

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 187**

21 Número de solicitud: 200931101

51 Int. Cl.:
A61K 39/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **03.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.01.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 16,66%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Pública de Navarra (Titular al 16,66%),
Universidad Nacional de Costa Rica
(UNA) (Titular al 33,33%) y
Universidad de Costa Rica (UCR) (Titular al 33,33%)

72 Inventor/es: **Grilló Dolset, María;**
Amorena Zabalza, Beatriz;
Andrés Cara, Damián de;
Moreno Robles, Edgardo;
Chaves Olarte, Esteban y
Guzmán Verri, Caterina

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento de identificación de animales vacunados frente a *Brucella*.**

57 Resumen:

Procedimiento de identificación de animales vacunados frente a *Brucella*.

La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Brucella* spp. que expresa la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) en la elaboración de medicamentos para la prevención de la brucelosis en mamíferos, a las vacunas frente a la brucelosis, y al método para la identificación de los mamíferos a los que se les ha administrado dichas vacunas. Preferiblemente, el método de la invención es un inmunoensayo, y aún más preferiblemente es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

ES 2 372 187 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de animales vacunados frente a *Brucella*.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la Medicina Preventiva y Salud Pública, y se refiere tanto al desarrollo y utilización de vacunas vivas de *Brucella* spp. modificadas genéticamente, como al desarrollo y utilización de técnicas de diagnóstico directo e indirecto que permiten la identificación de animales que han sido vacunados de aquellos que padecen una infección por cepas virulentas de *Brucella* spp.

10 **Estado de la técnica anterior**

La brucelosis es una enfermedad que se transmite de los animales al hombre. En los animales, la infección por *Brucella* causa abortos, infertilidad, disminución de las producciones y limitaciones en el comercio de animales y productos derivados, lo que constituye un problema de Sanidad Animal con repercusiones económicas. Además, la bacteria se transmite de los animales infectados a los seres humanos, produciéndoles una enfermedad debilitante y a menudo invalidante, frente a la que no existen vacunas y cuyo tratamiento requiere de altas dosis de antibióticos durante periodos prolongados, con frecuentes recaídas. Por lo tanto, la brucelosis constituye un problema de Salud Pública relevante. Se ha demostrado que la prevalencia de la brucelosis humana está directamente relacionada con la prevalencia de la brucelosis animal. Por ello y en ausencia de vacunas para uso en humanos, la prevención de la enfermedad pasa necesariamente por el control de la infección en los animales. En la mayoría de los contextos socio-económicos, la única forma viable de controlar la brucelosis es mediante programas basados en la vacunación de los animales de producción, bien mediante programas de vacunación masiva o mediante programas de vacunación, diagnóstico y sacrificio de los animales infectados (Blasco 1997. *Preventive Veterinary Medicine* 31: 275-283).

Las vacunas de referencia contra la brucelosis animal son *B. abortus* S19 (lisa) para ganado vacuno y *B. melitensis* Rev1 (lisa) para ganado ovino y caprino (OIE Terrestrial Manual, 2009 -capítulos 2.4.3. y 2.7.2.-). Ambas son vacunas vivas atenuadas, libres de adyuvantes, con bajo coste de producción y adquisición, y altamente eficaces frente a las infecciones por cepas de campo en rumiantes (principal fuente de infección para los humanos). Sin embargo, presentan el inconveniente técnico de generar una respuesta inmune, tras la vacunación, indistinguible de la inducida tras la infección virulenta por cepas de campo. Para solucionar este problema, se han realizado numerosos esfuerzos científicos. Una de las estrategias ha sido el desarrollo de cepas rugosas (R) de *Brucella* que, al carecer de la cadena O del lipopolisacárido (LPS) -conocido factor de virulencia de *Brucella* y principal antígeno utilizado en los ensayos de diagnóstico serológico de la infección- ha permitido obtener cepas atenuadas utilizables como vacunas vivas, que no interfirieron significativamente en las pruebas de diagnóstico serológico. En este contexto, en los años 90, se desarrolló (mediante subcultivos) el mutante espontáneo con fenotipo R denominado *B. abortus* RB51 (Schurig *et al.*, 1991. *Veterinary Microbiology*, 28: 171-188). La cepa RB51 se está utilizando actualmente en algunos países contra la brucelosis bovina, con resultados controvertidos. Tanto RB51 como una colección de mutantes R derivados de *B. melitensis* y genéticamente bien caracterizados en las distintas rutas de síntesis del lipopolisacárido (González *et al.*, 2008. *PloS One*, 3 (7): e2760), reducen los problemas de interferencia en el diagnóstico serológico de la infección virulenta, al carecer de antígeno "O". Sin embargo, se ha demostrado que las vacunas R no solucionan el problema, ya que la protección que confieren frente a las infecciones de campo es muy inferior a la de las vacunas de referencia *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev1 (Moriyón *et al.*, 2005. *Veterinary Research*, 35:1-38; Barrio *et al.*, 2009. *Vaccine*, 27: 1741-1749). Por todo ello, se hace imprescindible disponer de vacunas derivadas *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev1 modificadas genéticamente y de pruebas de diagnóstico asociadas que permitan diferenciar mediante diagnóstico directo e indirecto (serología) a los animales que han sido vacunados de aquellos que padecen la infección virulenta.

Existe una gran variedad de proteínas fluorescentes GFP (*Green Fluorescent Protein*), que se generan en cantidad y con intensidad de fluorescencia variables, según el sistema de expresión utilizado. Las proteínas GFP han sido ampliamente utilizada en Biología Molecular y Celular para mapeo genético y detección de microorganismos (incluyendo *Brucella*; Celli *et al.*, 2003. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4): 545-556) células, plásmidos, proteínas recombinantes y otros elementos con fines estrictamente científicos. Asimismo, se han desarrollado algunas pruebas inmunológicas tipo *immunoblotting* (Rajasekaran *et al.*, 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22): 7051-7055) y ELISA sándwich para la detección y cuantificación de diversas proteínas GFP expresadas en microorganismos, células y tejidos (Cell Biolabs, Inc.; Cell Signaling Technology, Inc.). También existen ensayos de diagnóstico molecular tipo PCR para identificar determinadas variantes del gen que codifican la proteína GFP en bacterias como *E. coli* (Clontech Laboratories) o *Staphylococcus epidermidis* (Franke *et al.*, 2007. *Journal of Microbiological Methods* 71: 123-132).

Walsh y colaboradores (Walsh *et al.*, 2000. *Journal of General Virology*, 81, 709-718) propusieron la posible utilización de una proteína GFP como marcador de una vacuna veterinaria. Sin embargo, no consiguieron expresarla convenientemente en el virus de la Peste Bovina.

65 **Descripción de la invención**

Los autores de la presente invención describen cómo una cepa derivada de *B. abortus* S19 (la vacuna prototipo S19-GFPp), es capaz de expresar la GFP de manera estable, sin alterar las características microbiológicas o biológicas

(atenuación y eficacia frente a la infección en animales de experimentación) de la cepa S19 de referencia y, además, es capaz de inducir la respuesta de anticuerpos anti-GFP detectables mediante pruebas serológicas específicas, que permiten diferenciar los hospedadores que han sido vacunados de aquellos infectados por cepas virulentas de *Brucella* spp. También describen un método ELISA indirecto de diagnóstico serológico capaz de identificar específicamente a los animales que han sido inmunizados con la nueva vacuna que expresa la proteína GFP.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una cepa de *Brucella* spp. que expresa de forma estable la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) y que es capaz de provocar una respuesta inmune en el hospedador equiparable a la inducida por las cepas vacunales de referencia y además, genera anticuerpos anti-GFP detectables por métodos serológicos específicos, en la elaboración de un medicamento o, alternativamente, a una cepa de *Brucella* sp. que expresa de forma estable la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) y que es capaz de provocar una respuesta inmune en el hospedador equiparable a la inducida por las cepas vacunales de referencia y además, genera anticuerpos anti-GFP detectables por métodos serológicos específicos, para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una cepa de *Brucella* spp. que expresa de forma estable la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) y que es capaz de provocar una respuesta inmune en el hospedador equiparable a la inducida por las cepas vacunales de referencia y además, genera anticuerpos anti-GFP detectables por métodos serológicos específicos, en la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la brucelosis en un mamífero o, alternativamente, a una cepa de *Brucella* spp. que expresa de forma estable la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) y que es capaz de provocar una respuesta inmune en el hospedador equiparable a la inducida por las cepas vacunales de referencia y además, genera anticuerpos anti-GFP detectables por métodos serológicos específicos, para su uso en la prevención o el tratamiento de la brucelosis en un mamífero.

