicilina (50 μg/ml) cuando fue necesario. Para obtener medio sólido se añadió agar (15 g/l).

Se utilizó *S. choleraesuis* CECT 915 (en adelante, WT) como cepa silvestre para construir la cepa mutante.

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

Construcción de un mutante por deleción del gen rpoS de S. choleraesuis

Para la construcción de las cepas vacunales, se optimizó para *Salmonella choleraesuis* (CECT 915) el método previamente descrito para *Escherichia coli* y *S. typhimurium* (Datsenko and Wanner, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 6640-5). En la figura 1 se representa el esquema de la construcción de la cepa mutante. Las secuencias empleadas como moldes en el diseño de los oligonucleótidos utilizados para delecionar *rpoS* se obtuvieron a partir de la secuencia completa del genoma de *S. choleraesuis*. En la figura 1, los números 1, 2, 3, y 4 se corresponden con la nomenclatura de los oligonucleótidos utilizados en esta invención y descritos en SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4, respectivamente, que se representan con flechas en la figura 1.

Cada uno de los cebadores de la pareja de oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 1 y 2 se encuentra integrado por un tándem formado por: (i) secuencias (destacadas en gris) homólogas a la región que flanquea en el extremo 5' (oligonucleótido 1) y en el extremo 3' (oligonucleótido 2) a *rpoS* (flecha gris marcada con *rpoS* en la figura 1); (ii) junto a secuencias (destacadas en negro) que hibridan con el plásmido pKD4 en la región que flanquea el extremo 5' (oligonucleótido 1) y el extremo 3' (oligonucleótido 3) del gen de resistencia a kanamicina. Este plásmido codifica un casete de resistencia a kanamicina (rectángulo negro marcado con *km* en la figura 1) flanqueado por secuencias repetidas denominadas FRT (marcadas en blanco en los extremos del casete de kanamicina en la figura 1). pKD4 se utilizó como DNA molde de una PCR en la que se utilizaron los oligonucleótidos 1 y 2 como cebadores y en la que se amplificó un fragmento de 1,6 kb, en cuyos extremos se encontraban las secuencias homólogas a las regiones flanqueantes al gen *rpoS* que portaban los propios cebadores 1 y 2 en uno de sus extremos. Este fragmento de PCR fue introducido mediante electroporación en la cepa WT de *S. choleraesuis* en la que previamente se había introducido, también por electroporación, el plásmido termosensible pKD46, que porta el sistema λRed que permite la recombinación homóloga del fragmento de PCR con el DNA cromosómico. A continuación se seleccionaron las colonias en las que se había producido el fenómeno de recombinación y que, por lo tanto, habían incorporado el marcador de re-

sistencia a antibiótico y habían sido capaces de crecer en un medio con kanamicina 30 μg/ml. Posteriormente, fueron analizadas con los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 para determinar si se había producido la recombinación en el lugar adecuado. Estos cebadores se diseñaron basándose en la secuencia de las regiones flanqueantes a *rpoS* (el gen *nlpD* para el diseño de SEQ ID NO: 3 y el gen *SC2853* para el diseño de SEQ ID NO: 4).

Finalmente, el gen de resistencia antibiótica fue eliminado del cromosoma mediante la flipasa codificada en el plásmido termosensible pCP20. Este plásmido recombinante se introdujo en *S. choleraesuis* mediante electroporación. Las bacterias transformadas, seleccionadas en medio con Ampicilina 50 μg/ml, se incubaron a 30ºC en presencia de ampicilina hasta la fase estacionaria de crecimiento. A continuación se elevó la temperatura a 43ºC durante 24 horas para evitar la multiplicación del plásmido y permitir su curación, es decir, su eliminación de las bacterias. Por último se confirmó la desaparición del casete de resistencia a kanamicina y la deleción del gen *rpoS* mediante PCR utilizando los cebadores flanqueantes, descritos en SEQ ID NO 3 y 4 (señalados como 3 y 4 en la figura 1), obteniendo así la cepa CECT 7268 de *S. choleraesuis*.

