

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 593**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12R 1/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008 E 08830621 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2200640**

54 Título: **Cepas de Mycoplasma gallisepticum atenuadas**

30 Prioridad:

11.09.2007 US 993447 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.01.2014

73 Titular/es:

**ZOETIS W LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**KUMAR, MAHESH y
KHAN, MUHAMMAD AYUB**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 593 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

Cepas de *Mycoplasma gallisepticum* atenuadas

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a los campos de la microbiología e inmunología. Más específicamente, la invención se refiere a novedosas vacunas contra patógenos bacterianos.

Técnica anterior

- 10 Los *Mycoplasmas* son pequeños organismos procariotas (0,2 a 0,3 µm) que pertenecen a la clase *Mollicutes*, cuyos miembros carecen de pared celular y tienen un pequeño tamaño de genoma. Los *mollicutes* incluyen al menos 100 especies de *Mycoplasma*. Las especies de *Mycoplasma* son los agentes causantes de varias enfermedades en animales humanos y no humanos, además de en plantas. *M. gallisepticum*, por ejemplo, es responsable de significativas condiciones de enfermedad en aves de corral. *M. gallisepticum* está asociado a enfermedad respiratoria aguda en pollos y pavos y también puede producir enfermedad de las vías respiratorias superiores en aves de caza. Además, se ha reconocido *M. gallisepticum* como una causa de conjuntivitis en gorriones en América del Norte.

- 15 Una estrategia eficaz para prevenir y gestionar enfermedades producidas por infección por *M. gallisepticum* es por vacunación con cepas atenuadas vivas de la bacteria *M. gallisepticum*. Las ventajas de vacunas atenuadas vivas, en general, incluyen la presentación de todos los determinantes inmunogénicos relevantes de un agente infeccioso en su forma natural para el sistema inmunitario del huésped, y la necesidad de cantidades relativamente pequeñas del agente inmunizante debido a la capacidad del agente para multiplicarse en el huésped vacunado.

- 20 Las cepas de vacunas atenuadas vivas se crean frecuentemente sometiendo múltiples veces a pases sucesivos una cepa virulenta en medios. Aunque las cepas de vacunas atenuadas vivas contra *M. gallisepticum* han sido obtenidas por pases sucesivos, tales cepas están generalmente poco caracterizadas al nivel molecular. Se supone que las cepas atenuadas hechas por pases sucesivos tienen mutaciones acumuladas que hacen que los microorganismos sean menos virulentos, pero que todavía puedan replicarse. Sin embargo, con respecto a cepas de *M. gallisepticum*
- 25 atenuadas, las consecuencias de las mutaciones que producen la atenuación (por ejemplo, la identidad de proteínas cuyo patrón de expresión ha sido alterado en la cepa atenuada) son normalmente desconocidas.

- El documento US 2002/0187162 A1 se refiere a *M. gallisepticum* deficiente en citoadherencia que no expresa al menos dos de las tres proteínas, la molécula Gap-A, proteína cmA y la proteína de 45 Kd que se describe. La cepa de *M. gallisepticum* que se reivindica en el documento US 2002/0187162 A1 contiene mutaciones y características que se
- 30 diferencian de la presente invención.

- Adler y col. ("Immunological response to *Mycoplasma gallisepticum*"; Adler HE, Therlogenology, vol 6 (nº 2-3), 1 de agosto de 1976, páginas 87-91) describe inmunidad de infección por *M. gallisepticum* que es solo en parte de origen humoral. La inmunidad humoral sola no protegerá al ave contra la exposición en el alvéolo. Esta referencia muestra que los linfocitos T son de importancia en la defensa contra la infección. La inmunización descrita en aquel documento
- 35 muestra inmunización en las fosas nasales usando *M. gallisepticum* que se sometió múltiples veces a pases. Se estableció que hay una posible función de IgA y linfocinas generales en prevenir lesiones del alvéolo. No se ha facilitado caracterización adicional.

- Hudson y col. ("Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamine dehydrogenase (lpd) in a *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants". Infection and Immunity, vol 74 (nº 2), febrero de 2006) describe la atenuación de *M. gallisepticum* por alteración mediada por transposición de dihidrolipoamida deshidrogenasa, que es un componente de piruvato deshidrogenasa. Esta referencia no describe la cepa de *M. gallisepticum* de la presente invención ni los niveles particulares de proteína que se alteran.

- La base de datos UniProt, 15 de diciembre de 2003, número de acceso Q7NC76, es un número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot que describe una proteína hipotética derivada de *M. gallisepticum*. No se describe información
- 45 adicional referente a la función, rutas, etc. Esto es parte de la secuencia del genoma completo del patógeno aviar *M. gallisepticum* y referencias a Papazisi y col. (Microbiology, vol. 149, páginas 2307-2316 (2003)).

Por consiguiente, existe la necesidad en la materia de nuevas bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas que se hayan caracterizado al nivel proteómico y que sean seguras y eficaces en formulaciones de vacuna.

Breve resumen de la invención

- 50 La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que bacterias *M. gallisepticum* que

presentan expresión reducida de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 son tanto seguras como eficaces cuando se usan como una vacuna contra infección por *M. gallisepticum* en aves. El polipéptido de SEC ID N°: 1 también denomina "MGA_0621" y tiene el n° de acceso de NCBI NP_852784.