En esta memoria, se entiende por *Brucella* spp. cualquier organismo celular que puede ser definido como taxonómicamente perteneciente al superreino Bacteria, phylum *Proteobacteria*, clase *Alphaproteobacteria*, orden *Rhizobiales*, familia *Brucellaceae* y género *Brucella*. Se entiende por “mamífero” cualquier organismo del superreino Eukaryota, reino Metazoa, phylum Chordata, subphylum Craniata, superclase Gnathostomata y clase Mammalia. Se entiende por rumiante cualquier mamífero perteneciente al superorden Laurasiatheria, suborden Ruminantia. Y se entiende por bovino, ovino y caprino, cualquier mamífero que puede ser clasificado como perteneciente a la familia Bovidae.

La proteína verde fluorescente GFP producida por la medusa *Aequorea* sp. (*A. victoria*, *A. aequorea*, *A. forskalea*) es una proteína que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. En el contexto de la presente invención, GFP se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína GFP, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1,

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GFP.

En otra realización preferida de la invención, la cepa de *Brucella* spp. pertenece a la especie *B. abortus*. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de la cepa de referencia *B. abortus* S19 (OIE Terrestrial Manual, 2009 -capítulo 2.4.3.-). En otra realización preferida, la cepa de *Brucella* pertenece a la especie *B. melitensis*. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de la cepa de referencia *B. melitensis* Rev 1 (OIE Terrestrial Manual, 2009 -capítulo 2.7.2.-).

“*Brucella abortus* S19” ó “*Brucella abortus* bv. 1 str. S19” es una cepa espontáneamente atenuada descubierta por el Dr. John Buck en 1923, que se ha empleado en todo el mundo desde principios de 1930, como una vacuna efectiva para prevenir la brucelosis en los animales, y es considerada internacionalmente la vacuna de referencia para el control de la brucelosis bovina (OIE Terrestrial Manual, 2009 -capítulo 2.4.3.-). El lote de siembra original puede obtenerse en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, National Veterinary Services Laboratories -NVSL-, 1800 Dayton Road, Ames, Iowa 50010, United States of America) y en el Laboratorio de Referencia para Brucelosis de la OIE del Veterinary Laboratories Agency (VLA; Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Reino Unido). La cepa también es conocida como NCTC 8038 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/brucella_group/GenomeDescriptions.html).

“*Brucella melitensis* Rev 1”, “*Brucella melitensis* bv. 1 str. Rev.1” es una cepa también conocida como BCCN V4a, (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/brucella_group/GenomeDescriptions.html) espontáneamente

ES 2 372 187 A1

atenuada y obtenida a partir de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056, mediante mutaciones espontáneas sucesivas relacionadas con la dependencia a la estreptomycinina y la posterior reversión a dicha dependencia (Herzberg and Elberg 1953. *Journal of Bacteriology* 66: 585-599; Herzberg and Elberg 1953. *Journal of Bacteriology* 66: 600-605.). La cepa Rev 1 se ha empleado en todo el mundo desde los años 50 como la única vacuna efectiva para prevenir la brucelosis en pequeños rumiantes, y es considerada internacionalmente la vacuna de referencia para el control de la brucelosis ovina y caprina (OIE Terrestrial Manual, 2009 -capítulo 2.7.2.-). Los lotes de siembra originales de Rev1 pueden obtenerse en el Laboratorio de Referencia para Brucelosis de la OIE del AFSSA (94706 Maisons-Alfort, Francia) o en la Farmacopea Europea (BP 907, 67029 Strasbourg Cedex 1, Francia).

En una realización preferida de la invención, el mamífero es un rumiante. En otra realización preferida de la invención, el mamífero es un bovino, y aún más preferiblemente, perteneciente a la subfamilia *Bovinae* o *Caprinae*.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende una cepa de *Brucella* spp. que expresa la proteína GFP y, preferiblemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la cepa de *Brucella* pertenece a la especie *B. abortus*. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de *B. abortus* S19. En otra realización preferida, la cepa de *Brucella* pertenece a la especie *B. melitensis*. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de *B. melitensis* Rev 1. En otra realización preferida, la composición es una vacuna. En otra realización más preferida, la composición de la invención además comprende un adyuvante. En otra realización más preferida, la composición de la invención, que comprende una cepa de *Brucella* spp. que expresa la proteína GFP, además comprende otro principio activo.

La composición de la invención puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo los rumiantes, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica, para usarse como inmunógeno. Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en los mismos. Para la formulación de tales composiciones, una cantidad efectiva inmunológicamente de la cepa de *Brucella* spp. es mezclada con un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos. Así, la composición de la invención puede encontrarse, pero sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tales como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y similares, y nutrientes incluyendo, pero sin limitarse a, glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, el principio activo puede prepararse para su administración en forma sólida. El principio activo puede combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo, sin limitarse a, aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

La composición de la invención puede administrarse a un animal, incluyendo un mamífero, preferiblemente a un rumiante, y aún más preferiblemente perteneciente a las subfamilias *Bovinae* o *Caprinae*, en una variedad de formas, incluyendo, sin limitarse a, las vías intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, conjuntival, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores (como por ejemplo, la edad, peso, sexo, estado fisiológico -como gestación o lactancia-, tolerancia, estado del sistema inmune) del animal, preferiblemente mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de *Brucella* spp. que expresa la proteína GFP de manera estable, produciendo el efecto deseado (la generación de inmunidad y de anticuerpos anti-GFP). Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

En esta memoria, el término “medicamento” hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en los seres humanos y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a la composición que comprende las cepas de *Brucella* spp. que expresan la proteína GFP de manera estable, y que son capaces de generar inmunidad frente a la brucelosis y anticuerpos anti-GFP, o a la composición que comprende *Brucella* spp. que expresa la proteína GFP de manera estable, y que es capaz de generar inmunidad frente a la brucelosis y anticuerpos anti-GFP y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o adicionalmente, un adyuvante. El término medicamento incluye, por tanto, a las vacunas.

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una composición o preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las

sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

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

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la identificación de mamíferos vacunados con la cepa o la composición de la invención, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada del mamífero,
- b) detectar la presencia del gen *gfp* que codifica la proteína GFP, o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada de mamífero.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero es un rumiante. En otra realización preferida de la invención, el mamífero es un bovino, ovino o caprino, y aún más preferiblemente, perteneciente a las subfamilias *Bovinae* o *Caprinae*.

Una “muestra biológica aislada” incluye, sin limitarse a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un mamífero, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En una realización preferida, la muestra biológica aislada es un fluido biológico, como por ejemplo, sin limitarse a, leche, semen, fluido seminal, exudados vaginales, secreciones conjuntivales, sangre, plasma o suero sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es el suero sanguíneo. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada son células que se encuentran en la sangre, leche, semen, exudados vaginales o secreciones conjuntivales del mamífero. En otra realización preferida, son células o tejidos.

Múltiples métodos para la detección de la presencia del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada son conocidos en el estado del arte. En esta memoria, como “productos de la expresión del gen *gfp*” se incluyen, sin limitarse a, tanto la proteína GFP, como los anticuerpos anti- GFP generados por el sistema inmunitario del mamífero frente a dicha proteína o antígeno. Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección de la presencia del gen *gfp* o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada de mamífero se realiza mediante la detección de los anticuerpos frente a la proteína GFP (anticuerpos anti-GFP). La detección de los anticuerpos anti-GFP puede realizarse por cualquier método conocido en el estado de la técnica por ejemplo, sin limitarse a, mediante inmunoensayo o inmunohistoquímica. En una realización más preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA.

Un antígeno o inmunógeno es una sustancia capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y polisacáridos. El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína (antígeno) GFP. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

El término “anticuerpo anti-GFP” se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína GFP, con una variante de la proteína GFP o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término anticuerpo anti-GFP se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína o de lipopolisacárido (LPS). Como se ha dicho, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

Los autores de la presente invención describen un método de diagnóstico serológico capaz de identificar a los animales que han sido vacunados con el prototipo de nueva vacuna S19-GFPp y diferenciarlos de los infectados por cepas virulentas de *Brucella* spp.

