



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 358 595**

⑤① Int. Cl.:  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **04786594 .4**  
⑨⑥ Fecha de presentación : **26.08.2004**  
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1660121**  
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

⑤④ Título: **Vacunas de bacterias vivas atenuadas.**

③⑩ Prioridad: **29.08.2003 US 498988 P**  
**29.08.2003 US 498961 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.05.2011**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.05.2011**

⑦③ Titular/es: **The Board of Governors for Higher Education, State of Rhode Island and Providence Plantations University of Rhode Island**  
**70 Lower College Road**  
**Kingston, Rhode Island 02881, US**

⑦② Inventor/es: **Cohen, Paul, S.**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 358 595 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a bacterias vivas atenuadas para su uso en un medicamento, a vacunas basadas en dichas bacterias útiles para la prevención de patogénesis microbiana, al uso de bacterias vivas atenuadas para la preparación de dichas vacunas y a métodos para la preparación de dichas vacunas.

5 La inmunidad frente a patogénesis microbiana es un medio por el cual un animal de sangre caliente evita la patogénesis o padece un estado patogénico menos intenso. La inmunidad completa frente a un determinado patógeno conduce a morbilidad y mortalidad en una población expuesta a un patógeno. Esto generalmente coincide con que las vacunas basadas en microorganismos vivos pero atenuados (vacunas vivas atenuadas) inducen un tipo de respuesta inmunitaria altamente eficaz. Dichas vacunas tienen la ventaja de que, una vez vacunado el animal hospedador, la entrada del patógeno microbiano en el hospedador induce un recuerdo acelerado temprano de inmunidad humoral o mediada por células que puede controlar el crecimiento adicional del organismo antes de que la infección pueda adquirir proporciones clínicamente significativas. Generalmente se admite que las vacunas basadas en un patógeno inactivado (vacuna inactivada) no pueden conseguir este tipo de respuesta. Sin embargo, a diferencia de las vacunas inactivadas, las vacunas que contienen un patógeno vivo presentan, dependiendo del nivel de atenuación, el riesgo de que el huésped vacunado después de la vacunación pueda contraer la enfermedad contra la cual se desea la protección.

10 Las vacunas contra bacterias que pertenecen a las familias estrechamente relacionadas de *Escherichia* y *Salmonella* siguen las reglas generales proporcionadas anteriormente. Muchos miembros de estas familias de bacterias son patógenos debido al hecho de que infectan el tracto digestivo y la vejiga. El efecto patógeno de estas bacterias está estrechamente relacionado con su capacidad para colonizar las capas mucosas del tracto digestivo y la vejiga. Este es el fenómeno de colonización que conduce a la presencia prolongada del patógeno en el tracto digestivo y/o en la vejiga y a un contacto muy estrecho del patógeno con las capas mucosas, lo que también puede conducir a la invasión de otros tejidos. Por lo tanto, al mismo tiempo, paradójicamente, esto se debe al hecho de que estas bacterias colonizan el tracto digestivo y la vejiga, y por lo tanto al mismo tiempo producen enfermedades, que el sistema inmunitario desencadena para desarrollar un determinado nivel de respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria se desarrolla claramente demasiado tarde para suprimir el efecto patógeno de la bacteria colonizadora.

15 Por lo tanto sería deseable disponer de una vacuna que poseyera las cualidades inmunizadoras de un microorganismo vivo pero que no fuera capaz de causar efectos secundarios indeseables después de la vacunación.

20 Sin embargo, para las vacunas vivas atenuadas existe la siguiente paradoja: una estrategia para atenuar bacterias es la eliminación de uno o más factores de virulencia. En la mayoría de los casos sin embargo, los factores de virulencia también desempeñan un papel induciendo la inmunidad. En estos casos, la supresión de los factores de virulencia deteriora inevitablemente las capacidades inmunogénicas de la bacteria. Esta es por supuesto una situación no deseada. Una vacuna viva debe conservar preferiblemente el complemento antigénico de la cepa de tipo silvestre, sin ser virulenta.