5 Por consiguiente, la presente solicitud describe bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas que presentan expresión reducida de MGA_0621, con respecto a *M. gallisepticum* natural. En una realización a modo de ejemplo no limitante específica, la solicitud describe una cepa de *M. gallisepticum* atenuada viva que presenta expresión reducida de MGA_0621, y adicionalmente presenta expresión reducida de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa y proteína ribosómica L35, con respecto a bacterias *M. gallisepticum* naturales. Según ciertas realizaciones de la presente solicitud, las bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas descritas se caracterizan por análisis proteómico por tener expresión reducida de una o más de las proteínas anteriormente mencionadas. Según una realización a modo de ejemplo de la presente solicitud, la cepa de *M. gallisepticum* atenuada viva es una cepa que presenta expresión reducida de MGA_0621, piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa y proteína ribosómica L35, con respecto a bacterias *M. gallisepticum* naturales, cepa que se depositó en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 19 de junio de 2007, y a la que se le ha asignado el n° de acceso PTA-8485. Esta cepa se denomina alternativamente en el presente documento "cepa MGx+47 de *M. gallisepticum*" o "MG-P48".

Así, según una primera realización, la presente invención proporciona la bacteria *Mycoplasma gallisepticum* atenuada viva depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-8485.

20 La presente solicitud también describe composiciones de vacuna que comprenden las bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas de la invención, además de procedimientos de vacunación de un animal contra infección por *M. gallisepticum*.

Así, según una segunda realización, la presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende: (a) la bacteria *Mycoplasma gallisepticum* atenuada viva según la primera realización; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según una tercera realización, la presente invención también proporciona la composición de vacunas según la segunda realización para su uso en vacunar un animal contra infección por *Mycoplasma gallisepticum*.

Según una cuarta realización, la presente invención también proporciona la composición de vacuna según la tercera realización, en la que dicha composición de vacuna es para administración a dicho animal por inyección directa, administración por pulverización o administración en el agua potable.

Además, la presente solicitud describe procedimientos para preparar y/o identificar clones de *M. gallisepticum* atenuados. Según este aspecto de la solicitud, los procedimientos comprenden someter una población inicial de bacterias *M. gallisepticum* a condiciones atenuantes, ensayar los clones individuales para la expresión reducida de MGA_0621, con respecto a *M. gallisepticum* natural, y probar los clones para virulencia. Los clones de *M. gallisepticum* producidos según los procedimientos de este aspecto de la solicitud presentarán expresión reducida de MGA_0621 y opcionalmente pueden presentar expresión reducida de una o más proteínas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa y proteína ribosómica L35. Preferentemente, las cepas que presentan expresión reducida de al menos una de las proteínas anteriormente mencionadas también presentan virulencia reducida con respecto a la bacteria *M. gallisepticum* natural.

40 Breve descripción del dibujo

La **Figura 1** es una fotografía de un gel de poliacrilamida bidimensional (2-D) que representa puntos de proteínas de la cepa MGx+47 de *M. gallisepticum* atenuada. Los puntos redondeados numerados 19, 49, 74, 108, 114, 127, 147, 166, 175 y 225 se corresponden con proteínas que están reguladas por incremento en MGx+47 con respecto a la cepa R-980 natural. Los puntos redondeados numerados 40, 68, 98, 99, 130, 136 y 217 se corresponden con proteínas que se regulan por disminución en MGx+47 con respecto a la cepa R-980 natural.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas que son adecuadas para su uso en formulaciones de vacuna. Las bacterias *M. gallisepticum* de la presente invención presentan expresión reducida de una proteína denominada MGA_0621. En ciertas realizaciones, las bacterias *M. gallisepticum* de la invención presentan adicionalmente expresión reducida de una o más proteínas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa y proteína ribosómica L35, con respecto a la expresión de estas proteínas en una bacteria *M. gallisepticum* natural de la misma especie.

MGA_0621 se identifica bajo el n° de acceso de NCBI NP_852784, tiene la siguiente secuencia de 162 aminoácidos:

MTRTMMKKNKAKKKERRFTDLSADLDEEVEKIDPEYEDFKEIKIEKNKDNQVIDKNDP
 FFYSEFEEARIQLIKIDKKVEVKKEEEKVQETTVMKNIKISEAKKEEAKDVYIDSSLEIAS
 QEPLTKGMHFYTNRIIRKRVRECAKNKGLSISRLITMILDKSIKEE (SEC ID N°: 1).