ES 2 372 187 A1

En una realización aún más preferida, el ELISA es un ELISA indirecto, y aún más preferiblemente comprende los siguientes pasos:

- (a) recubrir un soporte sólido con al menos la proteína GFP, una variante de dicha proteína, o un fragmento de la misma;
- (b) incubar el soporte recubierto del paso anterior con una muestra biológica obtenida del mamífero en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo de los anticuerpos frente a, al menos, el antígeno GFP, con sus variantes o sus fragmentos; y
- (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce a los anticuerpos frente al antígeno GFP, conjugado o unido a un compuesto marcador.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección del anticuerpo anti-GFP. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse directamente al anticuerpo o, indirectamente, a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, sin limitarse a, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína, rodamina o sus derivados, o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto- radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

En otra realización preferida, la detección de la presencia del gen *gfp* o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada del mamífero se realiza por iluminación ultravioleta de dicha muestra. En otra realización más preferida, la detección de la presencia del gen *gfp* o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada del mamífero se realiza por microscopía de fluorescencia.

En otra realización preferida, la detección de la presencia del gen *gfp* o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada de mamífero se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Otro aspecto de la invención se refiere a un “kit” de identificación de mamíferos vacunados con la cepa o la composición de la invención, que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de la invención. Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la presencia del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada de mamífero por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, sin limitarse a, anticuerpos específicos de la proteína GFP, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. En el caso de la detección por técnicas que impliquen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede contener, pero sin limitarse, cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para determinar la presencia del gen *gfp*, o de sus productos de expresión. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud química o bioquímicamente modificados.

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

Descripción de las figuras

Fig. 1. Crecimiento de la nueva vacuna S19-GFPp y de la cepa parental S19 en placas de agar tripticasa soja iluminadas con luz ultravioleta en un aparato “Gel Doc” de Bio Rad y visualizadas con el filtro adecuado (520DF30 nm, Bio Rad) (A) o en microscopio de fluorescencia (B).

Fig. 2. Amplificación por PCR de la región *ery* en la nueva vacuna S19-GFPp (menor peso molecular), en comparación con la de la cepa virulenta *B. abortus* 2308.

Fig. 3. *Proporción de bacterias intracelulares y extracelulares en células HeLa infectadas con la nueva vacuna S19-GFPp o con la cepa parental S19, una hora después de la infección.* Las células HeLa se infectaron con 200 UFC/célula y, 1 hora después, se fijaron y marcaron por doble inmunofluorescencia con rodamina y FITC, siguiendo protocolos anteriormente descritos (Chaves-Olarte *et al.*, 2002. *Cellular Microbiology* 4(10): 663-675).

Fig. 4. *Replicación de la nueva vacuna S19-GFPp y de la cepa parental S19 en células HeLa y en macrófagos Raw 264.7, a las 48 horas post-infección.* Las células se infectaron con 200 UFC/célula y se determinó el número de UFC/mL, siguiendo protocolos anteriormente descritos (Chaves-Olarte *et al.*, 2002. *Cellular Microbiology* 4(10): 663-675; Celli *et al.*, 2003. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4): 545-556).

Fig. 5. *Cinética esplénica de la nueva vacuna S19-GFPp y de la cepa parental S19 en el modelo murino.* Grupos de 30 ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con 1×10^5 UFC de la nueva vacuna S19-GFPp o de la cepa parental S19. A los 7, 14, 25, 40 y 60 días después de la infección, 6 ratones de cada grupo fueron sacrificados para determinar el número de UFC/bazo de cada cepa vacunal y construir las correspondientes curvas de multiplicación esplénica, siguiendo protocolos anteriormente descritos (Sangari *et al.*, 1998. *Vaccine*, 16(17): 1640-1645).

Fig. 6. *Ensayo de protección en ratones BALB/c inmunizados con la nueva vacuna S19-GFPp.* Grupos de 6 ratones fueron inmunizados, por vía subcutánea, con 1×10^5 UFC de la nueva vacuna S19-GFPp o de la cepa parental S19. Como control, se inoculó un grupo de ratones con PBS estéril. Después de 60 días, todos los ratones fueron infectados experimentalmente, por vía intraperitoneal, con 5×10^4 UFC de la cepa virulenta de referencia *B. abortus* 2308 y, 2 semanas después, fueron sacrificados para recuento del número de UFC de 2308 por bazo. Los animales vacunados con S19-GFPp mostraron niveles de protección similares a los mostrados por la vacuna de referencia S19.

Fig. 7. *Respuesta de anticuerpos contra LPS de Brucella en ratones inmunizados con la nueva vacuna S19-GFPp y la cepa parental S19.* Se obtuvieron muestras de sueros en ratones no inmunizados (controles) y en ratones inmunizados por vía intraperitoneal, con 1×10^5 UFC de la nueva vacuna S19-GFPp o de la cepa parental S19, a los 7, 14, 25 y 60 días después de la inmunización. Estos sueros se diluyeron 1/200 en PBS y se midió su Densidad Óptica (D.O.) a 405 nm en un ELISA indirecto contra LPS utilizado habitualmente para el diagnóstico de la brucelosis animal. Cada punto de la gráfica representa el promedio de 5 sueros de ratones diferentes. Todos los animales desarrollaron anticuerpos frente al LPS de *Brucella*.

Fig. 8. *Determinación del grado de pureza e inmunogenicidad en ratones de la proteína GST-GFP recombinante obtenida.* A) La proteína recombinante GST-GFP purificada por afinidad, mostró una sola banda en SDS-PAGE. B) La proteína GST-GFP usada como inmunógeno en ratones indujo anticuerpos anti-GFP. La reacción de inmunodifusión se realizó con diluciones seriadas (pocillos 2 a 32) de suero monoespecífico contra $10 \mu\text{g}/30 \mu\text{L}$ de GFP (pocillo G) y, como control, se utilizó PBS solo (pocillo -). Las bandas de precipitación muestran que el suero inmune anti-GFP obtenido en ratones presentó un título de 1/16.

Fig. 9. *Curvas estándar en el ELISA-GFP desarrollado, utilizando sueros de ratones (a) o de ovejas (b) previamente inmunizados con la proteína recombinante GST-GFP.*

Fig. 10. *Intensidad de la respuesta de anticuerpos contra GFP en sueros de ratones inoculados con la nueva vacuna S19-GFPp o con la vacuna de referencia S19.* La intensidad de la reacción de cada suero individual se calculó de acuerdo al porcentaje de positividad de la muestra con respecto al control (D.O. del suero positivo/D.O. del suero muestra X 100). Cada punto representa el promedio de 10 sueros de ratones diferentes.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

1.- Desarrollo de un prototipo de vacuna fluorescente derivada de *B. abortus* S19 (S19-GFPp)

La vacuna de referencia *B. abortus* S19 (obtenida del Laboratorio de Referencia para Brucelosis de la OIE del AFS-SA, Francia) se modificó genéticamente, mediante electroporación con un plásmido que codifica la GFP. El plásmido utilizado fue pBBR-2-gfp, derivado del plásmido pBBRIMCS-2, que contiene un inserto de resistencia a kanamicina (Kovach *et al.*, 1995. *Gene*. Vol 166: 175-176) y un inserto con el gen que codifica la GFP, bajo el control del promotor *lac*. Se sabe que este plásmido genera GFP constitutivamente, sin integrarse en el cromosoma de *Brucella* (Celli *et al.*, 2003. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4): 545-556).

2.- Caracterización genética y microbiológica de S19-GFPp

2.1. Se comprobó que las bacterias S19-GFPp emiten fluorescencia detectable mediante iluminación directa de los cultivos con luz ultravioleta y posterior visualización de los mismos con un filtro adecuado (Fig. 1A) o mediante observación de tejidos o exudados infectados en microscopio de fluorescencia (Fig. 1B). Por lo tanto, el plásmido pBBR-2-gfp permite la expresión de GFP en *Brucella* en proporciones adecuadas para que la nueva vacuna S19-GFPp pueda ser identificada a simple vista tras su aislamiento.