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una vacuna viva atenuada que no posea los diversos inconvenientes mencionados anteriormente.

30 Las bacterias de las familias *Escherichia* y *Salmonella* tienen diversos factores de virulencia. Un ejemplo de un solo gen implicado en la síntesis de muchos factores de virulencia, incluyendo los que desempeñan una función en la colonización de *Escherichia* y de *Salmonella*, es el gen que codifica *LeuX*. Este gen codifica un ARNt específico: ARNt<sub>5<sup>Leu</sup></sub>. La SEC ID N° 1 proporciona la secuencia de un gen *leuX* de *Salmonella typhimurium*.

35 *LeuX* y su función en la colonización y síntesis de fimbrias se ha descrito entre otros por Newman et al. (*Microbial Pathogenesis* 17: 301-311 (1994)) and by Collighan, R.J. and Woodward M.J. (*Vet. Microbiol.* 80: 235-245 (2001))

40 Ritter et al., en *Mol. Microbiol* 17: 109-121 (1995) han analizado cuidadosamente las diversas funciones del producto del gen *LeuX* en la virulencia. Demostraron que la presencia de *LeuX* es crucial para la estimulación de la síntesis de fimbrias de tipo 1 y flagelos, ambos implicados en la movilidad y colonización y que es crucial para la síntesis de proteínas implicadas en la captación del hierro, para la síntesis de enterobactina y para la virulencia *in vitro* (véase también la solicitud de patente europea EP 1 074 266 y Ritter et al., in *Mol. Microbiol* 25: 871-882, 1997).

45 Se sabe que todas estas características contribuyen fuertemente a la virulencia. Por lo tanto, son al mismo tiempo las dianas más importantes para una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria contra fimbrias y flagelos debe interferir con la colonización y movilidad, mientras que una respuesta inmunitaria contra enterobactina y proteínas implicadas en la captación del hierro bloquearía los efectos tóxicos y privaría a la bacteria de la posibilidad para obtener hierro esencial respectivamente.

50 Por lo tanto, desde el punto de vista de una vacuna, los factores de virulencia clave de elección presentes en una vacuna deben ser los factores de virulencia expresados en presencia de *LeuX*. Por lo tanto, la vacuna de elección sería (preferiblemente) una vacuna subunitaria que comprenda fimbrias de tipo 1, flagelos, enterobactina y proteínas implicadas en la captación del hierro. Dicha vacuna sería, en primer lugar, inocua y en segundo lugar induciría más probablemente inmunidad contra estos 4 factores de virulencia y de este modo proporcionaría protección contra la infección.

Las cepas vivas atenuadas a partir de las cuales se deleta el gen LeuX, no fabrican los factores de virulencia mencionados anteriormente. Si fueran a usarse mutantes de delección LeuX negativos en una vacuna, estos no inducirían protección contra estos factores de virulencia más cruciales: fimbrias, de tipo 1, flagelos, enterobactina y proteínas implicadas en la captación del hierro.

5 Teniendo esto en cuenta, se considera que LeuX es un candidato poco atractivo para la delección en una cepa de vacuna viva atenuada.

10 Además, las bacterias que no tienen capacidades de colonización (debido a la ausencia de fimbrias de tipo 1 y flagelos) como sería el caso de los mutantes de delección LeuX-negativos no sería de esperar que se pusieran en estrecho contacto con las células hospedadoras y por consiguiente se supone que se destruirían rápidamente. Por lo tanto, no se esperaría incluso que indujesen ninguna inmunidad sustancial contra estos factores de virulencia que aún estuviesen presentes en ausencia del producto del gen LeuX.

15 Sin embargo, de manera sorprendente, ahora se ha descubierto que las cepas bacterianas, tanto de la familia de *Escherichia* como *Salmonella*, no tienen un  $ARNt_5^{leu}$  funcional y que son muy capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra bacterias virulentas de tipo silvestre en un animal hospedador. Esto es de hecho contra todas las expectativas, ya que no inducen ninguna inmunidad contra los factores de virulencia clave mencionados anteriormente.