Expresión reducida de proteínas de mycoplasma gallisepticum

5 Un experto en la materia podrá determinar, usando técnicas de biología molecular rutinarias, si una bacteria *M. gallisepticum* atenuada presenta o no expresión reducida de una o más proteínas que normalmente se expresan en células bacterianas de *M. gallisepticum* naturales. La determinación de si una bacteria atenuada presenta o no expresión reducida de una proteína particular (por ejemplo, MGA_0621, piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa, proteína ribosómica L35, etc.) con respecto a una bacteria natural puede
 10 llevarse a cabo por varios procedimientos conocidos en la técnica. Procedimientos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, procedimientos cuantitativos basados en anticuerpos tales como transferencia Western, radioinmunoensayos (RI) y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), en los que se usa un anticuerpo que detecta y se une a la proteína de interés. Además, como los niveles de ARN mensajero (ARNm) generalmente reflejan la cantidad de proteína codificada del mismo, también pueden usarse procedimientos cuantitativos basados en ácidos nucleicos para
 15 determinar si una bacteria *M. gallisepticum* atenuada presenta o no expresión reducida de una o más proteínas. Por ejemplo, pueden usarse los procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR) para medir la cantidad de ARNm correspondiente a una proteína particular de interés. Numerosos procedimientos cuantitativos basados en ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica.

20 Lo siguiente es un procedimiento a modo de ejemplo no limitante que puede usarse para determinar si una bacteria *M. gallisepticum* atenuada presenta o no expresión reducida de una proteína tal como, por ejemplo, MGA_0621,

Primero, una población de células de *M. gallisepticum* atenuadas y una población de células de *M. gallisepticum* naturales se cultivan bajo condiciones sustancialmente idénticas en sustancialmente el mismo medio de cultivo. A continuación, las dos poblaciones de células se someten a condiciones de rotura de las células. Las células rotas (o las fracciones que contienen proteína de las mismas) se someten, en paralelo, a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y luego a transferencia Western usando un anticuerpo que se une a la proteína MGA_0621
 25 de *M. gallisepticum* (tales anticuerpos pueden obtenerse usando procedimientos convencionales que son muy conocidos en la técnica). Un anticuerpo secundario marcado se aplica entonces con el fin de proporcionar una señal medible que sea proporcional a la cantidad de proteína derivada de las células. Si la cantidad de señal mostrada por la cepa de *M. gallisepticum* atenuada es inferior a la cantidad de señal mostrada por la cepa de *M. gallisepticum* natural,
 30 entonces puede llegarse a la conclusión de que la cepa atenuada presenta expresión reducida de MGA_0621 con respecto a la cepa natural. Variaciones en este procedimiento a modo de ejemplo, además de alternativas al mismo, serán inmediatamente evidentes para expertos en la materia.

La presente solicitud describe bacterias *M. gallisepticum* atenuadas que presentan cualquier grado de reducción en la expresión de una proteína (por ejemplo, MGA_0621, piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-
 35 5-fosfato aldolasa, proteína ribosómica L35, etc.) en comparación con la expresión de esa proteína observada en una cepa natural. En ciertas realizaciones de la solicitud, la bacteria atenuada presenta al menos aproximadamente el 5% menos de expresión de la proteína con respecto a una bacteria natural. Como ejemplo, si una cantidad dada de una cepa de *M. gallisepticum* natural presenta 100 unidades de expresión de una proteína particular y la misma cantidad de una cepa de *M. gallisepticum* atenuada candidata presenta 95 unidades de expresión de la proteína, entonces se
 40 concluye que la cepa atenuada presenta el 5% menos de expresión de la proteína con respecto a la bacteria natural (ejemplos adicionales para calcular "porcentaje de menos expresión" se exponen en cualquier parte en el presente documento). En ciertas otras realizaciones, la bacteria atenuada presenta al menos aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 36%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 85%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
 45 96%, 97%, 98% o el 99% menos de expresión de la proteína con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural. En todavía otras realizaciones, la cepa de *M. gallisepticum* atenuada no presenta expresión (es decir, 100% menos de expresión) de la proteína con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo de la presente solicitud, la bacterias atenuadas presentan al menos 5% menos de expresión de MGA_0621, y opcionalmente al menos 5% menos de expresión de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato
 50 aldolasa y proteína ribosómica L35 con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje menos de expresión" de una proteína particular mostrada por una cepa de *M. gallisepticum* atenuada con respecto a una cepa natural se calcula por la siguiente fórmula: $(A - B) / A \times 100$; en la que A = el nivel de expresión relativo de la proteína en una cepa de *M. gallisepticum* natural; y B = el nivel de expresión relativo de la proteína en la cepa atenuada. Únicamente con el fin de ilustración, si una cepa de *M. gallisepticum* natural mostró 0,2500 unidades de expresión de proteína "Y" y una cepa de *M. gallisepticum* atenuada
 55 mostró 0,1850 unidades de expresión de proteína "Y", entonces se dice que la cepa atenuada presenta $[(0,2500 - 0,1850) / 0,2500 \times 100] = 26\%$ menos de expresión de proteína "Y" con respecto a la cepa natural. La Tabla 5 en el

Ejemplo 3 en el presente documento proporciona ejemplos ilustrativos adicionales del porcentaje menos de expresión calculado para una cepa de *M. gallisepticum* atenuada a modo de ejemplo con respecto a una cepa de *M. gallisepticum* natural.

Composiciones de vacuna

5 La presente solicitud también describe composiciones de vacuna que comprenden una bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión “bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva de la invención” engloba cualquier bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva que se describe y/o reivindica en cualquier parte en el presente documento. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua, un estabilizador, un conservante, medio de cultivo o un
10 tampón. Las formulaciones de vacuna que comprenden las bacterias *M. gallisepticum* atenuadas de la invención pueden prepararse en forma de una suspensión o en una forma liofilizada o, alternativamente, en una forma congelada. Si está congelada, puede añadirse glicerol u otros agentes similares para potenciar la estabilidad cuando se congelan.