2.2. Se comprobó que la expresión de la proteína GFP en *Brucella* no altera el tamaño y fase coloniales de S19 en cultivos bacteriológicos, ni sus características bacteriológicas clásicas. Para ello, el tamaño colonial se determinó midiendo el diámetro de las colonias obtenidas en placas de agar, tras 3 días de incubación. Paralelamente, la fase colonial se determinó mediante observación de los crecimientos bacterianos en una lupa de iluminación oblicua y tinción por la técnica de inundación con una solución de cristal violeta-oxalato (Alton *et al.* 1988. Techniques for the brucellosis laboratories. In. INRA (Ed.), Paris, France; 1988, 190 pp). Además, la nueva cepa obtenida se analizó microbiológicamente mediante las técnicas estándar para la identificación y tipificación de *Brucella* spp. Brevemente, la identificación al nivel de género se llevó a cabo mediante las pruebas de catalasa, oxidasa, ureasa y aglutinación con acriflavina. Para la identificación al nivel de especie se utilizó la prueba de sensibilidad a los bacteriófagos Tb, Wb, Iz y R/C. Finalmente, para la tipificación al nivel de biovariedad se utilizaron las pruebas de aglutinación con los sueros monoespecíficos anti-A y anti-M y de crecimiento en placas de agar y de agar suplementado con un 10% de suero bovino estéril (agar-S; Seromed, Biochrom) conteniendo las concentraciones estándar de colorantes (20 µg/mL de tionina, 20 µg/mL de fucsina y 100 µg/mL de safranina; Panreac), antibióticos (5 UI/mL de penicilina; Sigma) y eritritol (1 mg/mL; Merck). Las placas conteniendo agar y agar-S (placas control), sin o con las distintas concentraciones de todos estos productos, se incubaron durante 2-4 días a 37°C en atmósfera aerobia y, en paralelo, en atmósfera con un 10% de CO₂ (Alton *et al.* 1988. Techniques for the brucellosis laboratories. In. INRA (Ed.), Paris, France; 1988, 190 pp).

2.3. Se comprobó que tanto la incorporación como la actividad del plásmido portador del gen *gfp* en la cepa S19-GFPp es estable tras su actividad *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se realizaron subcultivos seriados de la cepa S19-GFPp en placas de agar y, tras varios pases seriados, se realizaron recuentos bacterianos en placas de agar y agar suplementado con kanamicina (antibiótico utilizado como marcador del plásmido). Como resultado, se observó que el número de UFC en ambos medios de cultivo era similar y que todas las CFU de S19-GFPp conservaban la fluorescencia, indicando que la incorporación y actividad del plásmido GFP en *B. abortus* S19 es estable tras doce subcultivos *in vitro*. Esta misma comprobación se realizó tras el aislamiento de la bacteria a partir de cuatro pases sucesivos en cultivos celulares y tres pases sucesivos en tejidos de ratones previamente inoculados con S19-GFPp (ver los estudios de caracterización biológica presentados más abajo), indicando que la incorporación y actividad del plásmido GFP en *B. abortus* S19 es estable también tras la actividad bacteriana *in vivo*, en cultivos celulares y animales de experimentación (ratones). Los plásmidos que codifican la proteína GFP permanecieron estables en *B. abortus* S19, después de congelar en 50% glicerol a -80°C ó -20°C, demostrando que todas las colonias que se recuperaron emitían fluorescencia tras la descongelación.

2.4. Se comprobó que la cepa S19-GFPp mantiene el genotipo clásico de *B. abortus* S19, conservando la característica delección de 702 pb (pares de base) en el gen *ery* (banda de bajo peso molecular, Fig. 2) y que permite diferenciar la cepa vacunal S19 de las cepas virulentas de *B. abortus* (banda de mayor peso molecular, Fig. 2).

3.- Caracterización biológica de S19-GFPp en modelos celulares y animales (ratones) ampliamente utilizados en brucellosis experimental

3.1. En modelos celulares se comprobó que:

3.1.1 - la nueva vacuna S19-GFPp posee una capacidad de adherencia e internalización en células epiteliales humanas HeLa prácticamente idéntica a la de la vacuna de referencia (Fig. 3).

3.1.2 - la capacidad de replicación de la nueva vacuna S19-GFPp en células HeLa y en macrófagos es prácticamente idéntica a la cepa parental S19 (Fig. 4).

3.2. En modelos animales se comprobó que:

3.2.1 - la nueva vacuna S19-GFPp posee una atenuación en ratones prácticamente idéntica a la de la vacuna clásica S19 (Fig. 5), indicando que la expresión del gen *gfp* utilizado no modifica la cinética esplénica (capacidad de multiplicación y persistencia) de la vacuna clásica parental.

3.2.2 - la nueva vacuna S19-GFPp confiere una protección prácticamente idéntica a la conferida por la vacuna clásica parental en el modelo murino (Fig. 6), indicando que la expresión de GFP no disminuye la eficacia de la vacuna clásica parental S19.

3.2.3 - la respuesta de anticuerpos contra el antígeno LPS de *B. abortus* inducida por la nueva vacuna S19-GFPp, medida por un ELISA indirecto convencional contra LPS (Marín *et al.*, 1999. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 6(2): 269-272), es semejante a la generada por la vacuna clásica S19 (Fig. 7). Lo que demuestra que la nueva vacuna S19-GFPp conserva intactas sus propiedades inmunogénicas.

3.2.4 - la GFP expresada en la cepa vacunal de *Brucella* S19-GFPp es altamente inmunogénica en animales. Todos los ratones inmunizados con S19-GFPp desarrollan anticuerpos específicos contra la GFP, durante al menos 90 días después de la vacunación, con positividad de aproximadamente el 40% (estadísticamente superior a la mostrada por el control positivo) en el prototipo de ELISA-GFP descrito en esta memoria.

4.- Diseño y estandarización de un ELISA indirecto para detectar los anticuerpos generados por S19-GFPp en los ratones inmunizados (ELISA-GFP)

4.1. En primer lugar, se expresó y purificó la proteína GFP recombinante (GST-GFP), de acuerdo con protocolos descritos previamente (Harlow y Lane 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. 1st. ed. Cold Spring Harbor, Laboratory, N. Y. pp. 179-179). Brevemente, la proteína de fusión GST-GFP se expresó en el sistema *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pGEX-GFP, se purificó mediante cromatografía de afinidad y su pureza se determinó mediante electroforesis en gel de acrilamida (Fig. 8A).

4.2. A continuación, se obtuvieron sueros control contra GFP en ratones, siguiendo los protocolos de inmunización convencionales. Para ello, se administró una inyección de 100 μ g de proteína GST-GFP junto con adyuvante de Freund completo, seguida de 2 inmunizaciones consecutivas separadas por una semana con la proteína GST-GFP junto con adyuvante de Freund incompleto. Las inmunizaciones se realizaron durante varias semanas hasta comprobar que los sueros de los animales inmunizados con GST-GFP mostraban bandas de precipitación en inmunodifusión en gel contra la proteína purificada GFP (Fig. 8B). Estos anticuerpos control, no mostraron reacciones cruzadas con ningún antígeno de *Brucella* (resultados no mostrados).

Adicionalmente, se obtuvieron sueros control contra GFP en ovinos, siguiendo los protocolos de inmunización convencionales. Para ello, se administró una inyección de 100 μ g de proteína GST-GFP junto con adyuvante de Freund completo, seguida de 5 inmunizaciones consecutivas separadas por dos semanas con la proteína GST-GFP junto con adyuvante de Freund incompleto. Las inmunizaciones se realizaron durante dos meses hasta comprobar que los sueros de los animales inmunizados con GST-GFP mostraban bandas de precipitación en inmunodifusión en gel contra la proteína purificada GFP (resultados no mostrados). Estos anticuerpos control, no mostraron reacciones cruzadas con ningún antígeno de *Brucella* (resultados no mostrados).

4.3. Para la estandarización del ELISA indirecto capaz de detectar específicamente anticuerpos contra la proteína GFP (ELISA-GFP) en sueros de ovejas y en suero de los ratones vacunados con la nueva vacuna S19-GFPp, se procedió de la siguiente manera:

4.3.1. Recubrimiento de las placas de 96 pocillos Immunolon II (Nunc Co.) con 1 μ g de GST-GFP por pocillo, contenidos en un volumen de 100 μ L/pocillo de una solución tampón de 0.01% de Tween 20 en PBS (PBST, de Sigma). Las placas se cubrieron con plástico adherente (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 2 horas bajo agitación, seguido de otra incubación a 4°C durante 15 horas sin agitación. Por último, se agregó un 30% de glicerol en cada pocillo, las placas se taparon con plástico adherente y se congelaron a -20°C hasta su uso.