Ejemplo 2

Valoración de la atenuación en el modelo murino de infección experimental

Con el fin de evaluar el efecto en la virulencia del mutante construido y compararlo con la cepa silvestre parental WT y la cepa atenuada comercial SC-54, se estimó el denominado índice de competición (CI) tras inocular ratones BALE/c por vía intraperitoneal (ip) con una mezcla bacteriana de la cepa cuya virulencia queríamos analizar y de la cepa silvestre o control. El CI es la relación entre el número de bacterias de cada una de las dos cepas obtenidos tras la infección (*output*), previa normalización con el número de bacterias del inóculo (*input*): $(\mathbf{M}_o/\mathbf{W}_o)/(\mathbf{M}_i/\mathbf{W}_i)$, donde **M** es el número de bacterias de la cepa mutante, **W** es el número de bacterias de la cepa parental, **o** es el recuento del número de bacterias del *output* e **i** es el recuento de las bacterias del *input*. Un mutante se considera atenuado empleando este índice si el valor de CI es < 0,4.

CECT 7268, la cepa silvestre y SC-54 se cultivaron durante 18-20 horas en medio LB a 37ºC sin agitación. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS estéril y se resuspendieron en 5 ml de PBS estéril para obtener las dosis de inoculación que se ajustaron mediante diluciones seriadas siguiendo la relación 1 DO_{600} equivale a 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Las dosis utilizadas oscilaron entre $1x10^6$ ufc para WT y SC-54 y $1x10^7$ ufc en el caso de CECT 7268. La cantidad de ufc de los inóculos se confirmó mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LB y reacciones de PCR a partir de las colonias obtenidas, utilizando los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 de manera que en el caso de las cepas WT y SC-54 se obtenía una banda de 2610 pares de bases y en la cepa mutante CECT 7268, que tiene delecionado el gen *rpoS*, la banda era de 1618 pares de bases. Para el ensayo se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, que se dispusieron en grupos de 3 animales cada uno y a los que se suministró agua y comida *ad libitum* bajo condiciones normales de luz y temperatura. Se comparó el mutante CECT 7268 por un lado con la cepa silvestre (WT) y por otro con la cepa comercial SC-54. Los animales se inocularon intraperitonealmente con 0,2 ml de las suspensiones bacterianas con las dosis ajustadas según se acaba de describir. Los ratones fueron sacrificados y necropsiados a las 72 horas o en estado moribundo. Se extrajeron asépticamente muestras de bazo e hígado para determinar el contenido exacto de las 2 cepas en cada animal. Para ello se realizaron PCRs, a partir de las colonias obtenidas, utilizando los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 tal y como se acaba de describir para los inóculos. Se calculó el CI en la colonización de los órganos siguiendo la fórmula descrita anteriormente. Los datos obtenidos indicaron que CECT 7268 presentaba un alto grado de atenuación con respecto a su cepa parental silvestre (véase tabla 1). Además, CECT 7268 presentó una significativa reducción de la virulencia con respecto a la cepa viva atenuada comercial SC-54.

TABLA 1

Índice de competición en ratones BALB/c

Cepas comparadas	**CI[1]**	
	Medias (± ES)[2]	**Atenuación**
rpoS versus WT	0.0028 (± 0.0016)	Sí
rpoS versus SC-54	0.018 (± 0.010)	Sí

[1]únicamente se tuvieron en cuenta los animales que se encontraban en estado moribundo. Los datos de CI < 0,4 indican atenuación
[2]ES: error estándar

Ejemplo 3

Valoración de la atenuación de CECT 7268 en el hospedador natural, el cerdo

Una vez comprobada la drástica atenuación en el modelo murino, profundizamos en el análisis de la virulencia realizando ensayos en el modelo porcino mediante infecciones mixtas por vía oral entre la cepa silvestre, CECT 7268 y la vacuna viva atenuada comercial (SC-54), calculando los niveles de competición en la colonización de los nódulos linfáticos mesentéricos mediante el cálculo del índice de competición (CI) tal y como se ha detallado en el ejemplo 2 para el ratón. Para ello, se inocularon oralmente 3 cerdos cruces de *Landrace* con *Large White* de entre 5 y 6 semanas de edad. Los animales se agruparon aleatoriamente en cuatro lotes de 3 animales cada uno. Los cerdos se inocularon por vía oral; dos lotes con una mezcla de CECT 7268/WT y otros dos lotes con CECT 7268/SC-54 con dosis de 10^8 ufc (WT y SC-54) y 10^9 ufc (CECT 7268). Los animales fueron eutanasiados a los 3 días post-inoculación. Tras la necropsia, se extrajeron asépticamente muestras de nódulos linfáticos mesentéricos para hacer recuento de la cantidad de bacterias recuperadas en cada ensayo para cada cepa utilizando, como en el ejemplo 2, los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 en reacciones de PCR. Los datos de CI obtenidos, mostrados en la Tabla 2, confirman una extraordinaria atenuación en la virulencia de CECT 7268 con respecto a su cepa silvestre parental en el hospedador al que *S. choleraesuis* está adaptado, el cerdo.