Procedimientos de vacunación de un animal

15 La presente solicitud también describe procedimientos de vacunación de un animal contra infección por *M. gallisepticum*. Los procedimientos según este aspecto de la solicitud comprenden administrar a un animal una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición de vacuna que comprende una bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión “bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva de la invención” engloba cualquier bacteria *M. gallisepticum* atenuada viva que se describe y/o reivindica en cualquier parte
20 en el presente documento. La expresión “cantidad inmunológicamente eficaz” significa la cantidad de composición de vacuna requerida para provocar la producción de niveles protectores de anticuerpos en un animal tras la vacunación. La composición de vacuna puede administrarse al animal en cualquier modo conocido en la técnica que incluye vías orales, intranasales, mucosas, tópicas, transdérmicas y parenterales (por ejemplo, intravenosas, intraperitoneales, intradérmicas, subcutáneas o intramusculares). La administración también puede lograrse usando dispositivos de
25 administración sin aguja. La administración puede lograrse usando una combinación de vías, por ejemplo, primero administración usando una vía parenteral y posterior administración usando una vía mucosa, etc.

El animal al que se administra la cepa de *M. gallisepticum* atenuada es preferentemente un ave, por ejemplo, un pollo o un pavo. Si el animal es un ave, las formulaciones de vacuna de la invención pueden administrarse de forma que las formulaciones se pongan inmediatamente o eventualmente en contacto con las membranas mucosas respiratorias del
30 ave. Así, las formulaciones de vacuna pueden administrarse a aves, por ejemplo, intranasalmente, por vía oral y/o intraocularmente. La composiciones de vacuna para administración aviar pueden formularse como se ha descrito anteriormente y/o en una forma adecuada para administración por pulverización, que incluye aerosol (para administración intranasal) o en agua potable (para administración por vía oral).

Las composiciones de vacuna de la presente invención que se administran por pulverización o aerosol pueden formularse incorporando las bacterias *M. gallisepticum* atenuadas vivas en pequeñas partículas de líquido. Las partículas pueden tener un tamaño de gotita inicial de entre aproximadamente 10 µm y aproximadamente 100 µm. Tales partículas pueden generarse, por ejemplo, por aparato de pulverización convencional y generadores de aerosol, que incluyen generadores de pulverización comercialmente disponibles para pulverización en mochila, pulverización en criadero y pulverización con Atomist.
35

Procedimientos para la preparación de clones de *m. gallisepticum* atenuados

En otro aspecto de la presente solicitud se describen procedimientos para identificar y/o preparar clones de *M. gallisepticum* atenuados. Los procedimientos según este aspecto de la solicitud comprenden someter una población inicial de bacterias *M. gallisepticum* a condiciones atenuantes, produciendo así una población bacteriana putativamente atenuada. A continuación, los clones individuales de la población bacteriana putativamente atenuada se ensayan para
45 expresión reducida de MGA_0621 con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural. Los clones que se identifica que tienen expresión reducida de MGA_0621 se prueban entonces para virulencia. Los clones que presentan tanto expresión reducida de MGA_0621 como virulencia reducida con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural se identifican como clones de *M. gallisepticum* atenuados.

Según este aspecto de la solicitud, la “población inicial de bacterias *M. gallisepticum*” puede ser cualquier cantidad de bacterias *M. gallisepticum*. Las bacterias, en ciertas realizaciones, son bacterias naturales. Alternativamente, las bacterias pueden contener una o más mutaciones. Preferentemente, sin embargo, las bacterias en la población inicial son clónicamente idénticas o sustancialmente clónicamente idénticas; es decir, las bacterias se derivan todas preferentemente de una única célula bacteriana de *M. gallisepticum* parental y/o tienen características genotípicas y/o fenotípicas idénticas o sustancialmente idénticas.
50

Como se usa en el presente documento, el término “condiciones atenuantes” significa cualquier condición o combinación de condiciones que tenga el potencial para introducir uno o más cambios genéticos (por ejemplo, mutaciones de nucleótidos) en el genoma de una bacteria *M. gallisepticum*. Condiciones atenuantes no limitantes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, someter a pases las bacterias en cultivo, transformar las bacterias con un elemento genético insertable en el genoma tal como un transposón (por ejemplo, un transposón que se inserta aleatoriamente en el genoma de *M. gallisepticum*), exponer las bacterias a uno o más mutágenos (por ejemplo, mutágenos químicos o luz ultravioleta), etc. Si las células bacterianas se atenúan sometiéndolas a pases *in vitro*, las células pueden someterse a pases cualquier número de veces, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más veces *in vitro*.