4.3.2. Para establecer la curva patrón con sueros de ratones, las placas descritas en el punto 4.3.1. se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con una solución con 0.01% Tween y 0.1% de albúmina bovina deslipidada en PBS (PBST-BSA). A continuación, se agregaron 100 μ L/pocillo, por triplicado, de diluciones comprendidas entre 1/300 y 1/60000 del suero inmune anti-GFP de ratones descrito en el punto 4.2. Como controles negativos, se utilizaron sueros convencionales de ratones libres de *Brucella* y como blanco, PBS. Las placas se incubaron, durante 1 hora, a 25°C, en agitación; se lavaron 4 veces con PBST-BSA; se agregó un conjugado (obtenido en conejo) unido a peroxidasa (HRP) contra la IgG (H+L) de ratón; por segunda vez, se incubaron (1 hora, a 25°C, en agitación) y se lavaron (4 veces) como se ha descrito anteriormente; y, por último, se agregó sustrato para peroxidasa ABTS (Sigma). La lectura de la D.O. generada en cada pocillo, se realizó a 405 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA y se estableció la curva estándar como se muestra en la Fig. 9.a.

4.3.3. Para establecer la curva patrón con sueros de ovejas, las placas descritas en el punto 4.3.1. se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con una solución con 0.01% Tween y 0.1% de albúmina bovina deslipidada en PBS (PBST-BSA). A continuación, se agregaron 100 μ L/pocillo, por triplicado, de diluciones comprendidas entre 1/59 y 1/128000 del suero inmune anti-GFP de oveja descrito en el punto 4.X. Como controles negativos, se utilizaron sueros convencionales de ovejas libres de *Brucella* y como blanco, PBS. Las placas se incubaron, durante 1 hora, a 37°C, en agitación; se lavaron 4 veces con PBST; se agregó Proteína G peroxidasa (Sigma) en una dilución 1:2000 en PBS pH 7.2; por segunda vez, se incubaron (1 hora, a 25°C, en agitación) y se lavaron (4 veces) como se ha descrito anteriormente; y, por último, se agregó sustrato para peroxidasa ABTS (Sigma). La lectura de la D.O. generada en cada pocillo, se realizó a 405 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA y se estableció la curva estándar como se muestra en la Fig. 9.b.

4.3.4. Para determinar la intensidad de la respuesta de anticuerpos contra GFP inducida en los ratones inoculados con la nueva vacuna, se utilizaron sueros "problema" de ratones inoculados (1×10^5 UFC/ratón, vía intraperitoneal) con la nueva vacuna S19-GFPp o con una de la cepa parental S19 no marcada, y los animales fueron sangrados periódicamente, entre las 3 y 14 semanas post-inmunización (Fig. 10). Como controles positivos se utilizaron los sueros descritos en el punto 4.2. y como controles negativos, los descritos en el punto 4.3.2. Todos estos sueros se diluyeron en proporción 1/200 en PBST y el ELISA-GFP se llevó a cabo de la siguiente manera: las placas descritas en el

punto 4.3.1. se lavaron tal como se describe en el punto 4.3.2.; a continuación, se añadieron 100 μL /pocillo de los sueros descritos anteriormente (diluidos 1/200) ó 100 μL /pocillo de PBS, como blanco de la reacción; y, por último, las placas se procesaron como se describe en el punto 4.3.2. El porcentaje de positividad de cada suero individual se calculó con respecto a la densidad óptica (D.O.₄₀₅=0,9) del suero control positivo (100% positividad) y del blanco (0% positividad). Todos los animales inoculados con S19-GFPp presentaron una intensa reacción serológica contra GFP (alrededor del 40% positividad; Fig. 10) mientras que los animales inoculados con la cepa S19 se comportaron como los libres de *Brucella* (controles negativos) no reaccionando contra la proteína GFP (Fig. 10).

En conclusión, los trabajos realizados demuestran que la proteína GFP puede expresarse en cepas vacunales de *Brucella*, sin alterar las propiedades biológicas de la cepa parental e induciendo en los animales una respuesta serológica claramente distinguible de la inducida por otras cepas de *Brucella*. Los anticuerpos generados frente a la proteína GFP pueden identificarse mediante el ensayo ELISA indirecto contra GFP desarrollado en esta patente. Además, la incorporación del gen *gfp* en *Brucella* permite tanto la identificación visual (mediante iluminación ultravioleta o microscopio de fluorescencia) como la identificación molecular (mediante una PCR que amplifica el gen *gfp*; PCR-GFP) de las cepas vacunales de *Brucella* desarrolladas, a partir tanto de cultivos bacteriológicos como de muestras de tejidos, exudados o fluidos animales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cepa de *Brucella* spp. que expresa la proteína *Green Flourescent Protein* (GFP) en la elaboración de un medicamento.
2. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento para la prevención de la brucelosis en mamíferos.
- 10 3. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la cepa de *Brucella* pertenece a la especie *B. abortus*.
4. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según la reivindicación 3, donde la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de la cepa de referencia *B. abortus* S19.
- 15 5. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la cepa de *Brucella* pertenece a la especie *B. melitensis*.
- 20 6. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según la reivindicación 5, donde la cepa de *Brucella* es una cepa derivada de la cepa de referencia *B. melitensis* Rev 1.
7. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el mamífero es un rumiante.
- 25 8. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según la reivindicación 7, donde el rumiante pertenece a la subfamilia Bovinae.
9. Uso de una cepa de *Brucella* spp. según la reivindicación 7, donde el rumiante pertenece a la subfamilia Caprinae.
- 30 10. Composición que comprende una cepa de *Brucella* spp. que expresa la proteína *Green Flourescent Protein* (GFP) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Composición según la reivindicación anterior que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, que es una vacuna.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que además comprende un adyuvante.
- 40 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que adicionalmente comprende otro principio activo.
15. Método para la identificación de mamíferos tratados con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, que comprende:
- 45 a. obtener una muestra biológica aislada del mamífero,
- b. detectar la presencia del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, en la muestra biológica aislada del mamífero.
- 50 16. Método para la identificación de mamíferos tratados según la reivindicación anterior, donde la muestra biológica aislada del mamífero es un fluido biológico.
17. Método para la identificación de mamíferos tratados según la reivindicación 15, donde la muestra biológica aislada del mamífero son células o tejidos.
- 55 18. Método para la identificación de mamíferos tratados según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la detección de los productos de expresión del gen *gfp* en la muestra biológica aislada de mamífero se realiza mediante la detección de los anticuerpos anti-GFP.
- 60 19. Método para la identificación de mamíferos tratados según la reivindicación 18, donde la detección de los anticuerpos anti-GFP se realiza mediante inmunoensayo.
20. Método para la identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según la reivindicación 19, donde el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- 65 21. Método para la identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según la reivindicación 20, donde el ELISA es un ELISA indirecto.

ES 2 372 187 A1

22. Método para la identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la detección del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, se realiza por luz ultravioleta.

5 23. Método para la identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 15-17 y 22, donde la detección del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, se realiza por microscopía de fluorescencia.

10 24. Método para la identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde la detección del gen *gfp*, o de los productos de su expresión, se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

15 25. Kit de identificación de mamíferos tratados con la cepa o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende los medios adecuados para llevar a cabo un método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 15-24.

20 26. Kit de identificación según la reivindicación anterior, que comprende los medios adecuados para detectar los anticuerpos anti-GFP.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