TABLA 2

Índice de competición en nódulos mesentéricos de lechones

Cepas comparadas	**CI[1]**	
	Medias (± ES[2])	**Atenuación**
CECT 7268 *versus* WT	0,022 (± 0,006)	Sí
CECT 7268 *versus* SC-54	1,31(± 1,5)	No

[1]Los datos de CI < 0,4 indican atenuación

[2]ES: error estándar

Ejemplo 4

Ensayos de supervivencia intracelular en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM)

Para determinar si la deleción del gen *rpos* afecta a la supervivencia intracelular de *S. choleraesuis*, se realizaron estudios de supervivencia intracelular en cultivos primarios de macrófagos extraídos a partir de la lámina propia del intestino delgado de lechones. Los macrófagos constituyen una de las piezas esenciales de la inmunidad innata, y participan activamente en la presentación de antígenos para inducir una inmunidad adquirida satisfactoria.

Las líneas celulares de macrófagos estables resultan más permisivas a la proliferación intracelular de *Salmonella* que los cultivos primarios, no obstante, con el fin de reproducir de una forma más fiable lo que puede ocurrir *in vivo*, decidimos obtener cultivos primarios de la lámina propia del intestino delgado de lechones que se expandieron hasta conseguir un cultivo primario.

Para examinar el comportamiento de las cepas atenuadas en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM) de la lámina propia se realizó un ensayo de protección a gentamicina, en el que los macrófagos se mantuvieron con *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) al que se añadió un 10% de suero fetal bovino, 2% de L-Glutamina, 2,5% HEPES y 1% de PenicilinalEstreptomicina/Fungizona Mix (Biowhittaker), realizando las incubaciones a 37ºC con un 5% de CO_2. La cepa silvestre WT, el mutante CECT 7268, así como la cepa vacunal comercial SC-54, se cultivaron durante 18-20 horas en medio LB a 37ºC sin agitación. Se determinó la concentración de los inóculos bacterianos sembrando diluciones seriadas en placas de LB. Los ensayos de invasión, proliferación y supervivencia intracelular se realizaron en placas de 24 pocillos. Se inocularon los pocillos con una M.O.I. (multiplicidad de infección bacterias: células eucariotas) de 10:1. A continuación, las placas se incubaron durante 30 minutos a 37ºC con 5% de CO_2. Tras esta incubación, se retiró el medio, se lavaron las células tres veces con PBS estéril y se añadió medio de cultivo de macrófagos suplementado con 100 μg/ml de gentamicina a cada pocillo para destruir las bacterias extracelulares. Después de la incubación con gentamicina durante 1 hora y media, (2 horas después de la infección), se retiró el medio y se sustituyó por medio con 10 μg de gentamicina/ml y se mantuvieron incubándose 24 horas más. En aquellos tiempos en los que se necesitaba realizar un recuento del número de bacterias intracelulares (al cabo de las 2 ó 24 horas posinfección), se realizaron tres lavados con PBS estéril y se lisaron las células añadiendo Tritón x-100 al 1% en PBS estéril. Se hicieron diluciones seriadas de los lisados y se sembraron en placas de LB para hacer el recuento de ufc.

La tasa de crecimiento o supervivencia de la bacteria en el interior de estas células se expresó como "índice de proliferación" (Ipro), que se calculó como el cociente del número de bacterias intracelulares a las 24 y 2 horas postinfección. En la figura 2 se representa el Ipro de la cepa silvestre (WT), su mutante en *rpoS*, CECT 7268, y la cepa vacunal SC-54 en el interior de cultivos primarios de macrófagos intestinales de lechón (SIM). En el eje de ordenadas se representa el valor de Ipro que resulta de calcular el cociente entre el número de bacterias viables a las 24 y a las 2 horas postinfección más-menos su error estándar (± ES). Los valores mostrados son la media y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independiente. En el eje de abscisas se representan los valores de la cepa silvestre WT (2,1 ± 1,3), el mutante CECT 7268 (3,8 ± 1,5) y SC-54 (0,2 ± 0,4). La comparación de los valores de Ipro de las tres estirpes, mostró que la tasa de crecimiento intracelular del mutante CECT 7268 era ligeramente superior a la de la estirpe silvestre WT (figura 2) y, especialmente destacable, que las dos cepas lograron sobrevivir e incluso proliferar en macrófagos extraídos de la lámina propia intestinal mientras que la cepa vacunal comercial SC-54 es prácticamente eliminada al cabo de las 24 horas postinfección (figura 2).

Ejemplo 5

Ensayos de proliferación intracelular en cultivos primarios de fibroblastos intestinales porcinos (SIF)

Hasta hace poco tiempo, los fibroblastos eran considerados una población homogénea de células con las únicas funciones de prestar un soporte estructural a los tejidos y de reparación de lesiones tisulares. Sin embargo, en la actualidad se sabe que los fibroblastos constituyen una población heterogénea formada por distintas subpoblaciones que intervienen en procesos tan variados como la organogénesis, el control de la motilidad intestinal o la respuesta inmune. Los fibroblastos participan activamente en la generación de la respuesta inflamatoria aguda y en su transición hacia la respuesta inmune adquirida. La abundancia de fibroblastos en la zona de entrada de *Salmonella* y su función moduladora de la respuesta inmune, sumado a la capacidad de *Salmonella* para infectar fibroblastos *in vitro*, muestran la importancia de estas células en la infección natural por *Salmonella*.

La capacidad de las estirpes para proliferar en el interior de estos fibroblastos en cultivo primario se examinó mediante un ensayo de protección a gentamicina tal y como se describe en el ejemplo 4. La tasa de crecimiento de la bacteria en el interior de estas células no se pudo expresar como "índice de proliferación" (Ipro) calculado como se describe anteriormente en el caso de los macrófagos (recuento bacteriológico en medios de cultivo) porque comprobamos que existía un porcentaje de células muertas en las que las bacterias crecían considerablemente y que enmascaraba el comportamiento de lo que ocurría en las células vivas que son las que interesan como dianas de los vehículos vacunales. Con estos precedentes se decidió determinar de forma más precisa el número de bacterias en el interior de células vivas individuales a las 2 y 24 horas postinfección (p.i.) mediante observación microscópica de 100 células infectadas de tres experimentos independientes. Las bacterias se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se realizaron los cultivos celulares sobre lentillas de 11 mm antes de las infecciones, posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehido al 3% y permeabilizadas con saponina al 0,2% según protocolos estándares. Para detectar *Salmonella* se utilizaron anticuerpos primarios policlonares de conejo anti-LPS (Lipopolisacarido) (Difco) y anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con isotiocianato de fluoresceina (FITC; Sigma, Chemicon, Alexa 488 - verde- y alexa 594 -rojo-; Molecular Probes). Finalmente se usó DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; 1 μg/ml) para teñir los núcleos celulares. En la figura 3 se muestra el porcentaje de células infectadas que contenían un número bajo ≤5, medio 6-20, ó elevado >20, de bacterias (en negro se representa WT; y en blanco, CECT 7268) a las 2 horas postinfección (p.i.) (panel A) y a las 24 horas p.i (panel B) en tres experimentos independientes. Las gráficas reflejan en ordenadas la media ± el error estándar (ES) del porcentaje de células que estaban infectadas con diversos intervalos de número de bacterias (1-5, 6-20, >20).

En la infección con la cepa silvestre WT, casi la totalidad de las células infectadas (95,1%) contenían 1-5 bacterias a las 2 horas p.i, y un pequeño porcentaje (4,9%) 6-20 bacterias (figura 3A). A las 24 horas p.i., la proporción de células infectadas con bajo número de bacterias (1-5) disminuyó hasta el 63,1%, aumentando el número de células que presentaban un número medio de bacterias intracelulares (6-20) (24,2%) y apareciendo un pequeño porcentaje de células con un elevado número de bacterias (12,7%) (figura 3B). Cuando se analizó la población de células infectadas con el mutante CECT 7268 a las 2 horas p.i., la mayoría (71,9%) presentaron 1-5 bacterias en su interior. Sin embargo, a las 24 horas p.i., un gran número de estas células (79,9%) presentaban más de 20 bacterias intracelulares (figura 3B). Estas bacterias se alojaban en grandes vacuolas.

Finalmente, en cuanto a la cepa vacunal comercial SC-54, no se pudieron encontrar células vivas infectadas tras 24 horas p.i, incluso a las 2 horas p.i. el número de células infectadas era muy reducido y todas ellas presentaban un número entre 1-5 de bacterias.

REIVINDICACIONES

1. Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis **caracterizada** porque carece de la actividad del regulador RpoS.

2. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 1, **caracterizada** por la deleción del gen *rpoS* que codifica el regulador RpoS.

3. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 2, **caracterizada** porque la deleción del gen *rpoS* es una deleción en fase.

4. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 3, **caracterizada** porque la deleción en fase del gen *rpoS* se realiza mediante una estrategia que evita la reversión de la cepa mutada al fenotipo silvestre.

5. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 4, **caracterizada** porque la estrategia elegida para evitar la reversión de la cepa mutada al fenotipo silvestre es la doble recombinación homóloga.

6. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizada** porque la deleción de *rpoS* no deja en la bacteria marcadores de selección por resistencia a antibióticos.

7. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque presenta mayor supervivencia en cultivos primarios de macrófagos de cerdo que la cepa parental.

8. Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque presenta mayor capacidad de proliferación en fibroblastos de lámina propia intestinal de cerdo que la cepa parental.

9. Aislado biológicamente puro de la cepa de *S. enterica* serovar Choleraesuis depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número 7268.

10. Uso de una cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 9, como vacuna frente a enfermedades infecciosas producidas por *S. enterica* serovar Choleraesuis en el cerdo.

11. Kit de vacunación para cerdos contra las enfermedades infecciosas producidas por *S. enterica* serovar Choleraesuis que comprenda un contenedor que incluya una cepa viva atenuada como la descrita en las reivindicaciones 1 a 9.

12. Uso de una cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 9, como vehículo vacunal de antígenos heterólogos.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12, **caracterizado** porque la diferenciación entre la cepa viva atenuada y las cepas silvestres de *S. enterica* serovar Choleraesuis se realiza mediante cebadores diseñados en las regiones adyacentes a la secuencia del gen *rpoS* de *S. enterica* serovar Choleraesuis quedando limitadas dichas regiones adyacentes, respectivamente, por los genes *nlpD* y *SC2853*, ambos inclusive.

14. Uso según la reivindicación 13, **caracterizado** porque los cebadores utilizados son los descritos en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, **caracterizado** porque la técnica utilizada para la diferenciación entre la cepa viva atenuada y las cepas silvestres de *S. enterica* serovar Choleraesuis es la técnica de la PCR.

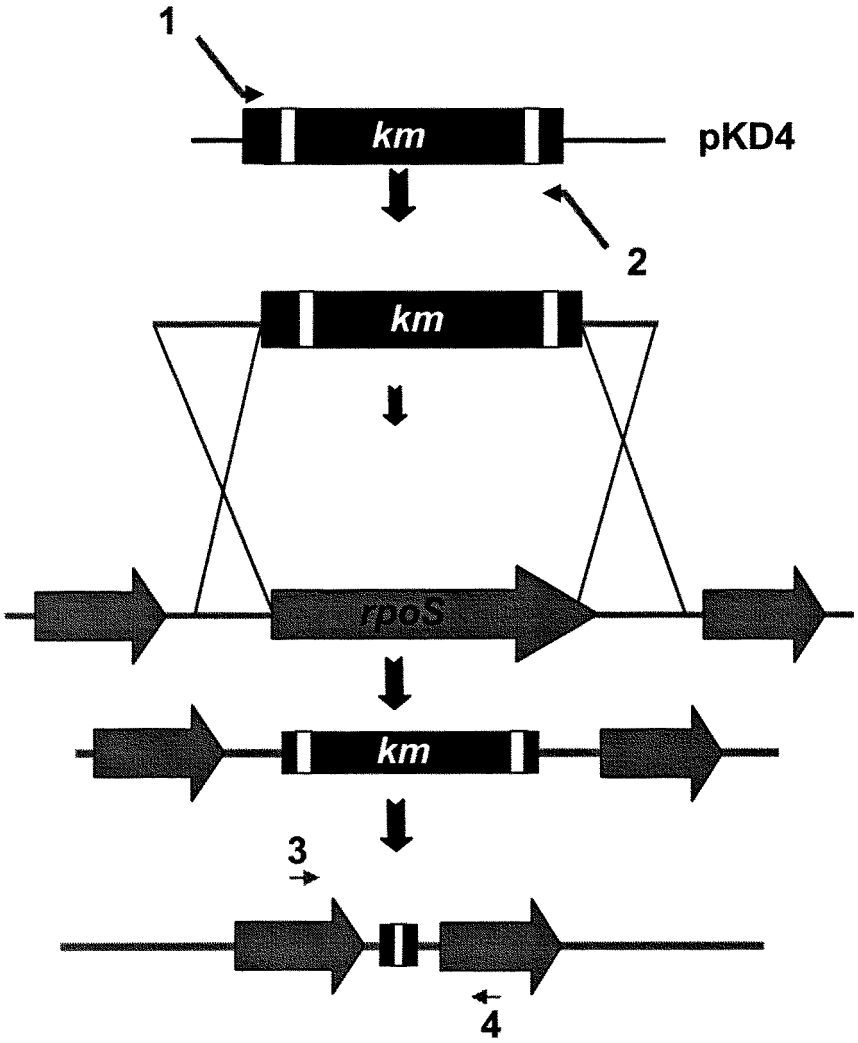


Fig. 1

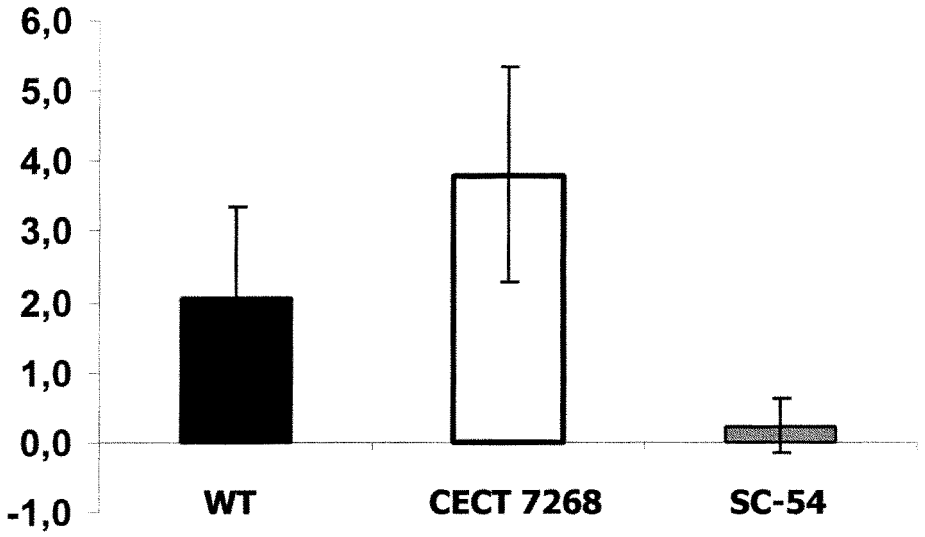
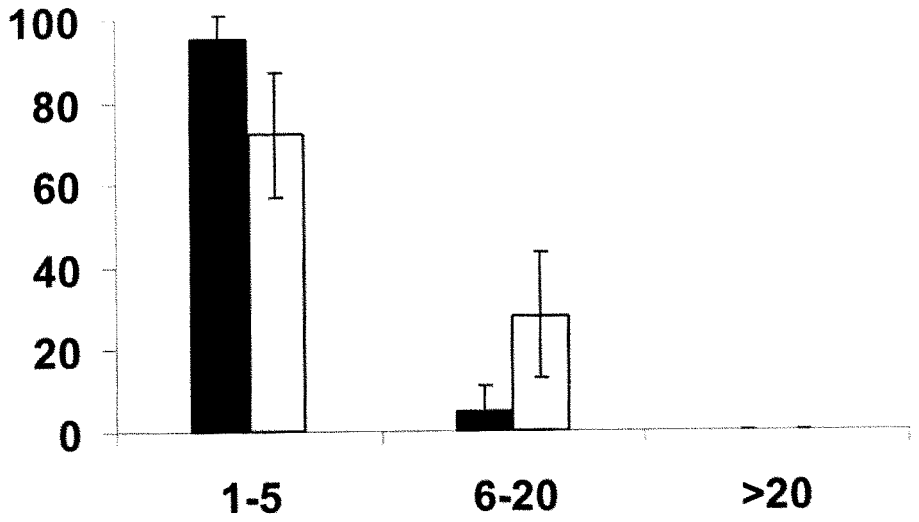


Fig. 2

A



B

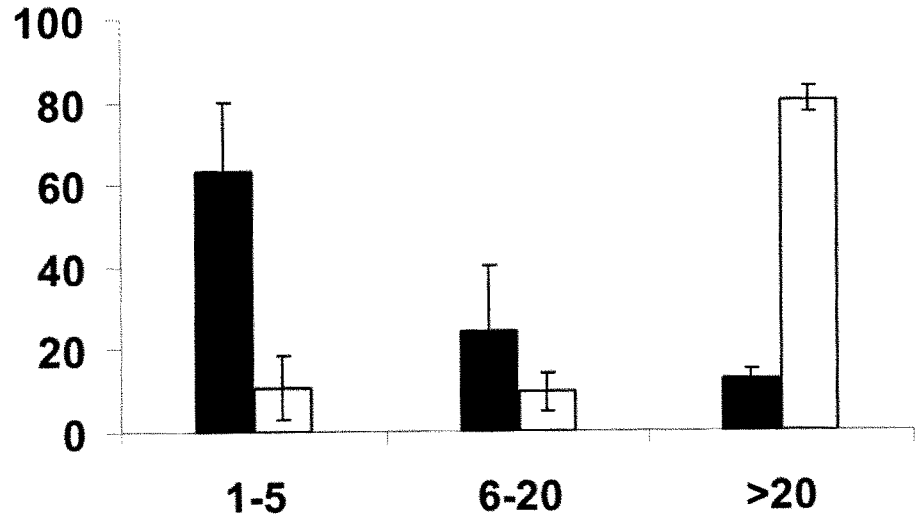


Fig. 3

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 323 839

(21) Nº de solicitud: 200702057

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **24.07.2007**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KU Y-W. et al. Novel Attenuated Salmonella enterica Serovar Choleraesuis Strains as Live Vaccine Candidates Generated by Signature-Tagged Mutagenesis. Infection and Immunity. 2005, Vol 73(12), páginas 8194-8203. Especialmente, página 8194, resumen; columna 1, párrafo 1 - columna 2, párrafo 3; página 8195, columna 1, párrafos 1-2; página 8198, columna 2 - página 8199, columna 1; página 8201, columna 1, párrafo 2 - columna 2, párrafo 1.	1-8
A		9-15
Y	METHNER et al. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of Salmonella phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. Veterinary Microbiology. 2004, Vol 98, páginas 37-43. Especialmente, página 37, resumen; página 38, columna 1, párrafos 1-3; página 41, columna 1, párrafo 2.	1-8
A	NICKERSON Ch A. & CURTISS III R. Role of Sigma Factor RpoS in Initial Stages of Salmonella typhimurium Infection. Infection and Immunity. 1997, Vol 65(5), páginas 1814-1823. Especialmente, página 1814, resumen.	1-15
A	US 7083794 B2 (CURTISS III R et al). 01.08.2006, página 3, columna 3, línea 10 - columna 4, línea 43.	1-15
A	WO 2007053489 A2 (UNIVERSITY OF MARILAND, [US/US]). 10.05.2007, página 1, párrafo 03 - página 2, párrafo 08; página 4, párrafos 20-23.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
07.07.2009	Mª D. García Grávalos	1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-15	**SÍ**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva	Reivindicaciones	9-15	**SÍ**
(Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial.** Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KU Y-W. et al. Infection and Immunity. 2005, Vol 73(12), páginas 8194-8203.	2005
D02	METHNER U. et al. Veterinary Microbiology. 2004, Vol 98, páginas 37-43.	2004
D03	NICKERSON Ch A. & CURTISS III R. Infection and Immunity. 1997, Vol 65(5), páginas 1814-1823.	1997
D04	US 7083794 B2	01.08.2006
D05	WO 2007/053489 A2	10.05.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una cepa viva atenuada de Salmonella enterica serovar Choleraesuis, incapaz de producir el factor alternativo sigma (RpoS), obtenida mediante deleción en fase, por doble recombinación homóloga, de la totalidad del gen que codifica para el factor RpoS. La cepa conseguida es avirulenta, genéticamente estable, no lleva marcadores de resistencia a antibióticos, además de proliferar en fibroblastos y sobrevivir en macrófagos viables (reivindicaciones 1-8). Se refiere a una cepa de Salmonella enterica serovar Choleraesuis, obtenida por el solicitante y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito 7268 (reivindicación 9), así como su uso como vector vacunal de expresión o transporte de antígenos heterólogos y en un kit de vacunación para cerdos (reivindicaciones 10-12), diferenciando esta cepa de la silvestre por una reacción PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos definidos como SEQ ID NO: 3-4 (reivindicaciones 13-15)

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1- 15

El documento D01 se considera el documento más cercano al Estado de la Técnica, anticipando cepas atenuadas, mutantes de Salmonella enterica serovar Choleraesuis para su posible uso como vacunas frente a enfermedades infecciosas producidas por este microorganismo en el ganado porcino. En este documento, se seleccionan cinco cepas mutantes, muy atenuadas, para evaluar su potencial como vacunas vivas, en cerdos, comparándolas con vacunas comerciales. Los resultados muestran que estas vacunas proporcionan más protección frente a la enfermedad que las comerciales convencionales (ver página 8194, resumen, columna 1, párrafo 1- columna 2, párrafo 3; página 8195, columna 1 párrafos 1-2; página 8198, columna 2 - página 8199, columna 1; página 8201, columna 1, párrafo 2 - columna 2, párrafo 1)

Aunque el documento D01 anticipa cepas atenuadas, mutantes de Salmonella enterica serovar Choleraesuis para uso como vacuna en ganado porcino, sin embargo en este documento no se hace ninguna referencia al uso del gen rpoS para obtener dichas cepas.

En consecuencia, en base a lo divulgado en D01, las reivindicaciones 1-15 de la solicitud cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-15

El objeto de las reivindicaciones 1-8 de la solicitud es una cepa viva atenuada, avirulenta y estable de Salmonella enterica serovar Choleraesuis, obtenida mediante deleción en fase de la totalidad del gen que codifica para el factor RpoS. La diferencia entre el documento D01 y el objeto de estas reivindicaciones radica en el uso del gen rpoS para obtener una cepa viva atenuada de Salmonella enterica serovar Choleraesuis.

Hoja adicional

El documento D02 se refiere a vacunas vivas, constituidas por cepas atenuadas, mutantes de Salmonella thyphimurium y enteritidis, que portan una deleción de los genes phoP y rpoS, bien individual o en combinación con ompC. Aunque los mutantes que portan la deleción del gen rpoS son muy virulentos en casos de pollos pequeños e inducen signos de morbilidad severa, sin embargo en ratones muestran una virulencia muy reducida, posiblemente debido a que este factor es requerido para el desarrollo de la virulencia de Salmonella en estos animales (ver página 37, resumen; página 38, columna 1, párrafos 1-3; página 41, columna 1, párrafo 2)

Por lo tanto, según lo divulgado en el documento D01 en combinación con el D02, el uso del gen rpoS, para obtener una cepa viva atenuada de Salmonella enterica serovar Choleraesuis para uso como vacuna en infecciones producidas, por esta variedad de Salmonella, en el ganado porcino, es una alternativa tal que un experto en la materia la tendría en consideración sin esfuerzo inventivo.

En consecuencia, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-8 de la solicitud, carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones 9-12, 14, 15 cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

El documento D03 se refiere al factor alternativo sigma (RpoS) como regulador de la virulencia en Salmonella, mediante el control de expresión de los genes de virulencia plasmídicos (spv), afectando los primeros estadios del proceso de infección en Salmonella typhimurium (ver página 1814, resumen)

El documento D04 divulga una bacteria inmunogénica, atenuada, de Salmonella enterica serotipo Typhi, con fenotipo RpoS+ y una mutación que produce inactivación en uno o más genes responsables de la atenuación del microorganismo, al tiempo que un gen recombinante que hace que se exprese la proteína deseada. La cepa de Salmonella obtenida es inmunogénica y puede ser empleada para vacunas o vehículo de genes o sus productos (ver página 3, columna 3, línea 10 - columna 4, línea 43)

El documento D05 divulga una cepa viva, atenuada, de Salmonella paratyphi, que contiene al menos una mutación seleccionada entre los genes guaA, guaB, clpP y/o clpX , que reduce o bloquea el nivel de expresión de dichos genes, además de su uso en una composición farmacéutica capaz de inducir una respuesta inmune a la cepa seleccionada de este microorganismo (ver página 1, párrafo 03 - página 2, párrafo 08; página 4, párrafos 20-23)

Los documentos D03-D05, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.