La población inicial de células de *M. gallisepticum*, después de haberse sometido a condiciones atenuantes, se denomina en el presente documento una población bacteriana putativamente atenuada. Los clones individuales de la población bacteriana putativamente atenuada pueden obtenerse por técnicas de microbiológica convencional que incluyen, por ejemplo, diluir sucesivamente las células y sembrar las células individuales sobre medios apropiados. Una vez obtenidos, los clones individuales de la población bacteriana putativamente atenuada se ensayan para expresión reducida de MGA_0621 y/o una o más proteínas especificadas adicionales. Los procedimientos para determinar si una bacteria *M. gallisepticum* atenuada presenta o no expresión reducida de una o más proteínas que normalmente se expresan en células bacterianas de *M. gallisepticum* naturales se describen en cualquier parte en el presente documento. Procedimientos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, procedimientos basados en RT-PCR, transferencia Western, etc.

Los clones individuales que se identifican por tener expresión reducida de MGA_0621 pueden probarse para virulencia por la administración de los clones a un animal que es susceptible a infección por la versión natural (sin atenuar) de la bacteria. Como se usa en el presente documento, “un animal que es susceptible a infección por una bacteria *M. gallisepticum* natural” es un animal que muestra al menos un síntoma clínico después de exponerse a una bacteria *M. gallisepticum* natural. Tales síntomas son conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, en el caso de una cepa de *M. gallisepticum* putativamente atenuada que presenta expresión reducida de, por ejemplo, MGA_0621, la cepa puede administrarse a, por ejemplo, pavos o pollos (que son normalmente susceptibles a infección por *M. gallisepticum* natural). Los síntomas clínicos de infección por *M. gallisepticum* de aves de corral incluyen, por ejemplo, síntomas respiratorios agudos, pericarditis, perihepatitis, aerosaculitis, engrosamiento de la tráquea, aumento de peso reducido, deciliación, células calciformes anormales, distensión capilar, números elevados de linfocitos, células plasmáticas y/o heterófilos, y en algunos casos producción reducida de huevos. Así, si la cepa de *M. gallisepticum* putativamente atenuada, cuando se administra a un pollo o pavo, produce menos síntomas y/o síntomas menos graves con respecto a un pavo o pollo que se ha infectado por una cepa de *M. gallisepticum* natural, entonces se considera que la cepa de *M. gallisepticum* putativamente atenuada tiene “virulencia reducida”. Cualquier grado de reducción en síntomas identificará la cepa putativamente atenuada como que tiene virulencia reducida. En ciertas realizaciones, la cepa putativamente atenuada será avirulenta.

Según la presente invención, un clon de *M. gallisepticum* que presenta expresión reducida de MGA_0621 (y/o una o más proteínas especificadas adicionales) y que presenta virulencia reducida con respecto a una bacteria *M. gallisepticum* natural es un clon de *M. gallisepticum* atenuado. Un clon de *M. gallisepticum* atenuado vivo a modo de ejemplo de la presente invención, que presenta expresión reducida de MGA_0621 (junto con expresión reducida de piruvato deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa y proteína ribosómica L35) es la cepa designada MGx+47. MGx+47 se ha depositado en la Colección americana de cultivos tipo, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 19 de junio de 2007, y a la que se le asignó el número de acceso PTA-8485.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes, del procedimiento y composiciones de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de una cepa de *m. gallisepticum* atenuada viva

Se generó una nueva cepa de *Mycoplasma gallisepticum* atenuada viva pasando una cepa de *M. gallisepticum* natural R980 múltiples veces *in vitro*. En particular, 0,1 ml de material de semilla de la cepa de *M. gallisepticum* natural R-980 se inoculó en 20 ml de medio de Frey modificado (Frey y col., Am. J. Vet. Res. 29:2163-2171 (1968) (también denominado en el presente documento “medio de cultivo MG”). Las células naturales se cultivaron hasta que el medio cambió de color a amarillo brillante. Los cultivos amarillos brillantes se usaron posteriormente para re-inocular el medio de cultivo MG fresco como se ha descrito anteriormente. El cultivo se sometió a pases un total de 47 veces de este modo. La cepa resultante se probó para atenuación vacunando grupos de aves, seguido de exposición usando *M. gallisepticum* natural. A todas las aves se les hizo la autopsia dos semanas después de la exposición y se observaron las patologías relacionadas con *Mycoplasma*. La cepa de alto pase (x+47) proporcionó protección contra los signos

clínicos asociados a infección por *Mycoplasma gallisepticum*. Esta cepa de *M. gallisepticum* atenuada designada MGx+47 se depositó en la Colección americana de cultivos tipo, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, el 19 de junio de 2007, y se le asignó el número de acceso PTA-8485.

Ejemplo 2

5 Evaluación de seguridad y eficacia de una vacuna de *m. gallisepticum* atenuada viva en pollos

En este ejemplo se evaluó la seguridad y eficacia de la nueva cepa de la vacuna de *M. gallisepticum* MGx+47 obtenida en el Ejemplo 1 en pollos.