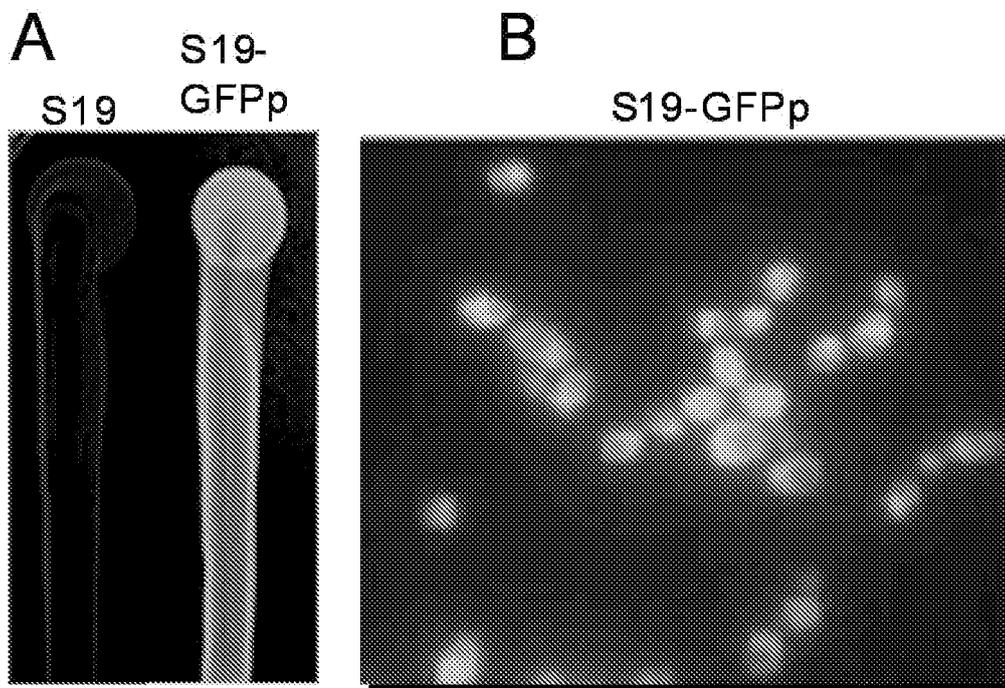


FIG. 1

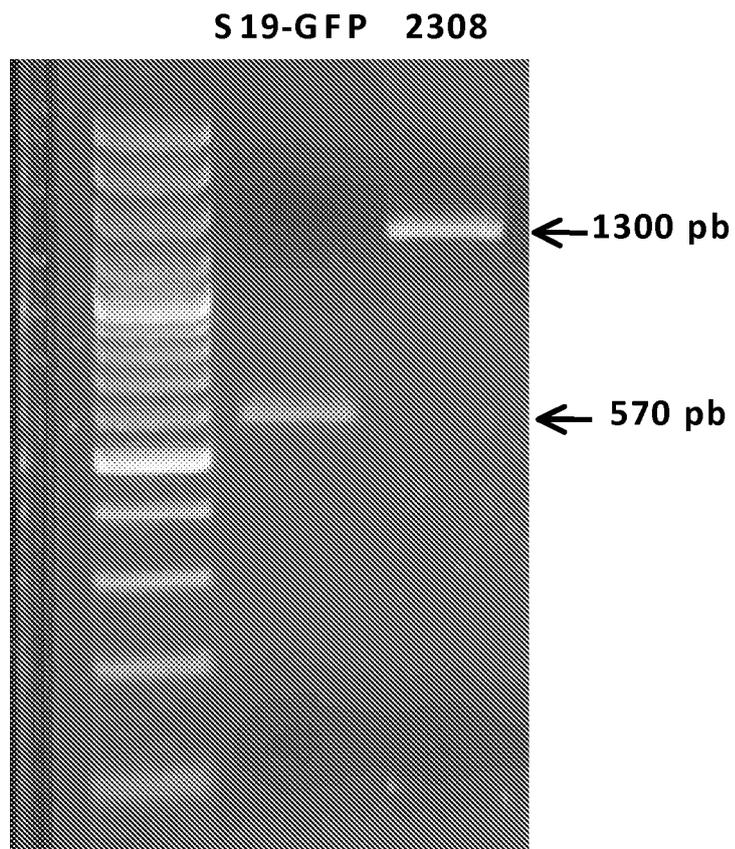


FIG. 2

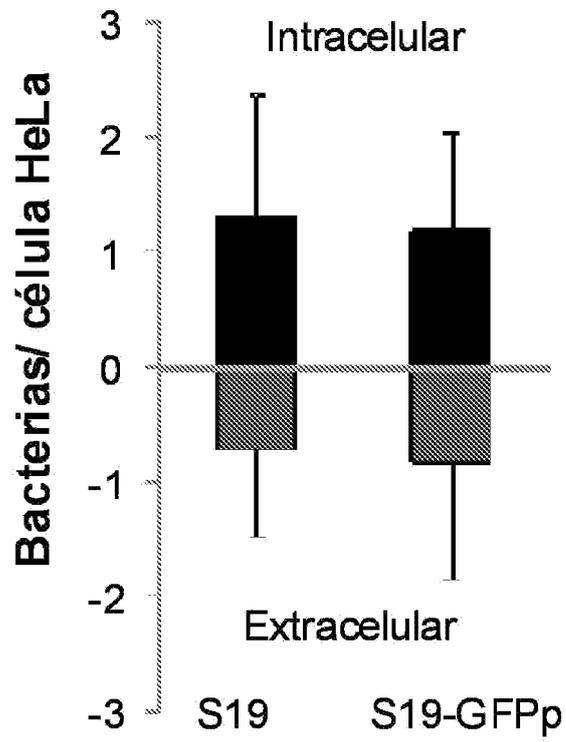


FIG. 3

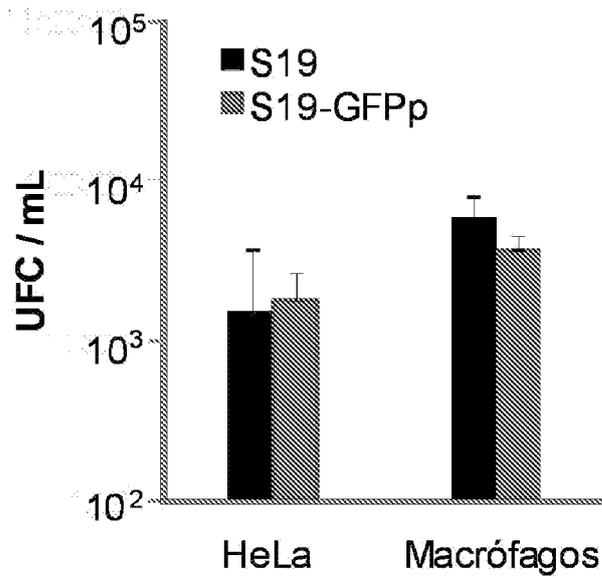


FIG. 4

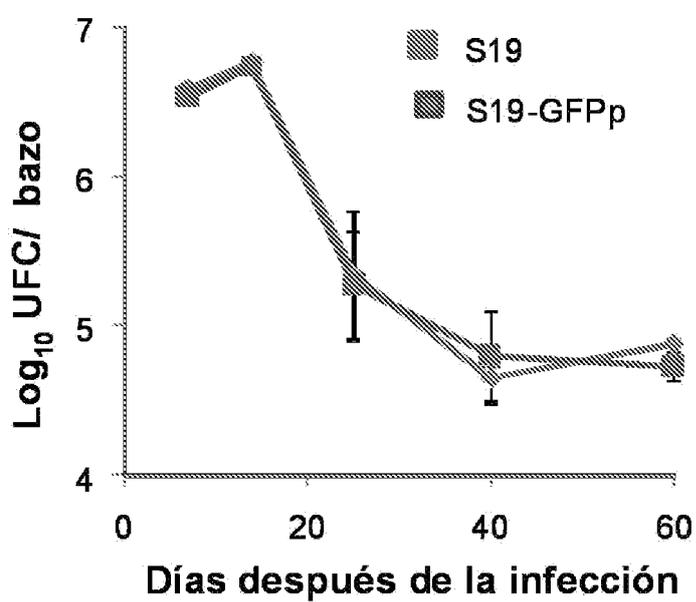


FIG. 5

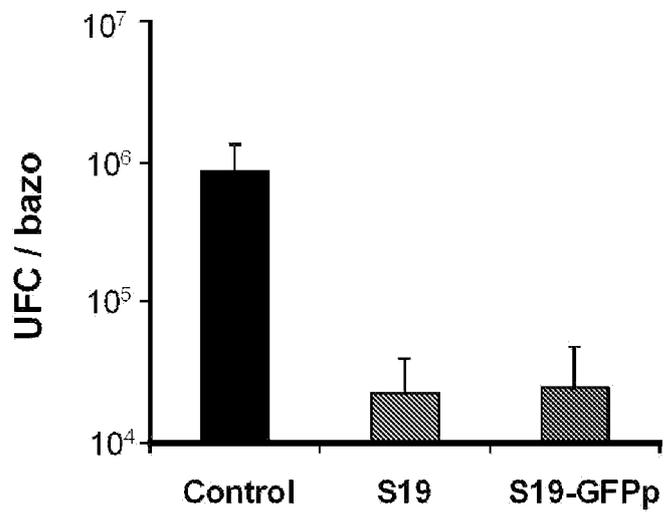


FIG. 6

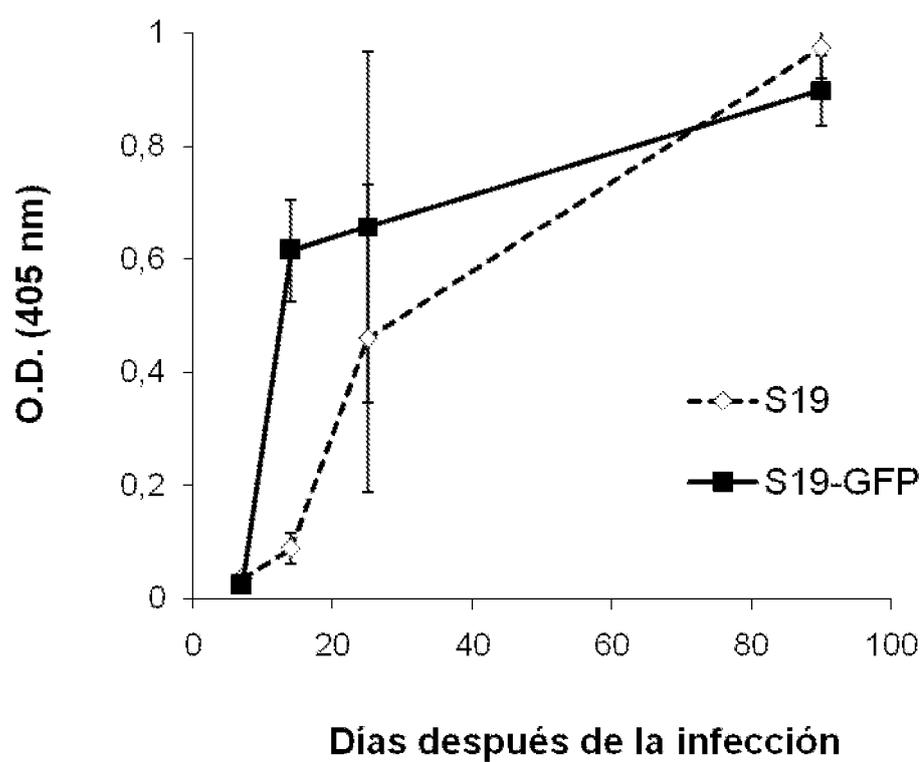


FIG. 7

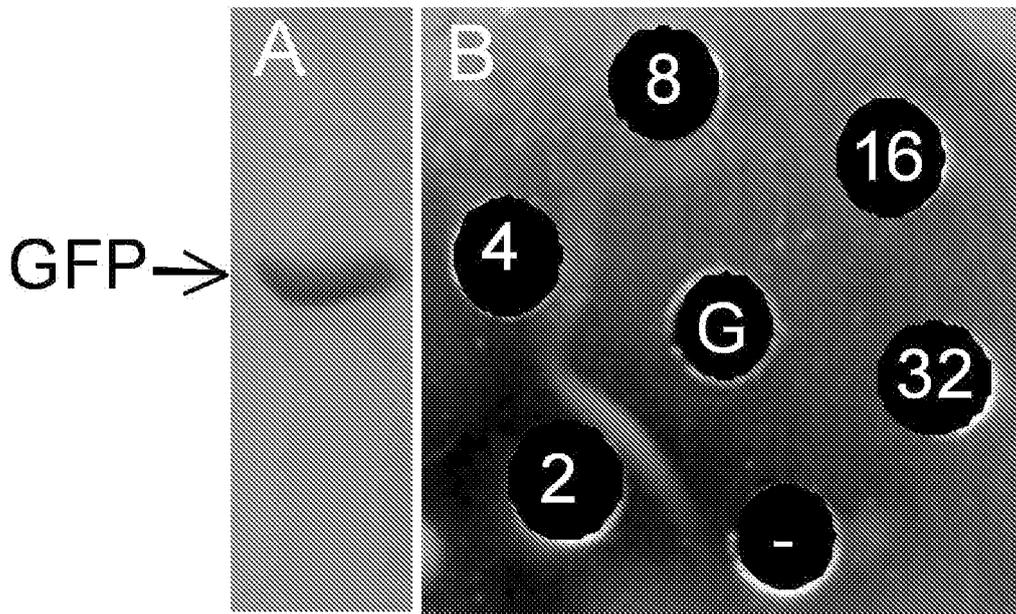


FIG. 8

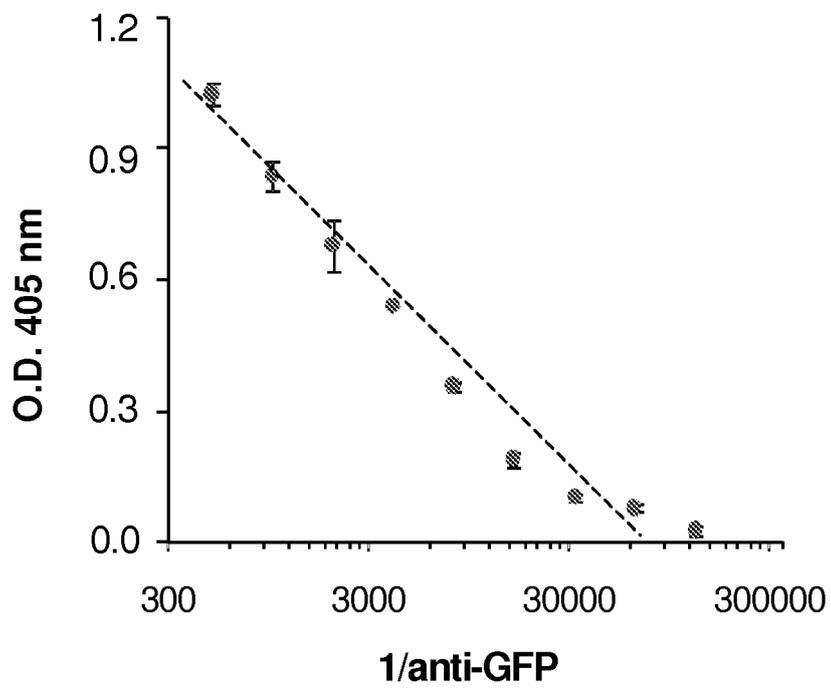


FIG. 9 A

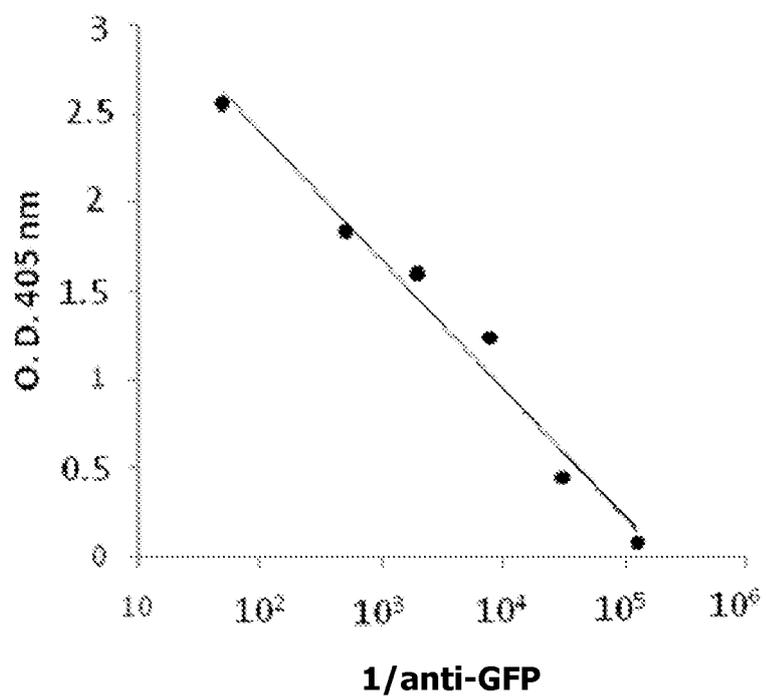


FIG. 9 B

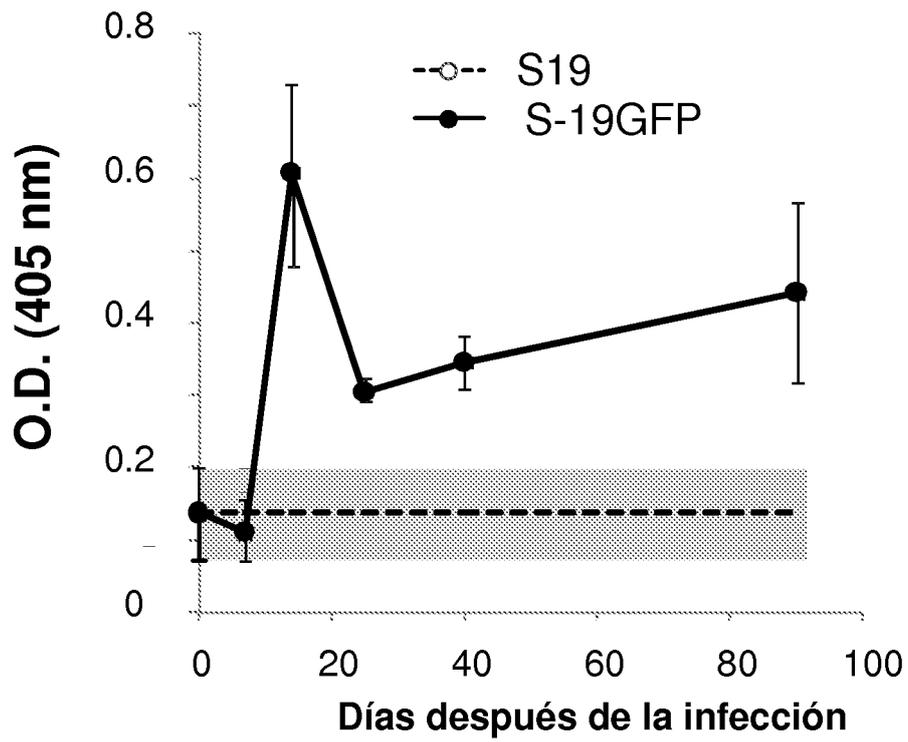


FIG. 10



②① N.º solicitud: 200931101

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K39/10** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RAJASEKARAN P. et al., "Brucella abortus strain RB51 leucine auxotroph as an environmentally safe vaccine for plasmid maintenance and antigenover expression". Applied and Enviromental Microbiology (2008), vol. 72, nº 22, pág. 7051-7055. Todo el documento.	1-3,5,7-27
Y		4,6
X	WO 2004054508 A2 (REED ARMY INST RES WALTER) 01.07.2004, todo el documento.	1-3,5,7-27
Y		4,6
Y	COMERCI D. et al., "Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain Brucella abortus S19". Infection and Immunity (1998), vol. 66, nº, 8, pág. 3862-3866. Todo el documento.	4,6
A		1-3,5,7-27
A	COLEMAN JR. et al., "mRNA-targeted fluorescentin situ hybridization (FISH) of Gram-negative bacteria without template amplification or tyrami designal amplification" Journal of Microbiological Methods (2007), 71(3), pág. 246-255. Página 247, Tabla 1.	1-27
A	CN 101240290 A (HANGZHOU NORMAL UNIVERSITY) 13.08.2008, página 11, línea 9.	1-27
A	SELEEM M. et al., "Improved expression vector for Brucella species" BioTechniques (2004), vol. 37, nº 4, pág. 740-744. Todo el documento.	1-27
A	KHOLER S. et al., "Constitutive and inducible expression of green fluorescent protein in Brucella suis". Infection and Immunity, (1999), vol. 67, nº, 12, pág 6695-6697. Todo el documento.	1-27

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
23.12.2011

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/5

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

A61K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4,6 y 7-27	SI
	Reivindicaciones 1-3 y 5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-27	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 se publica.

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	RAJASEKARAN P. et al., "Brucella abortus strain RB51 leucine auxotroph as an environmentally safe vaccine for plasmid maintenance and antigenover expression". Applied and Environmental Microbiology (2008), vol. 72, nº 22, pág. 7051-7055. Todo el documento.	