Por lo tanto, una primera realización de la presente invención se refiere a bacterias vivas atenuadas que no tienen  $ARNt_5^{leu}$  funcional, para su uso en una vacuna.

20 Dobrindt U., et al., (FEMS Microbiology letters 162: 135-141 (1998)) han confirmado que el  $ARNt_5^{leu}$  codificado por LeuX es en efecto el responsable, por ejemplo, de la supervivencia de una *E. coli* uropatógena en el mucus de vejiga de ratón y no la presencia de las islas de patogenicidad como tal. Estas islas de patogenicidad son las regiones que codifican, por ejemplo hemolisinas, adhesinas fimbriales y demás.

25 Debido a su posición clave en la patogenicidad bacteriana, el gen  $ARNt_5^{leu}$  y su producto génico  $ARNt_5^{leu}$  están ampliamente difundidos en el reino bacteriano. El  $ARNt_5^{leu}$  está muy conservado. Puede encontrarse, por ejemplo, en las especies de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, tales como del serotipo *typhimurium*, *enteritidis*, *galinarum* y *dublin* y en especies de *Yersinia* tales como *Y. pestis*.

30 Entre otros, Thorbjarnardottir, S. et al. (J. Bacteriology 161: 219-222 (1985)), Yoshimura, M. et al. (J. Mol. Biol. 177: 627-644 (1984)), Andersson, S. et al. (Microbial Review 54: 198-210 (1990)), Komine, Y. et al., (J. Mol. Biol. 212: 579-598 (1990)) y Blum, G. et al. (Infect. & Immun. 62: 606-614 (1994)), describen el propio gen y su secuencia de nucleótidos completa en *Salmonella* y en *Escherichia*.

Se sabe que un  $ARNt_5^{leu}$  funcional es un  $ARNt_5^{leu}$  que tiene las características del  $ARNt_5^{leu}$  de tipo silvestre, es decir: si el codón que codifica a la leucina es UUG, puede añadir el aminoácido leucina a una cadena de proteína durante su síntesis. Por lo tanto, se considera que un  $ARNt_5^{leu}$  no funcional es un  $ARNt_5^{leu}$  que es defectuoso en al menos esta función.

35 Las bacterias vivas atenuadas de acuerdo con la invención también pueden obtenerse introduciendo una mutación en el gen LeuX que impida la síntesis del  $ARNt_5^{leu}$  funcional.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención se refiere a bacterias vivas atenuadas que no poseen un  $ARNt_5^{leu}$  funcional como resultado de una mutación en el gen *leuX*, para su uso en una vacuna.

40 Dicha mutación puede ser una inserción, una delección, una sustitución o una combinación de las mismas, siempre que la mutación conduzca a un fallo para expresar un  $ARNt_5^{leu}$  funcional.

Las bacterias vivas atenuadas para su uso de acuerdo con la invención pueden obtenerse de diversas maneras. Una posible manera para obtener dichas bacterias es mediante métodos clásicos tales como el tratamiento de bacterias de tipo silvestre que tienen el gen  $ARNt_5^{leu}$  con agentes mutagénicos tales como análogos de bases, tratamiento con luz ultravioleta o tratamiento térmico.

45 Las cepas de acuerdo con la invención pueden seleccionarse fácilmente sobre la base de que carecieran de al menos los cuatro factores de virulencia mencionados anteriormente.

Sin embargo, la naturaleza de la mutación producida por técnicas de mutación clásicas sería desconocida. Esta puede ser una mutación puntual en el gen LeuX que eventualmente puede, aunque es poco probable que esto suceda, invertirse al tipo silvestre.

50 Para evitar este pequeño riesgo, la mutagénesis con transposones sería una buena alternativa. La mutagénesis por mutagénesis con transposones, es también una técnica de mutagénesis bien conocida en la materia. Esta es una mutación que se realiza en un sitio localizado en el cromosoma. Las inserciones de transposones no pueden dirigirse a un gen específico. Sin embargo es fácil detectar las mutaciones LeuX ya que carecerán al menos de los cuatro factores de virulencia mencionados anteriormente.