Setenta y un pollos Leghorn blancos SPF se dividieron en siete grupos del siguiente modo:

Tabla 1: Diseño del estudio

Grupo	Nº de pollos	Vacunados	Expuestos
1	11	No	Yes
2	10	Sí	No
3	11	Sí	Sí
4a	10	Sí	No
4b	11	Sí	No
4c	9	Sí	No
5	9	No	No

10

Los pollos en los grupos 2, 3, 4a, 4b y 4c se vacunaron con la cepa MGx+47 atenuada a $3,62 \times 10^7$ UCC/ml/ave, administrada por pulverización densa a las 4 semanas de edad. Los pollos en los grupos 1 y 3 se expusieron intratraquealmente (IT) a las 7 semanas de edad a 0,5 ml de cepa de *Mycoplasma gallisepticum* R a $7,74 \times 10^5$ UCC/ml. La autopsia se realizó en los pollos de los grupos 1, 2, 3 y 5 a las 9 semanas de edad, y la autopsia se realizó en los pollos de los grupos 4a, 4b y 4c 7, 14 y 21 días después de la vacunación (DDV), respectivamente. Los pollos se evaluaron para aumento de peso promedio, pericarditis, perihepatitis, aerosaculitis y traqueítis. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

15

Tabla 2: Resumen de seguridad y eficacia Vacunación = $3,62 \times 10^7$ UFC/ml/ave Exposición = $0,5 \text{ ml a } 7,74 \times 10^5$ UFC/ml

Grupo	Vacunado	Expuesto	Aumento de peso promedio (kg/día)	Pericarditis	Perihepatitis	Aerosaculitis	Puntuación de aerosaculitis (promedio de positivos)	Tráquea (histología)
1	No	Sí	0,016	0/11	0/11	9/11	3,56	Traqueítis grave
2	Sí	No	0,018	0/10	0/10	0/10	0	Normal
3	Sí	Sí	0,017	0/11	0/11	2/11	2,5	Traqueítis mixta
4a	Sí	No	0,016	0/9	0/9	0/9	0	Normal
4b	Sí	No	0,017	0/11	0/11	0/11	0	Normal
4c	Sí	No	0,017	0/10	0/10	0/10	0	Normal
5	No	No	0,015	0/9	0/9	0/9	0	Normal

Tabla 3: Tabla de seguridad: Informe de histología de tráqueas de pollo fijadas en formalina de pollos vacunados/sin exponer individuales (grupo 4a, 4b y 4c)

Momento de tiempo	Pollo	Cilios	Células caliciformes/M	Distensión capilar	LC/PC	PMN	Espesor (micrómetros)
7 DDV	1	N	-	-	-	-	30
	2	N	-	-	-	-	30
	3	N	-	-	-	-	30
	4	N	-	-	-	+	30
	5	N	-	-	-	-	30
	6	N	-	-	-	+	30
	7	N	-	-	-	+	30
	8	N	-	-	-	-	30
	9	N	+	-	-	-	30
14 DDV	1	N	-	-	-	-	50
	2	N	+	-	-	-	50
	3	N	-	-	-	+	50
	4	N	-	-	-	-	50
	5	N	-	-	-	-	50
	6	N	-	-	-	-	50
	7	N	-	-	-	-	50
	8	N	-	-	-	-	50
	9	N	-	-	-	+	50
	10	N	-	-	-	-	50
	11	N	-	-	-	+	50
21 DDV	1	N	-	-	-	-	50
	2	N	-	-	-	++	110
	3	N	-	-	-	-	50
	4	N	-	-	-	-	50
	5	N	-	-	-	-	50
	6	N	-	-	-	+	50
	7	N	-	-	-	-	50
	8	N	-	-	-	-	50
	9	N	-	-	-	-	50
	10	N	-	-	-	-	50

Tabla 4: Tabla de eficacia: Informe de histología de tráqueas de pollo fijadas en formalina de pollos individuales

Grupo	Pollo	Cilios	Células caliciformes/M	Distensión capilar	LC/PC	PMN	Espesor (micrómetros)
1	Sin vacunar; expuestos						
	1	-	+	++	++++	++	410
	2	+/-	-	-	+	-	90
	3	N	+	-	-	-	50
	4	-	-	++++	++++	-	420
	5	N	+	+	+	-	60
	6	-	+	++++	++++	+++	400
	7	-	-	++++	++++	-	440
	8	-	-	++++	++++	++++	280
	9	-	+	-	-	-	40
	10	-	-	++++	++++	-	260
	11	-	+	++++	++++	+++	450
3	Vacunados y expuestos						
	1	-	-	++	++++	-	380
	2	N	-	+	+	-	40
	3	N	-	+	+	-	50
	4	-	-	+	+++	++	220
	5	N	-	+	+	-	60
	6	N	-	+	+	-	60
	7	N	-	-	-	-	50
	8	N	-	-	-	-	50
	9	N	-	+	+	-	50
10	+/-	-	+	++	-	140	
5	Sin vacunar; sin exponer						
	1	N	-	-	+	-	50
	2	N	-	-	+	-	50
	3	N	-	-	-	-	50
	4	N	-	-	+	-	50
	5	N	-	-	-	-	50
	6	N	-	-	-	+	-
7	N	-	-	-	-	-	50

(continuación)

	8	N	-	-	+	-	50
	9	N	-	-	-	-	50

Clave para las tablas de seguridad y eficacia (tablas 3 y 4):