D02	WO 2004054508 A2 (REED ARMY INST RES WALTER)	01.07.2004
D03	COMERCI D. et al., "Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain Brucella abortus S19". Infection and Immunity (1998), vol. 66, nº, 8, pág. 3862-3866. Todo el documento.	

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 invención de la presente Solicitud Internacional se refiere al uso de una cepa de Brucella spp., en particular a cepa Brucella abortus S19, que expresa la proteína Green Fluorescent Protein (GFP) en la elaboración de medicamentos para la prevención de brucelosis en mamíferos, a las vacunas frente a la brucelosis, y al método de identificación de los mamíferos a los que se les ha administrado dichas vacunas. Preferiblemente el método de identificación es un inmunoensayo, y aun más preferiblemente es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

1.- NOVEDAD

El documento D01 describe una vacuna frente a la brucelosis basada en la cepa auxótrofa para leucina Brucella abortus RB51 leuB en la que se ha introducido un plásmido que expresa el gen leu y la proteína GFP como antígeno heterólogo. La proteína GFP se clonó en el plásmido pNS4 y se comprobó su expresión tanto in vivo como in vitro. Mediante ensayos tipo inmunoblot se confirmó que los ratones vacunados con la cepa RB51leuB/pNS4/GFP desarrollaron una buena respuesta de anticuerpos a frente a GFP y que la vacuna les protege frente a infecciones causadas por B. abortus 2308. En este sentido, según los autores, esta cepa y su plásmido complementario constituyen una buena alternativa para ser utilizada como una vacuna segura para el medioambiente que no contribuye a extender la resistencia a antibióticos entre otras cepas.

Esta Oficina considera que la información técnica divulgada en D01 anticipa el contenido de las reivindicaciones 1-3 y en consecuencia estas no cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP.

Por su parte el documento D02 describe una vacuna multivalente atenuada basada en una cepa mutante de Brucella que expresa un gen heterólogo y por tanto es capaz de proteger frente a brucelosis así como frente a la enfermedad que corresponda al antígeno heterólogo. En una realización particular se describe la cepa WRRP1, que es una cepa derivada de B. melitensis con una doble delección en el gen wboA y purE. La mutación en wboA se complementa con una copia intacta del gen wboA expresada in trans mediante el plásmido pGSG5 que a su vez también expresa la proteína GFP como modelo de antígeno heterólogo bajo el control del promotor groE. Según D03, cualquier cepa de Brucella se podría utilizar como cepa huésped de la invención en tanto en cuanto portaran una mutación susceptible de ser complementada.