- Una posibilidad de mejor gusto para introducir una mutación, actualmente en un sitio predeterminado, más bien deliberadamente de forma aleatoria, la ofrece la tecnología de ADN recombinante. Dicha mutación puede ser de nuevo una inserción, una delección o una sustitución de un nucleótido por otro o una combinación de los mismos, con la única condición de que el gen mutado ya no codifique el *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup> funcional*. Dicha mutación puede realizarse, por ejemplo, por delección de un número de pares de bases. Incluso delecciones muy pequeñas tales como tramos de 10 pares de bases pueden presentar de por sí un *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* no funcional. Incluso la delección de un solo par de bases puede conducir en sí a un *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* no funcional. Más preferiblemente, se elimina un tramo más largo, por ejemplo 50 pares de bases o más. Incluso más preferiblemente, el gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* se deleciona por completo.
- Todas las técnicas para la construcción de mutantes *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* - negativos son técnicas convencionales bien conocidas. Estas se refieren a la clonación del gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>*, a la modificación de la secuencia del gen por mutagénesis dirigida, a digestión mediante enzimas de restricción seguido de re-ligamiento de estrategias basadas en PCR y a una posterior sustitución del gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* de tipo silvestre por el gen mutante (intercambio alélico o sustitución alélica). Las técnicas de ADN recombinante convencionales tales como la clonación del gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* en un plásmido, la digestión del gen con una enzima de restricción seguido de un tratamiento con endonucleasas, re-ligamiento y recombinación homóloga en la cepa hospedadora, se conocen bien en la técnica y se describen, entre otros, en Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6). Las mutaciones dirigidas pueden realizarse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida *in vitro* usando el kit Transformed comercializado por Clontech. Las técnicas basadas en PCR se describen ampliamente en (Dieffenbach & Drexler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-3 and ISBN 0-87969-447-5).
- El gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* no solamente comprende la secuencia codificante que codifica *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* sino que también secuencias reguladoras tales como el promotor. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención, no solo se consideran mutaciones en las regiones codificantes sino también mutaciones en aquellas secuencias esenciales para una correcta transcripción.
- En una realización preferida, la invención se refiere a bacterias vivas atenuadas del género *Escherichia* y *Salmonella*.
- En una forma incluso más preferida de la invención, la bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en *S. enterica* que incluye los serotipos *typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, *dublin*, *typhi*, *gallinarum*, *abortusovis*, *abortus-equi*, *pullorum*, *E. coli* o *Y. pestis*. Estos géneros bacterianos comprenden un gran número de especies que son patógenas tanto en seres humanos como en una diversidad de animales diferentes.
- En una forma incluso aún más preferida de la misma, la bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención es *S. entérica*, *E. coli* o *Y. pestis*.
- En una forma adicional más preferida, esta realización se refiere a bacterias vivas atenuadas de acuerdo con la invención en las que la mutación en el gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* se ha realizado por tecnología de ADN recombinante.
- Las mutaciones realizadas deliberadamente y bien definidas que implican la delección de fragmentos del gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* o incluso del gen completo o la inserción de fragmentos de ADN heterólogos o ambos, tienen la ventaja, en comparación con las mutaciones clásicamente inducidas, de que no se invertirán a la situación del tipo silvestre.
- Por lo tanto, en una forma más preferida, esta realización de la invención se refiere a bacterias vivas atenuadas en las que el gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* comprende una inserción y/o una delección.
- Dada la gran cantidad de vacunas proporcionadas hoy en día tanto a mascotas como a animales de granja, está claro que sería deseable la administración combinada de diversas vacunas, únicamente por razones de disminución de costes de vacunación. Por lo tanto, resulta muy atractivo el uso de bacterias vivas atenuadas como un vehículo recombinante para genes heterólogos que codifican antígenos seleccionados de otros microorganismos o virus patógenos. La administración de dicho vehículo recombinante tiene la ventaja de que la inmunidad se induce contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Las bacterias vivas atenuadas para su uso en una vacuna, de acuerdo con la presente invención, proporcionan vehículos muy adecuados para genes heterólogos, ya que el gen que codifica *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* puede usarse como un sitio de inserción para dichos genes heterólogos. El uso del gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* como un sitio de inserción tiene la ventaja de que el gen *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* se inactiva al mismo tiempo y que el gen heterólogo recientemente introducido puede expresarse (conjuntamente con los genes homólogos bacterianos). La construcción de dichos vehículos recombinantes puede realizarse de manera rutinaria usando técnicas de biología molecular convencionales tales como intercambio alélico. Por lo tanto, otra realización de la invención se refiere a bacterias de vehículo recombinantes vivas atenuadas preferiblemente del género *Escherichia*, *Salmonella* y *Yersinia* que no producen un *ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup>* funcional y en las que se inserta un gen heterólogo.
- Dicho gen heterólogo puede ser, como se ha mencionado anteriormente, por ejemplo, un gen que codifica un antígeno seleccionado de otros microorganismos o virus patógenos. Dichos genes pueden derivar, por ejemplo, de herpesvirus patógenos (por ejemplo, los genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus) retrovirus (por ejemplo la proteína de cubierta gp160), adenovirus y similares. También puede obtenerse un gen heterólogo a partir de bacterias patógenas. Como un ejemplo, los genes que codifican antígenos protectores tales como toxinas bacterianas del tipo toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, toxinas de *Clostridium*, proteínas de membrana externa y similares son genes heterólogos bacterianos muy adecuados.

Otra posibilidad es insertar un gen que codifica una proteína implicada en el desencadenamiento del sistema inmunitario, tal como una citocina, una interleucina y un interferón y otro gen implicado en la inmuno-regulación.

La inserción del gen heterólogo en el gen  $ARNt_5^{leu}$  es ventajosa, ya que en este caso no es necesario encontrar un nuevo sitio de inserción adecuado para el gen heterólogo, y al mismo tiempo el gen  $ARNt_5^{leu}$  está inactivado.

- 5 Por lo tanto, en una forma preferida de esta realización el gen heterólogo se inserta en el gen  $ARNt_5^{leu}$ . El gen heterólogo puede insertarse en algún sitio del gen  $ARNt_5^{leu}$  o puede insertarse en el sitio del gen  $ARNt_5^{leu}$  aunque este gen se haya deletado parcial o completamente.

- 10 Debido a su inesperado carácter inmunogénico aunque atenuado *in vivo*, las bacterias para usar en una vacuna, de acuerdo con la invención, son muy adecuadas como una base para vacunas vivas atenuadas. Por lo tanto, otra realización más de la invención se refiere a dichas vacunas vivas atenuadas para la protección de animales y de seres humanos contra una infección por *Escherichia*, *Yersinia* o *Salmonella* o los efectos patógenos de las mismas, que comprende una bacteria en la que la forma de tipo silvestre comprende un gen  $ARNt_5^{leu}$ .

- 15 Dichas vacunas comprenden una cantidad inmunogénicamente eficaz de una bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención o una bacteria vehículo recombinante viva de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, la vacuna comprende una bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención, seleccionada del grupo de *Escherichia*, *Salmonella* y *Yersinia*.

Inmunogénicamente eficaz significa que la cantidad de bacterias vivas atenuadas administrada en la vacunación es suficiente para inducir en el hospedador una respuesta inmunitaria eficaz contra formas virulentas de la bacteria.

- 20 Además de una cantidad inmunogénicamente eficaz de la bacteria viva atenuada descrita anteriormente, una vacuna de acuerdo con la presente invención también contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser simplemente agua, pero también puede comprender, por ejemplo, un caldo de cultivo en el que se cultiva la bacteria. Otro vehículo adecuado es por ejemplo una solución de concentración salina fisiológica.

- 25 La dosificación útil para administrar variará dependiendo de la edad, del peso y del animal vacunado, del modo de administración y del tipo de patógeno contra el que se desea la vacunación.

La vacuna puede comprender cualquier dosis de bacterias, suficiente para provocar una respuesta inmune. Las dosis que varían entre  $10^3$  y  $10^{10}$  bacterias son por ejemplo dosis muy adecuadas.

- 30 Opcionalmente, a la vacuna pueden añadirse uno o más compuestos que tienen actividad adyuvante. Los adyuvantes son estimuladores no específicos del sistema inmunitario. Estos potencian la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la vacuna. Son ejemplos de adyuvantes conocidos en la técnica, adyuvante completo e incompleto de Freund, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos, muramildipéptidos, ISCOM (complejos inmunoestimulantes, consultar por ejemplo, la Patente Europea EP 109942), saponinas, aceite mineral, aceite vegetal y Carbopol.

Los adyuvantes, especialmente adecuados para la aplicación en mucosas, son por ejemplo la toxina termolábil (LT) de *E. coli* o la toxina del cólera (CT).

- 35 Otros adyuvantes adecuados son por ejemplo hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio, emulsiones en aceite (por ejemplo de Bayol F<sup>(R)</sup> o Marcol 52<sup>(R)</sup>), saponinas o solubilizado de vitamina E.

Por lo tanto, en una forma preferida, las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un adyuvante.

- 40 Otros ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizantes tales como SPGA, hidratos de carbono (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo tampón fosfato).

Cuando dichos estabilizadores se añaden a la vacuna, la vacuna es especialmente muy adecuada para liofilizar. Por lo tanto, en una forma más preferida, la vacuna está en una forma liofilizada.

- 45 Otra realización adicional, se refiere al uso de una bacteria de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para la protección de animales y seres humanos contra una infección con una bacteria de tipo silvestre o los efectos patógenos de la infección.

Para la administración en animales o en seres humanos, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse, entre otras, por vía intranasal, intradérmica, subcutánea, oral, por aerosol o intramuscular. Para la aplicación en aves de corral, la punción en la membrana del ala y la administración por colirio son muy adecuadas.

- 50 El experto en la materia sabría cómo administrar una vacuna de acuerdo con la invención, ya que más probablemente el método no debería diferenciarse de los métodos seguidos para la vacunación con vacunas bacterianas actualmente

existentes. Una vacuna de acuerdo con la invención, especialmente cuando esta comprende bacterias que pertenecen a la familia de *E. coli*, *Salmonella* o *Yersinia* debería proporcionarse preferiblemente por vía oral.

Otra realización adicional de la invención se refiere a métodos para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención. Dichos métodos comprenden mezclar una bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención o una bacteria vehículo recombinante viva de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Construcción de mutantes *leuX*

Para sustituir el gen *leuX* de *S. typhimurium* SR-11 por un gen de resistencia a kanamicina, se usó el sistema Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 6 de junio del 2000. 97(12):6640-45.).

En este ejemplo se usó *S. typhimurium* de tipo silvestre; SR-11 aunque el principio descrito es igualmente aplicable para todas las bacterias portadoras del gen *leuX*.

Se añadieron secuencias homólogas a secuencias flanqueantes de *leuX* de *S. typhimurium* SR-11 en el extremo 5' de los cebadores para un casete de kanamicina. Para la PCR del casete de kanamicina se usó un Cebador Directo: 5' GGT ATA ATC CAC AAC GTT TTCCGC ATA CCT CTT CAG gtgtaggctggagctgctcg y un Cebador Inverso: 5' AAA AAG CCA CCA TTA GGC AGC TAA TTA TTG CAT CAC catatgaatatctctccttag (las letras mayúsculas son secuencias de *leuX* y las letras minúsculas son los cebadores de kanamicina), del plásmido pKD4. Para amplificar el casete de kanamicina (~1700pb) del plásmido pKD4, se usó el conjunto cebador que contenía los sitios de cebamiento usados en una reacción PCR convencional con la Taq ADN polimerasa de Fisher (MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM). Las condiciones de ciclado fueron 1X 94°C 4 min; 35X 94°C 30 s, 55°C 15 s, 72°C 75-105 s; 1X 72°C 7 min. Se agruparon ocho reacciones de 100 µl, se comprobaron 5 µl en un gel y el producto de la PCR lineal se precipitó en etanol y se resuspendió en 2-4 µl de agua.

Con el plásmido pKD46 sensible a temperatura se realizó la electroporación de las células de *S. typhimurium* SR-11. Cuando estas células se cultivan a 30°C en presencia de arabinosa el plásmido expresa la recombinasa Red lambda. Las células (A<sub>600</sub>=0,6) se hicieron competentes para la electroporación por centrifugación y se lavaron 3-4X con glicerol al 10% frío. Después se realizó la electroporación del producto de la PCR lineal en las células competentes. La recombinasa actúa para sustituir el gen *leuX* de tipo silvestre por el gen *leuX* delecionado que contiene el casete de kanamicina. Los clones de *S. typhimurium* SR-11 que contenían el gen *leuX* delecionado se seleccionaron por cultivo durante una noche a 37°C en placas de agar Luria que contenían kanamicina (40 µg/ml), que también dio como resultado la pérdida del plásmido pKD46 sensible a temperatura.

Para verificar los mutantes, se usaron cebadores 5' y 3' de la inserción del casete de deleción/antibiótico *leuX*, es decir aguas arriba y aguas abajo. Para el mutante de *leuX* de *S. typhimurium* SR-11, se usaron cebadores que contenían un sitio *PstI* y homólogos para regiones 5' y 3' del gen *leuX* (los cebadores se denominaron Pst Leux 5': ctagctgcag gcgtaatctgctggagaaggc; y Pst Leux 3': ctagctgcag acgaccaacacggaaagaccac) para amplificar la banda esperada aproximada de 1700pb (frente a una banda de tipo silvestre de 400pb). En la reacción se usó MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM con polimerasa DyNAzymell Finnzyme. Las condiciones de ciclado fueron 1X 94°C 4 min; 30X 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 105 s; 1X 72°C 7 min.

### Ejemplo 2

#### Ensayos en animales

#### Diseño experimental

Para realizar la seguridad y eficacia, se realizó la inoculación por pulverización en pollos de engorde el día de la eclosión y se realizó la inoculación por vía oral a los 15 días de edad aproximadamente con 10<sup>7</sup> UFC de SR11- *leuX*<sup>(-)</sup> (El mutante LeuX-menos).

La seguridad se evaluó mediante observación clínica después de la vacunación. También, se tomaron frotis cloacales a los 8, 15, 22 y 30 días para determinar la presencia de la cepa de la vacuna en el tracto intestinal. Los frotis se usaron para inocular Agares Verde Brillante (BGA) directamente y después de enriquecimiento en caldo Rappaport Vassiliades. A los 30 días de edad, se realizó la necropsia de 5 animales vacunados y sus hígados y bazos se cultivaron para determinar si la cepa de la vacuna había invadido desde el tracto intestinal.

Para ensayar la eficacia, los animales recibieron una infección por exposición oral con 1,4 10<sup>6</sup> UFC de una cepa S.t. de tipo silvestre resistente a tetraciclina a los 30 días de edad. Dos semanas después de la infección por exposición, los animales se sacrificaron y los hígados, bazos, frotis cloacales y frotis de los contenidos del ciego se cultivaron para la cepa de exposición. Los órganos y los frotis se inocularon en BGA que contenía tetraciclina (BGAtet) directamente y también después de la incubación en un medio de enriquecimiento (agua de peptona tamponada que contenía tetraciclina).

Animales

Se obtuvieron huevos eclosionados de una población reproductora de pollos de engorde sin Salmonella.

Resultados

5 No se observaron anomalías clínicas después de las vacunaciones por pulverización y por vía oral. La cepa SR11-LeuX<sup>(-)</sup> se cultivó a partir de frotis de cloaca de algunos de los animales vacunados los días 8, 15, 22 y 30. A los 30 días de edad, la cepa de la vacuna aún estaba diseminada en el 53% de los animales vacunados, pero no se volvió a aislar ni de los hígados ni de los bazos de los 5 animales a los que se había realizado la necropsia.

10 Como se muestra en la Tabla 1, la cepa de exposición se aisló del hígado y bazo de animales no vacunados. Además, la cepa de exposición se volvió a aislar de la cloaca y del ciego prácticamente de todos los animales de control no vacunados.

La vacunación con SR11-LeuX<sup>(-)</sup> dio como resultado la eliminación completa de la cepa de exposición 14 días después de la infección. Además, no se observó la cepa de exposición ni en el hígado ni en el bazo de los animales vacunados.

15 Los resultados muestran, que las bacterias LeuX<sup>(-)</sup>, incluso si la mutación LeuX<sup>(-)</sup> es la única mutación de atenuación, son inocuas y eficaces en vacunas vivas.

Tabla 1

Grupo	S.t. positiva (tet <sup>r</sup> )	
	SR11-LeuX <sup>(-)</sup>	Control
Bazo	0/14 <sup>a</sup>	10/12
Hígado	0/14 <sup>a</sup>	10/12
Cloaca	0/14 <sup>a</sup>	8/12
Ciego	0/14 <sup>a</sup>	11/12

<sup>a</sup>: significativamente diferente del control (p<0,05, ensayo exacto de Fisher)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Board of Governors for higher education, State of Rhode Island and Providence plantations

<120> Vacuna bacteriana viva atenuada

20 <130> LeuX

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 210

25 <212> ADN

<213> Salmonella typhimurium

<400> 1

acttagcgat acaggtgtat gctcgtgctt gcatgggtggc gtagtacagg tataatccac 60

30 aacgtttcc gcatacctct tcagtgccga agtggcgaaa tcgtagtagc cagttgattc 120

aaaatcaacc gtagaaatac gtgccggttc gagtccggcc ttcggcacca agtgatgcaa 180

taattagctg cctaattggtg gcttttttg 210

**REIVINDICACIONES**

1. Una bacteria viva atenuada del género *Escherichia*, *Yersinia* o *Salmonella*, no teniendo dicha bacteria ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup> funcional para su uso en una vacuna.
- 5 2. Una bacteria viva atenuada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, no teniendo dicha bacteria ARNt<sub>5</sub><sup>leu</sup> funcional como resultado de una mutación en el gen *leux*.
3. Una bacteria viva atenuada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, seleccionándose dicha bacteria del grupo que consiste en *E.coli*, *S. enterica* del serotipo *typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, *dublin*, *typhi*, *gallinarum*, *abortusovi*, *abortus-equi* o *pullorum*.
- 10 4. Una bacteria viva atenuada para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que la mutación comprende una inserción y/o una delección.
5. Una bacteria viva atenuada para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, caracterizada por que dicha bacteria lleva un gen heterólogo.
6. Una bacteria viva atenuada para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada por que el gen heterólogo se inserta en el gen *leux*.
- 15 7. Una bacteria viva atenuada para la protección de animales y seres humanos contra una infección por una bacteria patógena o los efectos patógenos de la misma, caracterizada por que dicha vacuna comprende una bacteria como se define en las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una vacuna viva atenuada de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que comprende un adyuvante.
- 20 9. Una vacuna viva atenuada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizada por que se presenta en forma liofilizada.
10. El uso de una bacteria viva atenuada como se define en las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de una vacuna para la protección de animales contra una infección por una bacteria patógena o los efectos patógenos de una infección.
- 25 11. Un método para la preparación de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 7-9, caracterizado por que dicho método comprende la mezcla de una bacteria viva atenuada como se define en las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.