- 5 • Todas las aves “vacunadas” se vacunaron por pulverización densa con la cepa de vacuna MGx+47 a $3,62 \times 10^7$ UCC/ml/ave;
- Todas las aves “expuestas” se expusieron intratraquealmente (IT) a 0,5 ml de cepa de *Mycoplasma gallisepticum* R a $7,74 \times 10^5$ UCC/ml
- Momento de tiempo (en la Tabla 3: Tabla de seguridad) = número de días después de la vacunación cuando los pollos se examinaron, expresado como nº de días después de la vacunación (DDV).
- 10 • Cilios: “N” = cilios normales; “-” = deciliación;
- Células caliciformes/M (“-” = células caliciformes normales; “+” = moco que se encuentra sobre la superficie respiratoria);
- Distensión capilar (“-” = sin distensión o inflamación; “+” = distensión capilar o inflamación moderada; “++” = distensión capilar o inflamación grave);
- 15 • LC/PC = Linfocitos y células plasmáticas (“-” = ninguna; “+” = pocas; “++++” = numerosas);
- PMN = Heterófilos (“-” = ninguno; “+” = pocos; “++++” = numerosos);

El análisis de histología de los pollos del grupo 2 (vacunados pero no expuestos) fue sustancialmente similar al de los pollos del grupo 5 (sin vacunar, sin exponer), demostrando la seguridad de la cepa de vacuna MGx+47 recientemente generada (véase, por ejemplo, la Tabla 2 anterior).

- 20 Con respecto a la eficacia, los pollos del grupo 3 (vacunados y expuestos) mostraron aerosaculitis significativamente reducida en comparación con los pollos del grupo 1 (sin vacunar y expuestos) (véanse, por ejemplo, las Tablas 2 y 4). Además, como se ilustra en la Tabla 4, los pollos del grupo 3 presentaron menores signos histológicos de infección por *M. gallisepticum* con respecto a cilios, células caliciformes, distensión capilar, linfocitos y células plasmáticas (LC/PC), heterófilos (PMN) y espesor de la tráquea (véase la Tabla 4).
- 25 Así, este ejemplo demuestra que MGx+47 es una cepa de vacuna de *M. gallisepticum* atenuada viva segura y eficaz.

Ejemplo 3Caracterización proteómica de la cepa de vacuna mgx+47

En un esfuerzo por definir más precisamente la cepa de la vacuna MGx+47 (véanse los Ejemplos 1 y 2) al nivel molecular, se realizó un análisis proteómico de esta cepa.

- 30 En este ejemplo, proteína total se aisló de la cepa de *M. gallisepticum* natural R-980 y de la cepa de vacuna recientemente identificada MGx+47. Las proteínas de cada cepa se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional, seguido de análisis computerizado de las imágenes del gel (véase la Figura 1). Se identificaron manchas de proteína que se expresaron diferencialmente en la cepa de vacuna. Las manchas de proteína que estuvieron ausentes, o se expresaron a niveles significativamente reducidos, en la cepa de vacuna en comparación con la cepa natural se escindieron del gel.
- 35

- Se identificaron cinco manchas que se expresaron a niveles significativamente menores en la cepa de vacuna MGx+47 con respecto a *M. gallisepticum* natural. Cada una de estas manchas de proteína se escindió del gel y se digirió enzimáticamente. Seguido de huella peptídica usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz (EM MALDI-TOF). Los espectros de masas identificados para cada mancha de proteína se compararon con una base de datos de masas de péptidos para identificar las proteínas y los genes correspondientes que las codifican. Los resultados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:
- 40

Tabla 5: Resumen del análisis proteómico de MGx+47

Gen	Producto	Función	Nivel de expresión en MG natural	Nivel de expresión en MGx+47	Disminución del porcentaje en la expresión
<i>acoA</i>	Piruvato deshidrogenasa	Requerida para la producción y conversión de energía (ciclo de Krebs)	0,1872	0,0858	54,2%
<i>eno</i>	Fosfo-piruvato hidratasa	Cataliza la formación de fosfoenol-piruvato	0,0683	0,0173	74,7%
<i>deoC</i>	2-Desoxirribosa-5-fosfato aldolasa	Requerida para el metabolismo de nucleótidos	0,0525	0,0309	41,1%
<i>rpmI</i>	Proteína ribosómica L35	Traducción, estructura ribosómica y biogénesis	0,1171	0,0259	77,9%
MGA_0621	Proteína hipotética	Desconocida	0,4534	0,0835	81,6%

5 La disminución en la expresión de los productos génicos también puede expresarse en términos de “veces de disminución en la expresión”. Por ejemplo, en la Tabla 5, puede decirse que la cepa MGx+47 presenta una disminución de 2,2, 3,9, 1,7, 4,5 y 5,4 veces en la expresión de *acoA*, *eno*, *deoC*, *rpmI* y MGA_0621, respectivamente, con respecto a MG natural.

10 Como se indica en la Tabla 5, se identificaron cinco productos génicos que tenían expresión significativamente reducida en la cepa de vacuna MGx+47 atenuada viva con respecto a la cepa R-980 natural: *AcoA*, *Eno*, *DeoC*, *Rmpl*, y MGA_0621 (una proteína hipotética identificada bajo el número de acceso de NCBI NP_852784). La mayor disminución en la expresión se observó para MGA_0621. Así, es probable que mutaciones o condiciones de crecimiento que producen una disminución en la expresión de MGA_0621 produzcan la atenuación de *M. gallisepticum*. Por tanto, parece que la regulación por disminución de MGA_0621 es una estrategia eficaz para producir cepas de *M. gallisepticum* atenuadas.

Listado de secuencias

- 15 <110> Wyeth
Kumar, Mahesh
Khan, Muhammad Ayub
- <120> Cepas de *Mycoplasma gallisepticum* atenuadas
- 20 <130> AM102888
- <150> 60/993447
<151> 11/09/2007
- 25 <160> 1
<170> PatentIn versión 3.4

ES 2 437 593 T3

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> Mycoplasma gallisepticum

5

<400> 1

```

Met Thr Arg Thr Met Lys Asn Lys Lys Ala Lys Lys Lys Glu Arg Arg
 1      5      10     15
Phe Thr Asp Leu Ser Ala Asp Leu Asp Glu Glu Val Glu Lys Ile Asp
 20     25
Pro Glu Tyr Glu Asp Phe Lys Glu Ile Lys Ile Glu Lys Asn Lys Asp
 35     40     45
Asn Gln Val Ile Asp Lys Asn Asp Pro Phe Phe Tyr Ser Glu Ser Phe
 50     55     60
Glu Glu Ala Arg Ile Gln Leu Ile Lys Asp Lys Lys Val Glu Val Lys
 65     70     75
Lys Glu Glu Glu Lys Val Gln Glu Thr Thr Val Lys Asn Lys Ile Ser
 85     90     95
Glu Ala Lys Lys Glu Glu Ala Lys Asp Val Tyr Ile Asp Ser Ser Leu
 100    105
Glu Ile Ala Ser Gln Glu Pro Leu Thr Lys Gly Met His Phe Tyr Thr
 115    120    125
Asn Ser Arg Ile Ile Arg Lys Val Arg Glu Cys Ala Lys Asn Lys Gly
 130    135    140
Leu Ser Ile Ser Arg Leu Ile Thr Met Ile Leu Asp Lys Ser Ile Lys
 145    150    155    160

```

REIVINDICACIONES

1. La bacteria *Mycoplasma gallisepticum* viva atenuada depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-8485.

2. Una composición de vacuna que comprende:

(a) la bacteria *Mycoplasma gallisepticum* viva atenuada según la reivindicación 1; y

5 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición de vacuna según la reivindicación 2 para su uso en vacunar un animal contra infección por *Mycoplasma gallisepticum*.

10 4. La composición de vacuna para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha composición de vacuna es para administración a dicho animal por inyección directa, administración por pulverización o administración en el agua potable.

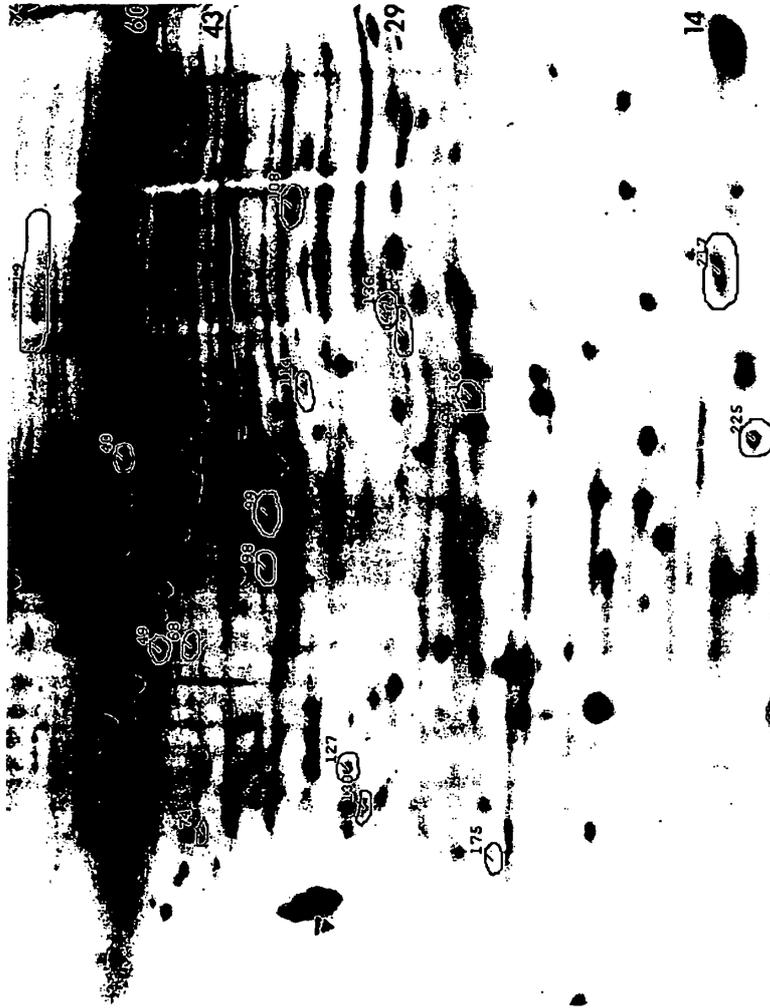


FIG. 1