Esta opinión de esta Oficina, la información técnica divulgada en D02 anticipa el contenido de las reivindicaciones 1-2 y 5 y en consecuencia estas no cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Esta oficina considera que a la luz del estado de la técnica establecido por D01 y D02 las reivindicaciones 7-27 no incorporan elementos técnicos relevantes y por tanto dichas reivindicaciones carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito de acuerdo al Art. 33(3) PCT.

En relación con las reivindicaciones 4 y 6 el documento D03 describe el desarrollo de un vector para la expresión de proteínas exógenas, en la cepa utilizada como vacuna Brucella abortus S19, que utiliza un fragmento de DNA que contiene las secuencias regulatorias y el péptido señal del gen Brucella bcbp31. Este fragmento se clonó en el plásmido pBBR4MCS originando el plásmido pBEV. Como marcador se utilizó un antígeno repetitivo de Tripanosoma cruzi. La proteína de fusión recombinante se expresa de forma estable y se secreta al espacio periplásmico de Brucella induciendo una buena respuesta de anticuerpos frente a T. cruzi que no altera la respuesta serológica frente al antígeno inminodominante de Brucella. Por otra parte, en el documento se demuestra que la expresión de este antígeno repetitivo no altera el patrón de crecimiento de Brucella ni origina un efecto tóxico o letal durante el curso de una infección experimental en ratones BALB/c.

Según los autores el plásmido pBBR4MCS se replica en las todas las especies de Brucella y, en consecuencia, la estrategia descrita se puede extender a otras vacunas vivas de Brucella incluyendo B. melitensis Rev1, B. suis S2 y B. abortus RB51.

De acuerdo a D03, otra posible aplicación del vector descrito es el marcaje de las vacunas de Brucella que permitiría diferenciar entre los animales vacunados e infectados. En este sentido, según D03, el uso de una vacuna con una señal inmunogénica particular como un marcador antigénico podría permitir la identificación rápida de animales vacunados mediante un simple ELISA

Esta Oficina considera que resultaría obvio para un experto en la materia combinar los conocimientos proporcionados por D03 y D01/D02 con el propósito de obtener, con unas expectativas razonables de éxito, cepas de B. abortus S19 o B. melitensis Rev1 que expresarán de forma estable GFP produciendo una buena respuesta de anticuerpos que permitiera identificar los animales vacunados. En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 4 y 6 no cumplen con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP