

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 325**

51 Int. Cl.:

C12R 1/42 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/EP2013/068373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13765974 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2929058**

54 Título: **Preparación de vacunas vivas**

30 Prioridad:

07.12.2012 EP 12008206

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

17.10.2018

73 Titular/es:

**LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH (100.0%)
Heinz-Lohmann-Strasse 4
27472 Cuxhaven, DE**

72 Inventor/es:

**LINDE, KLAUS y
GROSSE-HERRENTHEY, ANKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 325 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

Preparación de vacunas vivas

La presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de una vacuna viva que contiene bacterias estables que llevan al menos tres mutaciones atenuantes y una vacuna que contiene bacterias obtenidas por dicho procedimiento. El documento WO 95/07101 desvela vacunas de *Salmonella* vivas. Muchas de las vacunas bacterianas comprenden bacterias atenuadas que se han manipulado por técnicas biomoleculares. Desafortunadamente, muchas de estas vacunas se consideran ser insuficientes para cumplir los requisitos de práctica por las siguientes razones:

- (a) La producción es compleja y consume tiempo, el grado de atenuación no puede controlarse y, en consecuencia, la adaptación a la susceptibilidad del hospedador se a menudo insatisfactoria.
- (b) Los procedimientos de ensayo (pruebas clínicas) requeridos por la autoridad legislativa también son elaborados.
- (c) La población a vacunarse es limitada.

En contraste, los mutantes atenuados por deriva metabólica (DM) se caracterizan por las siguientes ventajas:

- (a) Los costes para la preparación son bajos y el grado de atenuación a través de la selección deseada de un tiempo de generación aumentado y, de esta manera, el tamaño de colonias reducido, respectivamente, es, en principio, casi arbitrario.
- (b) Cuando se usan cepas de vacuna específicas estables que tienen tres mutaciones DM atenuadas para la vacunación de animales de granja, no se requieren procedimientos de ensayo elaborados.
- (c) Incluso tamaños de lote más pequeños darán sus frutos.

En lo que se refiere a datos clave del principio evolutivo de la atenuación DM lo siguiente debe estresarse:

- (a) La interacción del agente patógeno frente al hospedador se basa en la tolerancia mutua. Los hospedadores altamente susceptibles sobreviven como individuos únicos cuando se infectan accidentalmente por un mutante atenuado de un agente patógeno altamente virulento. La población de hospedador rejuvenece a través de los pocos individuos supervivientes. El agente patógeno prolifera como cepa atenuada adaptada. La mixomatosis es un ejemplo típico de dicho proceso. Conclusión: Las poblaciones bacterianas (así como las poblaciones de hongos y virus) siempre contienen mutantes gradualmente atenuados, entre otros los denominados mutantes DM.
- (b) Los mutantes DM representan clones que tienen mutaciones en compartimentos metabólicos por definición que resultan en disfunción (es decir, atenuación = coste de aptitud). Como una consecuencia, pueden encontrarse tamaños de colonia gradualmente reducidos (dependiendo del clon) en comparación con la cepa silvestre. Normalmente, estos mutantes se eliminan por el hospedador inmunocompetente o, alternativamente, sobrecrecen por la flora normal adaptada.
- (c) Los tamaños de colonia reducidos de los mutantes DM se correlacionan inversamente con el tiempo de generación (prolongado) y el grado de atenuación (aumentado).
- (d) Se ha demostrado la efectividad convincente de las vacunas de ensayo atenuadas DM y las vacunas.

Los mutantes DM pueden seleccionarse y aislarse como:

- (a) clones de resistencia antibiótica DM espontánea (DM "res") de, por ejemplo, estreptomina, rifampicina, fosfomicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico. Estos clones pueden aislarse con una frecuencia de más del 1 % en relación con los clones resistentes virulentos. Los clones DM "res" y los resistentes virulentos resultan de mutaciones diferentes. En consecuencia, DM "res" y atenuación pueden considerarse como una entidad funcional.
- (b) Mutantes de tolerancia a estrés ambiental (iet) aumentada que indirectamente se acumulan en el cultivo de "muerte".
- (c) Mutantes de supresor independiente de estreptomina (Sm-id) derivados de clones dependientes de estreptomina (Smd). Estos dos mutantes marcadores consisten en un amplio espectro de clones caracterizados por clonar tamaños de colonia reducidos específicamente graduados y grados de atenuación en aumento, respectivamente, desde virulencia casi tipo silvestre hasta sobre-atenuación (mini colonias). Generalmente, las mutaciones ribosómicas aumentan la lectura incorrecta normal (traducción incorrecta) más o menos y la mutación supresora exclusiva también provoca atenuación.

Para la inmunización de, por ejemplo, poblaciones de pollos con vacunas vivas de *Salmonella* y *Campylobacter* la interrupción de la cadena de infección a los seres humanos y, como consecuencia, la reducción de las enteritidis humanas es la meta primaria. Normalmente, las gallinas toleran *Salmonella* patógena facultativa (y generalmente incluso *Campylobacter*) sin mostrar ningún síntoma clínico. De esta manera, la baja virulencia de estas cepas silvestres para las gallinas requiere cepas de vacuna que muestren un grado moderado de atenuación que asegure por un lado la inmunogenicidad para las gallinas pero que excluya por otro lado un peligro para los seres humanos.

Un criterio de la efectividad de las cepas de vacuna es, por ejemplo, la reducción verificable del grado de colonización después del desafío. Las vacunas vivas atenuadas DM que expresan todos los componentes de las bacterias (por ejemplo, las proteínas de la membrana externa) pueden considerarse una opción orientada a la práctica, incluso con respecto a *Campylobacter*.

5 De esta manera, es posible desarrollar vacunas eficaces para bacterias patógenas facultativas tales como *Salmonella* y *Campylobacter*, con la condición de que se evite la sobre-atenuación ajustando a un grado bajo o moderado de atenuación. En otras palabras, la reducción del tamaño de colonia como equivalente de atenuación no debe caer por debajo de aproximadamente el 25 % del tamaño de colonia de la cepa silvestre. Además, esta condición *sine qua* debe estar en línea con los requisitos de seguridad del WHO:

10 estabilidad debido a la presencia de dos mutaciones atenuantes independientes. La tasa de inversión por marcador es de aproximadamente 10^{-8} . Sin embargo, hay una necesidad de desarrollar cepas de vacunas que muestren estabilidad incluso más alta, es decir, bajas tasas de inversión, pero no sobre-atenuación. Desafortunadamente, la introducción de mutaciones adicionales para aumentar la seguridad de una vacuna viva habitualmente da lugar a un exceso de atenuación de esta manera haciendo a la vacuna menos eficaz.

15 De esta manera, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar cepas de vacuna vivas caracterizadas por estabilidad aumentada.

La solución de dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones, es decir, proporcionar cepas de vacuna viva mejoradas con una estabilidad aumentada basándose en al menos tres mutaciones, aunque evitando la sobre-atenuación y permitiendo el ajuste de la atenuación a un nivel deseado. De hecho, durante los experimentos que dan lugar a la presente invención podría mostrarse que mediante el uso de atenuación DM pueden generarse cepas de vacuna de caracterizadas por tres (o incluso más) mutaciones atenuantes independientes que muestran estabilidad aumentada y un grado de atenuación que no excede el grado de atenuación de las cepas de vacuna que tienen dos mutaciones atenuantes DM "res". En los experimentos de la presente invención se usó estreptomycin, sin embargo los procedimientos desvelados en la presente invención no se restringen solamente a este antibiótico. Los experimentos descritos a continuación se basan en el uso de los denominados clones Sm-id derivados de mutantes Smd ya que estos mutantes de "doble marcador" (que comprenden clones que muestran todos los grados de atenuación - de colonias tipo cepa silvestre a mini colonias) permiten la generación de cepas de vacuna que muestran un grado de atenuación que corresponde al grado de atenuación de cepas de marcador único DM "res". Las cepas de la presente invención (Sm-id/DM "rem") muestran una estabilidad aumentada de aproximadamente 10^{-24} .

Hasta ahora, no se han descrito cepas de vacuna Sm-id/DM "res" de *Salmonella* y *Campylobacter* en la técnica anterior. Además, las cepas de vacuna que tienen cuatro, cinco o incluso seis mutaciones atenuantes generadas por la incorporación graduada de dos o tres mutaciones Sm-id y un marcador adicional DM "res" (A a, A a) son novedosas igualmente, para estreptomycin: Smd 1 → Sm-id I → Smd a → Sm-id II → Sm-α → Sm-id III (seis mutaciones atenuantes) y Sm-id I/ Sm-id II/ DM "res" (cinco mutaciones atenuantes), respectivamente.

Se descubrió que el espectro particular de revertientes - tamaños de colonia gradualmente reducidos - de los mutantes Sm-id con combinaciones de dos, cuatro o seis marcadores empieza: (a) para cepas Sm-id con tamaños de colonia de la cepa silvestre, (b) para cepas Sm-id I/ Sm-id II con tamaños de colonia tipo Sm-id I y (c) para construcciones Sm-id I/ Sm-id II/ Sm-id III la colonia más grande encontrada solamente correspondía a clones Sm-id I/ Sm-id II. De esta manera, estos no son revertientes de tipo silvestre.

En principio, la selección y el aislamiento de los mutantes Smd como cepas de partida para la generación de clones Sm-id pertenece al estado de la técnica. Aproximadamente el 10 % de las colonias mutantes resistentes Sm normales de, por ejemplo, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, son clones Smd (como un principio biológico aparente). Sin embargo, esto no se aplica a *Salmonella* y *Campylobacter*. La frecuencia de la aparición de clones Smd de *Salmonella* entre las colonias de mutantes que muestran resistencia se informa ser aproximadamente el 0,1 % o el aislamiento de dichas cepas solamente es lograble mediante el uso de mutagénesis, respectivamente.

De forma interesante, después del análisis de aproximadamente 5000 mutantes resistentes Sm los presentes inventores no pudieron encontrar ninguna cepa Smd. Además, ha de estresarse que el espectro de los revertientes Sm-id varía dependiendo del clon Smd, en consecuencia, son necesarios varios clones Smd como mutantes de partida. En otras palabras, el procedimiento común para la selección es inaplicable.

Ya que presumiblemente las rutas Smd ribosómicas son un principio evolutivo de adaptación se ensayaron dos posibles mecanismos:

55 (a) Mutantes Smd que entran en la fase de muerte inmediatamente después de su formación. De esta manera, dichos mutantes solamente pueden aislarse de cultivos en fase logarítmica, por ejemplo de cultivos ≤ 18 h/37 °C pero no de cultivos ≥ 48 h/37 °C

(b) Durante *status nascendi* los clones Smd son frágiles, muestran crecimiento retardado como mini colonias (que pueden pasarse por alto). Estas mini colonias se adaptan al "crecimiento normal" durante los pasajes.

Para *Campylobacter* no hay datos disponibles con respecto a mutantes Smd- y Sm-id. En la bibliografía, hay solamente algunas pistas con respecto a mutantes Sm: clones que muestran alta resistencia solamente podrían obtenerse mediante el uso de múltiples pasajes contra concentraciones en aumento de estreptomycin. Una resistencia Sm en una etapa solamente podría lograrse mediante el uso de una concentración de 20 µg de estreptomycin/ml. Los experimentos de los presentes inventores para aislar mutantes que muestran resistencia Sm y mutantes Smd usando 100 µg de estreptomycin/ml (colocando en placa cultivos de 72 h/39 °C) fallaron. Sorprendentemente, se descubrió que a pesar de las cantidades significativamente en aumento de bacterias los recuentos viables disminuyeron significativamente del cultivo 24 h/39 °C al 72 h/39 °C como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1

<i>Campylobacter coli</i> y <i>Campylobacter jejuni</i>: Recuentos viables en placas Petri con agar Caso contra el periodo de incubación a 39 °C			
<i>Campylobacter</i>	24 h	48 h	72 h
<i>C. coli</i>	1x10 ¹⁰	3x10 ⁹	7x10 ⁸
<i>C. jejuni</i>	3x10 ¹⁰	5x10 ⁹	1x10 ⁹
<i>C. coli Smd</i>	3x10 ⁹	3x10 ⁸	4x10 ⁷

Estos resultados están en línea con la observación de que los cultivos de *Campylobacter* son capaces de pasar en un estado viable pero no cultivable.

En consecuencia, los mutantes que tienen resistencia Sm solo podrían obtenerse colocando en placa material de cultivo ≤ 24 h/39 °C. Sin embargo, no pudieron encontrarse mutantes Smd entre las colonias resistentes que tienen tamaño normal o tamaño ligeramente reducido. Pero entre las colonias muy pequeñas y las mini colonias de *Campylobacter* (que aparecen con distinto retardo) la mayoría de los clones podrían caracterizarse siendo clones Smd.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ejemplos de cepas de vacunas de *Salmonella* caracterizadas por tres mutaciones atenuantes. La incubación de las placas fue a 37 °C durante aproximadamente 20 horas.

- (A) *Salmonella infantis* (cepa silvestre/Sm-id 4,22/ Rif 2 (e let 4));
- (B) *Salmonella virchow* (cepa silvestre/Sm-id 9,3/ Rif 2);
- (C) *Salmonella hadar* (cepa silvestre/Sm-id 4,1/ Sm 2 (y Rif 1));
- (D) *Salmonella paratyphi B*, variante Java 3,2 (cepa silvestre/Sm-id 1,1/ Rif 3 (y Rif 2)).

Figura 2: Ejemplos de cepas de vacuna de *Campylobacter* caracterizadas por tres mutaciones. La incubación de las placas fue a 39 °C durante aproximadamente 48 y 72 horas, respectivamente.

- (A) *Campylobacter coli I* (cepa silvestre/Sm-id 5,5/ Pho 1 y Pho 2);
- (B) *Campylobacter coli II* (cepa silvestre/Sm-id 18,1/ Sm 2);
- (C) *Campylobacter jejuni I* (cepa silvestre/Sm-id 2,3/ Pho 1 (y Pho 2));
- (D) *Campylobacter jejuni II* (cepa silvestre/Sm-id 2,1/ Sm 2).

Figura 3: Ejemplos de construcciones de vacuna de *Salmonella* caracterizadas por (dos), cuatro, cinco o seis mutaciones atenuantes. La incubación de las placas fue a 37 °C durante aproximadamente 20 horas.

- (A) *Salmonella virchow*:
 - cepa silvestre/ Sm-id I 1,4/ Sm-id II 0,3/ Sm 4;
 - cepa silvestre/ Sm-id I 1,4/ Sm-id II 0,3/ Sm-id III 0,x.
- (B) *Salmonella infantis*
 - cepa silvestre/ Sm-id I 4,22/ Sm-id II 0,1/ Rif 2;
 - cepa silvestre/ Sm-id I 4,22/ Sm-id II 0,1/ Sm-id III 1,1.

Figura 4: Ejemplos de construcciones de vacuna de *Campylobacter* caracterizadas por (dos), cuatro, cinco o seis mutaciones atenuantes. La incubación de las placas fue a 39 °C durante aproximadamente 48 horas.

- (A) *Campylobacter coli II* cepa silvestre/ Sm-id I 18,1/ Sm-id II a.1. Esta cepa se caracteriza porque la segunda mutación Sm-id a.1 da como resultado una resistencia Sm.
- (B) *Campylobacter coli II* cepa silvestre/ Sm-id I 17,7/ Sm-id II a.1/ PhoI, cepa silvestre/ Sm-id I 17,7/ Sm-id II a.1/ Sm-id III α.1.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los siguientes aspectos:

1. La cepa *Salmonella enterica* depositada con la Colección Alemana de Cultivos Tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) el 27 de noviembre de 2012 bajo el número de acceso DSM 26682.
- 5 2. Una vacuna que comprende la cepa de *Salmonella* del aspecto 1.
3. Uso de la cepa de *Salmonella* del aspecto 1 para la preparación de una vacuna.
4. Una vacuna de acuerdo con el aspecto 2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección de *Salmonella*.

Descripción detallada de la invención

10 La presente divulgación proporciona un procedimiento para la generación de una vacuna viva bacteriana que contiene bacterias estables que llevan al menos tres (y hasta seis o siete) mutaciones atenuantes, en la que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar una cepa bacteriana y hacer crecer dicha cepa en presencia de un primer antibiótico, preferentemente estreptomina;
- 15 (b) aislar a partir de la cepa de (a) dichas "mini" colonias que corresponden a clones que dependen del primer antibiótico;
- (c) hacer crecer un clon de (b) en ausencia del primer antibiótico y aislar revertientes atenuados caracterizados por un tamaño de colonia que es $\geq 50\%$ del tamaño de colonia de la cepa silvestre;
- 20 (d) hacer crecer un clon obtenido en la etapa (c) en un medio suplementado con un segundo antibiótico que puede diferir del primer antibiótico (por ejemplo, un aminoglucósido tal como estreptomina, neomicina, kanamicina, espectinomicina, gentamicina, amikacina y tobramicina; rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, fosfomicina), teniendo una concentración adecuada, preferentemente a aproximadamente diez veces la CIM;
- (e) aislar y pasar en serie colonias que muestran un tamaño reducido (DM A "res"); y
- (f) aislar clones que tienen la reducción graduada del tamaño de colonia como propiedad estable.

25 La cepa bacteriana de la etapa (a) se obtiene, preferentemente, a partir de cepas virulentas "silvestres". Estas cepas pueden tomarse de animales enfermos (por ejemplo, pollos). Las cepas naturales de partida que se usan deben tener un cierto grado de virulencia. La elección del antibiótico para seleccionar los mutantes de la etapa (a) se guía por razones de una naturaleza práctica. Por ejemplo, se sabe que la estreptomina rápidamente da lugar al desarrollo de resistencia y cepas dependientes entre los microorganismos.

30 De esta manera, preferentemente el antibiótico de la etapa (a) es estreptomina. Sin embargo, otros antibióticos de aminoglucósido tales como neomicina, kanamicina, espectinomicina, gentamicina, amikacina y tobramicina y rifampicina, ácido fusídico y ácido nalidíxico pueden ser adecuados también como el antibiótico de la etapa (a).

Se sabe que la resistencia al antibiótico puede resultar de diferentes mecanismos de modificación. En particular, la modificación genética puede afectar un cromosoma de la bacteria. La modificación cromosómica es un raro caso que, una vez llevada a cabo, asegura la estabilidad de las propiedades adquiridas.

35 La frase "mini colonias" como se usa en el presente documento se refiere a colonias bacterianas caracterizadas por una reducción del $\leq 10\%$ de las colonias de cepas silvestres correspondientes.

La selección de las cepas bacterianas atenuadas como una función de los criterios de crecimiento en los medios que contienen un antibiótico es una función que se ha usado para diversas especies con el objeto, notablemente, de provocar la aparición de cepas que tengan virulencia reducida.

40 Las cepas bacterianas se caracterizan por al menos tres (y hasta seis o siete) mutaciones atenuantes son en primer lugar cepas no virulentas seleccionadas, de cepas virulentas naturales, por su capacidad de crecimiento en un medio con un alto contenido de un antibiótico tal como estreptomina y, además, que solamente pueden desarrollarse satisfactoriamente en presencia del antibiótico (etapa (b)). Por esta razón, estas cepas se dice que son dependientes de, por ejemplo, estreptomina (mutante Smd).

En segundo lugar, las cepas de la etapa (c) son mutantes seleccionados de las cepas dependientes de antibióticos y que tienen la particularidad de ser capaces de desarrollarse en ausencia de estreptomina debido a la introducción de una segunda mutación atenuante o marcador. Estas cepas se denominan cepas Sm-id. Preferentemente, se lleva a cabo una etapa de lavado entre las etapas (b) y (c). El medio preferido para la etapa (c) es un medio Caso *Salmonella* (SC) (por ejemplo, para *Salmonella*) o un medio Caso (por ejemplo, para *Campylobacter*).

50 La etapa (d) permite introducir una mutación (como un tercer marcador de atenuación) de resistencia a antibióticos ("res") DM adicional. Preferentemente, el antibiótico es estreptomina, rifampicina o fosfomicina. La concentración del antibiótico en la etapa (d) puede determinarse por la persona experta en la materia de acuerdo con

procedimientos rutinarios. Preferentemente, para *Salmonella* la concentración de rifampicina, estreptomycin (nota: la mayoría de mutantes Sm-id son sensibles a estreptomycin y por lo tanto adecuados para un marcador DM Sm "res" adicional) y fosfomicina corresponden a un valor de CIM de aproximadamente 10 veces y para ácido fusídico a un valor de CIM de aproximadamente cuatro veces. Preferentemente, para *Campylobacter*, se usan al menos 200 µg de fosfomicina/ml y al menos 100 µg de estreptomycin/ml, respectivamente.

En la etapa (e) las cepas Sm-id/ DM "res" antibiótico de la etapa previa caracterizadas por un tamaño de colonia ligeramente reducido adicional se aíslan y se pasan en serie para comprobar la estabilidad. Preferentemente, se llevan a cabo al menos 30 pasajes en serie.

Finalmente, en la etapa (f) se proporcionan los clones aislados de la etapa (e) que tienen la reducción graduada del tamaño de colonia como una propiedad estable. Preferentemente, las etapas (a) a (c) se repiten al menos una vez para la generación de bacterias que llevan a cabo al menos cuatro mutaciones de atenuación. Este método permite generar nuevos mutantes de atenuación, por ejemplo de acuerdo con los siguientes esquemas (mostrados para Sm):

- (a) Smd 1 → Sm-id I → Smd a → Sm-id II;
- (b) Smd 1 → Sm-id I → Smd a → Sm-id II → Smd a → Sm-id III;
- (c) Smd 1 → Sm-id I → Smd a → Sm-id II → Smd a → Sm-id III → DM "res" antibiótico.

Sorprendentemente, se encontró que las cepas derivadas de mutantes Sm-id que llevan cuatro o incluso seis mutaciones no muestran un grado más alto de atenuación, en comparación con las cepas que tienen tres mutaciones de atenuación, pero incluso una estabilidad mayor. La elección del antibiótico para seleccionar las cepas mutantes DM "res" antibiótico se guía por las razones de una naturaleza práctica y, en principio, puede usarse cualquier antibiótico capaz de inducir mutaciones de deriva metabólica (DM) para los fines de la presente invención, por ejemplo, estreptomycin (nota: la mayoría de mutantes Sm-id son sensibles a estreptomycin y por lo tanto adecuados para un marcador DM Sm "res" adicional), rifampicina, fosfomicina, ácido fusídico o ácido nalidíxico.

El procedimiento no se restringe a bacterias particulares. Aparte de *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp., pueden usarse también otras bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (Pseudoántrax), *Yersinia* sp. tales como *Y. pestis*, *Klebsiella* sp., *Listeria* sp., *Aeromonas* sp., *Shigella* sp., *Pasteurella/Avibacterium* sp., *Riemerella* sp., *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella* sp. y *Pseudomonas* sp. para generar vacunas de bacterias vivas que contengan bacterias estables de acuerdo con los procedimientos desvelados. Sin embargo, las bacterias preferidas son *Salmonella* y/o *Campylobacter*, especialmente *Salmonella bongori*, *S. enterica* subespecies *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae* e *indica*, preferentemente *S. enterica* subespecie *enterica* tales como las siguientes Serovariedades: Dublin, Gallinarum (biovariedades Gallinarum y Pullorum), Choleraesuis, Typhisuis, Typhi, Paratyphi A,B,C, Abortusequi, Abortusovis, Abony, Enteritidis, Typhimurium, Copenhagen, Infantis, Virchow, Hadar, Agona, Newport, Anatum, Heidelberg, Panama, Indiana, Saintpaul, Brandenburg y *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus*. Preferentemente, en las etapas (a) y (b) los mutantes de *Salmonella* se aíslan de los cultivos en fase logarítmica y como mini-colonias que empiezan a aparecer después de al menos o más de 48 h a incubación a 37 °C. También se prefiere que en las etapas (a) y (b) los mutantes de *Campylobacter* se aíslan como mini-colonias que empiezan a aparecer después de al menos o más de 72 h a incubación a 39 °C.

La presente invención también proporciona cepas de bacterias vivas obtenibles por el procedimiento desvelado así como una vacuna que comprende cepas bacterianas vivas de la invención y un vehículo biológicamente aceptable. Las composiciones vacunantes pueden por supuesto estar constituidas por medio de bacterias recientemente cultivadas.

Preferentemente, la composición de vacuna de la presente invención se seca por congelación.

Para administrar las bacterias vacunantes, el medio en que se suspenden no es crítico. Por supuesto, este medio no debe interferir con la buena viabilidad de las bacterias que contienen.

La vacuna de la presente invención se administra en una cantidad adecuada para la inmunización de un individuo y puede contener adicionalmente uno o más agentes auxiliares comunes. La frase empleada "cantidad adecuada para la inmunización de un individuo" comprende cualquier cantidad de bacterias con que un individuo puede inmunizarse. Una "cantidad adecuada para la inmunización de un individuo" puede determinarse usando procedimientos conocidos por un experto en la materia. El término "individuo" como se usa en el presente documento comprende un individuo de cualquier clase. Los ejemplos de dichos individuos son animales (y humanos).

La administración de la vacuna preferentemente es la vía oral pero también puede realizarse la inyección en diversos sitios del individuo intramuscular, subcutánea, intradérmicamente o en cualquier otra forma de aplicación. También puede ser favorable llevar a cabo una o más "inyecciones de estímulo" que tengan aproximadamente cantidades iguales.

La vacuna de la presente invención puede ser profiláctica, esto es, los compuestos se administran para prevenir o retrasar el desarrollo de una infección o colonización, por ejemplo, una infección/colonización provocada por *Salmonella* o *Campylobacter*.

5 Las siguientes cepas se han depositado con la Colección Alemana de Cultivos Tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) el 27 de noviembre de 2012 bajo el Tratado de Budapest:

Nombre	Número de acceso
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serovar Infantis Smid4-22/Rif2	= DSM 26682
<i>Campylobacter coli</i> K2848/11 Smid18/Sm2	= DSM 26683
<i>Campylobacter jejuni</i> K2963/12 Smid2.1/Sm2	= DSM 26684

Los ejemplos a continuación explican la invención con más detalle.

Ejemplo 1

Materiales

10 (A) Cepas

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Virchow,
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Infantis,
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Hadar,
 15 *Salmonella paratyphi B* (var. L-Tartrat+, anteriormente Java),
Campylobacter coli, *Campylobacter jejuni* (proporcionada por Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Alemania).

(B) Medios

1000 ml de medio *Campylobacter* (medio Caso) contienen: 35 g de Agar Caso (Sifin), 3 g de extracto de levadura, 3 g de hidrolizado de caseína, 4 g de carbón activado, 0,25 g de FeSO₄, 0,25 g de piruvato sódico, 5 g de agar Kobe (Roth).
 20 1000 ml de medio *Salmonella* (medio SC) contienen: 35 g de Agar Caso (Sifin), 3 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa, 5 g de agar Kobe (Roth).

(C) Antibióticos

Estreptomicina (Sm) (N.º Roth 0236,2), fosfomicina (Pho) (N.º Sigma P5396), rifampicina (Rif) (Riemser Arzneimittel AG, Fatol Eremfat 600 mg)

25 (D) Valores CIM de cepas de tipo silvestre

Cepa	Estreptomicina	Rifampicina	Fosfomicina
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Virchow	12,5	12,5	n.d.
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis	12,5	12,5	n.d.
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Hadar	25	12,5	n.d.
<i>Salmonella paratyphi B</i> (var. L-tartrate+)	30	12,5	n.d.
<i>Campylobacter coli</i> WS I	1	n.d.	25
<i>Campylobacter coli</i> WS II	1	n.d.	25
<i>Campylobacter jejuni</i> WS I	2	n.d.	25
<i>Campylobacter jejuni</i> WS II	2	n.d.	25
n.d.: no determinado			

Ejemplo 2

Selección y aislamiento, de mutantes Smd

30 (a) Aislamiento orientado a la práctica de mutantes Smd de *Salmonella*. Aproximadamente 10¹⁰ ufc de un cultivo 18 h/37 °C de *Salmonella* se colocaron en una placa Petri que contiene agar SC suplementado con 500 µg de estreptomicina/ml. Aparte de colonias que tienen tamaños normales y colonias únicas que tienen tamaños ligeramente disminuidos (clones resistentes Sm virulentos y clones DM Sm “res”) pudieron detectarse “mini colonias” (predominantemente variantes de colonia pequeña = scv) con frecuencias variantes – dependiendo de

la cepa. Después de un tiempo de incubación de aproximadamente ≥ 48 h (a 37 °C) pudieron detectarse 1 a 2 mini colonias adicionales (por aproximadamente 30 colonias que tienen tamaños normales y colonias que tienen tamaños ligeramente disminuidos). Dependiendo de la frecuencia de aparición del fenotipo scv del 3 % al 20 % de estas mini colonias podrían mostrarse representar mutantes Smd.

5 La frecuencia calculada de los clones Smd en relación a los mutantes resistentes fue ≥ 1 %.

Nota: el aislamiento de los clones Smd se logra mediante el uso de cepas de tipo silvestre sensibles a Sm como el material de partida. Las cepas tienen preferentemente un bajo valor CIM.

10 (b) Aislamiento orientado a la práctica de mutantes Smd de *Campylobacter*. El material bacteriano obtenido de un cultivo de placa Petri de agar Caso (24 h/39 °C; aproximadamente 10^{10} ufc) que se había inoculado de tal manera que la superficie entera del disco estaba cubierto se colocó en 1 o 2 placas Petri que contienen agar Caso suplementado con 100 μ g de estreptomycin/ml y se incubaron durante 72 h a 39 °C. Dependiendo de la cepa fueron detectables ≤ 10 colonias/placa (valor promedio) que tienen tamaños normales y colonias que tienen tamaños ligeramente disminuidos (clones resistentes a estreptomycin y clones DM Sm "res"). Además, fueron detectables las colonias que tienen un tamaño claramente reducido (el diámetro es ≤ 25 % del tamaño normal)

15 con una frecuencia de aproximadamente el 20 % - en comparación con las colonias que tienen tamaños y colonias normales que tienen tamaños ligeramente reducidos. Aproximadamente un tercio de estas colonias fueron clones Smd.

La frecuencia calculada de los clones Smd en relación a los mutantes resistentes fue ≥ 5 %.

Ejemplo 3

20 Selección y aislamiento de mutantes Sm-id

(a) Aislamiento de mutantes Sm-id de *Salmonella*. Aproximadamente 10^9 ufc (por placa Petri) de un mutante Smd lavado se colocaron en placa con medio SC y se incubaron durante 48 h a 37 °C. A partir de los revertientes atenuados solamente dichos mutantes se trataron adicionalmente que mostraron un tamaño de colonia de aproximadamente ≥ 50 % en comparación con las colonias de cepas de tipo silvestre (de acuerdo con el objeto para obtener clones Sm-id que solamente tienen baja atenuación).

25

(b) Aislamiento de mutantes Sm-id de *Campylobacter*. El material bacteriano obtenido de un cultivo de placa Petri de agar Caso (suplementado con 100 μ g de estreptomycin/ml) (24 h/39 °C) que se había inoculado de tal manera que la superficie entera del disco estaba cubierta se sometió a una etapa de lavado, se colocó en placa en medio Caso en una relación de 1:1 (aproximadamente 3×10^9 ufc) a 1:4 y después se incubó durante 72 h a 39 °C. En estas condiciones de cultivo la mayoría de clones Smd mostraron el desarrollo de revertientes atenuados ≤ 10 % (en promedio). La mayoría de estas revertientes atenuadas fueron sensibles a Sm. Generalmente, los clones Sm-id que mostraban un tamaño de colonia reducido de aproximadamente el ≥ 50 % en comparación con colonias de cepas de tipo silvestre se procesaron adicionalmente.

30

35 Algunas cepas, por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, permitieron el aislamiento solamente de Sm-id que tenía un tamaño de colonia de ≤ 50 % en comparación con la cepa de tipo silvestre.

Nota: No todas las cepas de *Campylobacter* y los mutantes Smd derivados de las mismas permiten el aislamiento de revertientes Sm-id sin ningún problema. Sin embargo, es posible aislar revertientes Sm-id también de las cepas problemáticas usando, por ejemplo, varios mutantes Smd independientes.

Ejemplo 4

40 Aislamiento de un mutante "res" antibiótico DM adicional

La incorporación de una mutación "res" antibiótico DM adicional en mutantes Sm-id seleccionados como tercer marcador para la atenuación y el reconocimiento se llevó a cabo como ya se ha descrito anteriormente.

Brevemente,

45 (a) *Salmonella*: 10^{9-10} ufc de los clones Sm-id seleccionados se incubaron en medio SC suplementado con un valor CIM de aproximadamente diez veces de concentración de rifampicina o estreptomycin (con respecto al ácido de fusidina la concentración con valor CIM de aproximadamente cuatro veces), respectivamente, y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

50 (b) *Campylobacter*: el material de un cultivo de placa Petri (medio Caso) que se inoculó con el mutante Sm-id de manera tal que cubriera la superficie entera e incubado durante 24 h a 39 °C se colocó en placa a una relación de 1:4 a 1:8 en medio Caso suplementado con 200 μ g de fosomicina/ml o 100 μ g de estreptomycin/ml y se incubaron durante ≥ 72 h a 39 °C.

Las colonias que muestran tamaños (más o menos) reducidos se aislaron y se sometieron a pasajes en serie. Aproximadamente el 20 % de estos clones mantuvo la reducción específicamente calificada de tamaño de colonia como un rasgo estable.

Ejemplo 5**Generación de cepas de vacuna que tienen 4 o 6 mutaciones atenuadas**

La generación de cepas de vacuna que tienen 4 o 6 mutaciones atenuadas se logró incorporando secuencialmente una segunda y, opcionalmente, una tercera mutación supresora Sm-id en un clon Sm-id I básico: Sm-id I/ Sm-id II/ Sm-id III.

(a) *Salmonella*: Aproximadamente 10^{10} ufc de los mutantes Sm-id I básicos (o la cepa de partida Sm-id II) se colocaron en placa en medio SC suplementado con 500 µg de estreptomicina/ml y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Aproximadamente el 5 % de las colonias resistentes a Sm son mutantes Smd (ahora crecen principalmente como colonias que tienen “tamaños normales”). Mediante el uso de estos clones Smd derivados de cepas Sm-id I y cepas Sm-id II, respectivamente, se aislaron de nuevo mutantes Sm-id de acuerdo con el enfoque descrito en el Ejemplo 3a. Los clones que tienen la reducción de tamaño de colonia deseada se trataron adicionalmente.

(b) *Campylobacter*: El material obtenido a partir de un cultivo de placa Petri medio Caso que se inoculó con el mutante Sm-id de manera tal que cubriera la superficie entera e incubado durante 24 h a 39 °C se colocó en placa a una relación de 1:4 en medio Caso suplementado con 100 µg de estreptomicina/ml y se incubaron durante 72 h a 39 °C. Además de las colonias resistentes de aproximadamente 15 Sm que tenían un “tamaño normal” pudieron detectarse 2 a 3 colonias pequeñas. El 50 % de estas colonias son clones Smd. Estos clones Smd (derivados de cepas Sm-id I y cepas Sm-id II, respectivamente) se usaron como clones de partida - de acuerdo con el Ejemplo 3(b) - para de nuevo aislar mutantes Sm-id. Los clones que muestran la reducción del tamaño de colonia deseada se trataron adicionalmente.

Ejemplo 6**Aislamiento de un mutante “res” antibiótico DM de mutantes Sm-id II seleccionados**

(a) *Salmonella*: La incorporación de una mutación “res” antibiótico DM ventajosa en mutantes Sm-id I/ Sm-id II seleccionados como un marcador 5° adicional de atenuación y reconocimiento se llevó a cabo ventajosamente de acuerdo con el enfoque descrito en el ejemplo 4(a).

(b) *Campylobacter*: La incorporación de una mutación “res” antibiótico DM ventajosa en mutantes Sm-id I/ Sm-id II seleccionados como un marcador 5° adicional de atenuación y reconocimiento se llevó a cabo ventajosamente de acuerdo con el enfoque descrito en el ejemplo 4(b).

Nota: el enfoque descrito anteriormente puede usarse también para la incorporación adicional de una mutación “res” antibiótico DM en mutantes Sm-id III seleccionados (que tienen seis mutaciones atenuadas) como un 7° marcador para atenuación y reconocimiento. Sin embargo, esto puede resultar en una sobre-atenuación, que puede interferir con relevancia a la práctica.

Ejemplo 7**Tamaños de colonia convertidos en gráficos de barras para la evaluación prospectivamente orientada del probable grado de atenuación**

Las suspensiones de las cepas de tipo silvestre correspondientes y los mutantes MD derivados de estas cepas se diluyen logarítmicamente y después se colocan en placa en medios de cultivo de tal manera que puedan obtenerse 10 a 50 colonias únicas bien definibles por placa Petri. Se preparan al menos 5 placas Petri por grado de dilución para compensar las diferencias en el crecimiento debido al medio. Se fotografían las colonias únicas que crecen en condiciones estandarizadas (por ejemplo, tiempos idénticos de incubación, espesor de capa del medio idéntico). Las fotografías digitales se procesan con el programa CellProfiler (Broad Institute): Los diámetros de las colonias individuales se determinaron y se guardaron. Después de promediar los valores los datos se representan como gráficos de barras con respecto a los tamaños de las colonias de cepas de tipo silvestre (dadas como el 100 %).

Ejemplo 8**Preparación de vacunas a partir de cepas de vacuna adecuadas y uso para la vacunación de gallinas/pollos y hospedadores adicionales a protegerse, respectivamente**

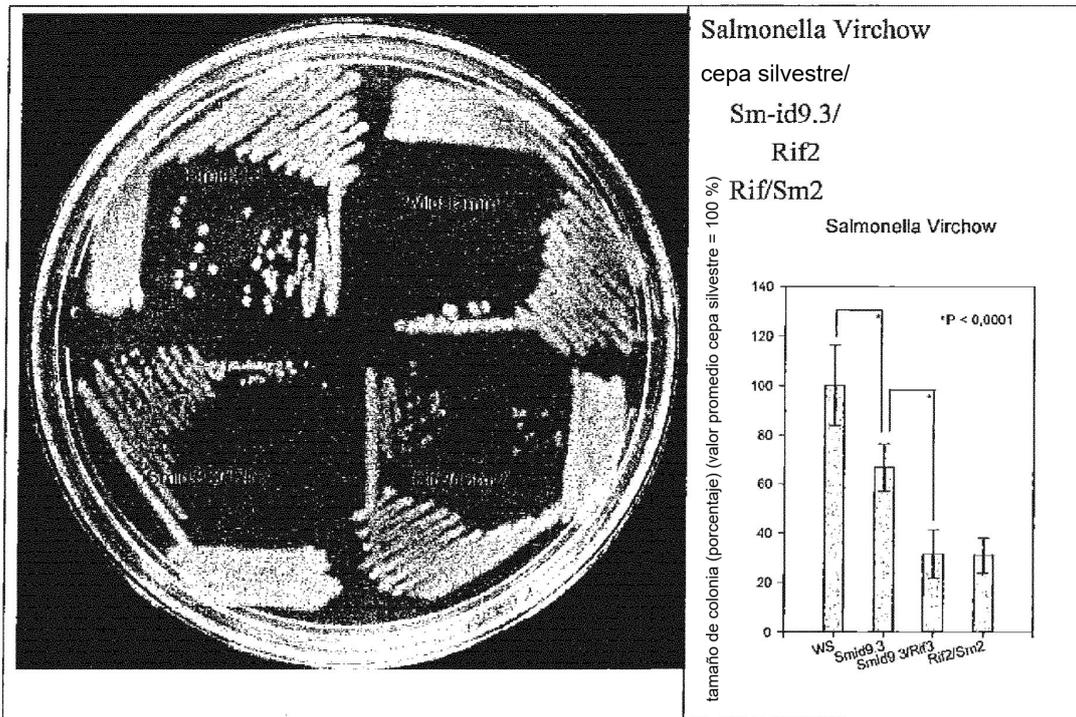
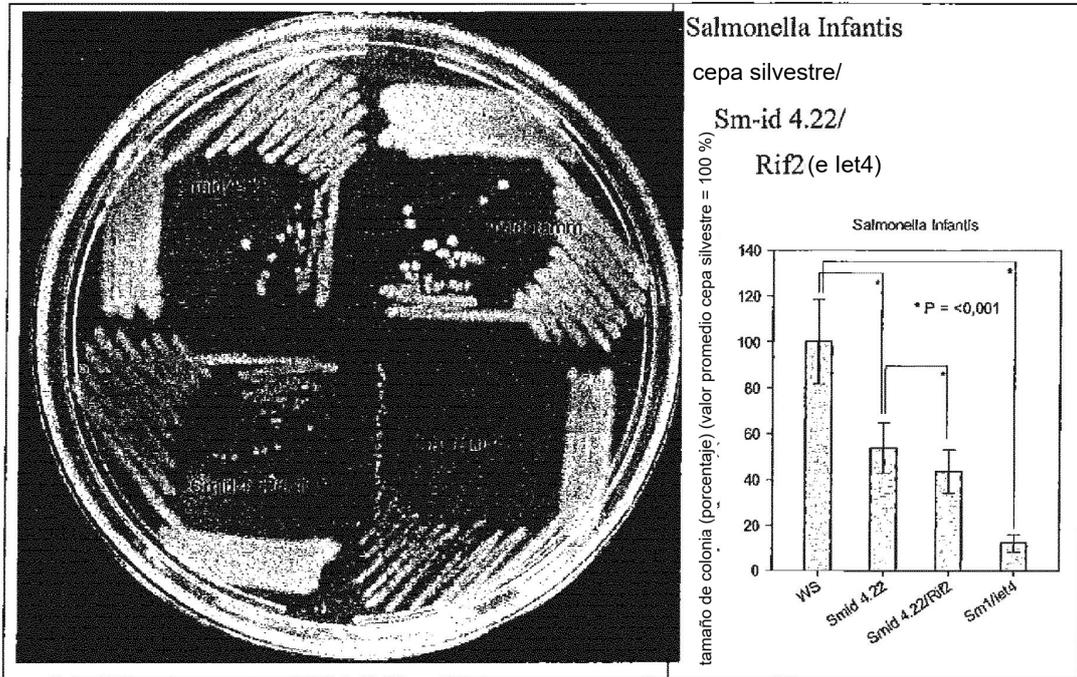
Para la preparación de vacunas vivas se hicieron crecer cepas de vacuna que llevaban tres (cuatro, cinco y seis, respectivamente) mutaciones atenuantes en medio líquido común hasta la fase logarítmica. Las suspensiones de vacuna y los sedimentos de vacuna, respectivamente, se suplementaron con un estabilizante adecuado y posteriormente se liofilizaron. Las vacunas obtenidas se administraron (de acuerdo con la clase de indicación, una, dos o tres dosis) por administración oral o parenteral.

REIVINDICACIONES

1. La cepa de *Salmonella enterica* depositada con la Colección Alemana de Cultivos Tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) el 27 de noviembre de 2012 bajo el número de acceso DSM 26682.
2. Una vacuna que comprende la cepa de *Salmonella* de la reivindicación 1.
- 5 3. Uso de la cepa de *Salmonella* de la reivindicación 1 para la preparación de una vacuna.
4. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección por *Salmonella*.

Figura 1

A



B

Figura 1

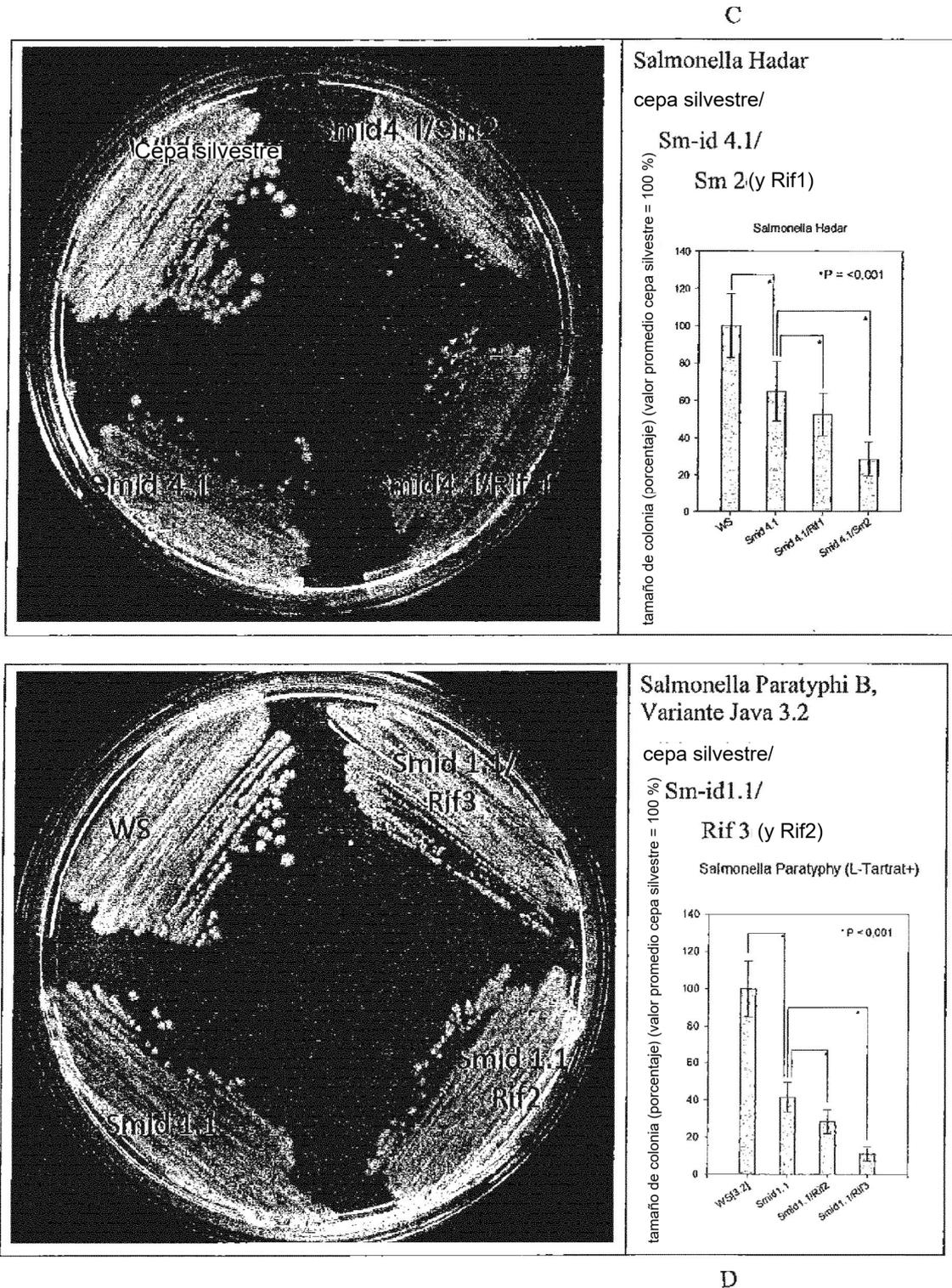


Figura 2

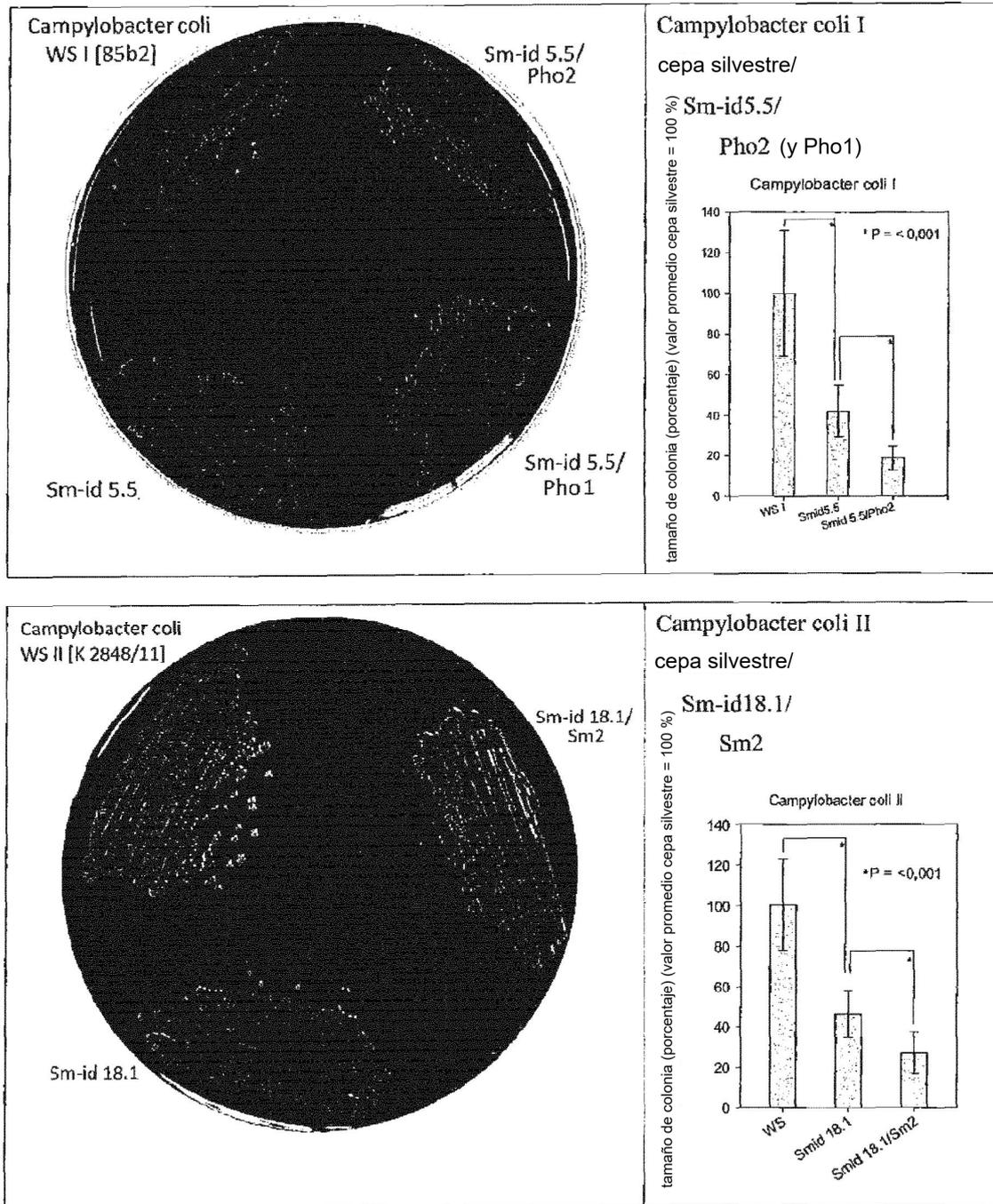


Figura 2

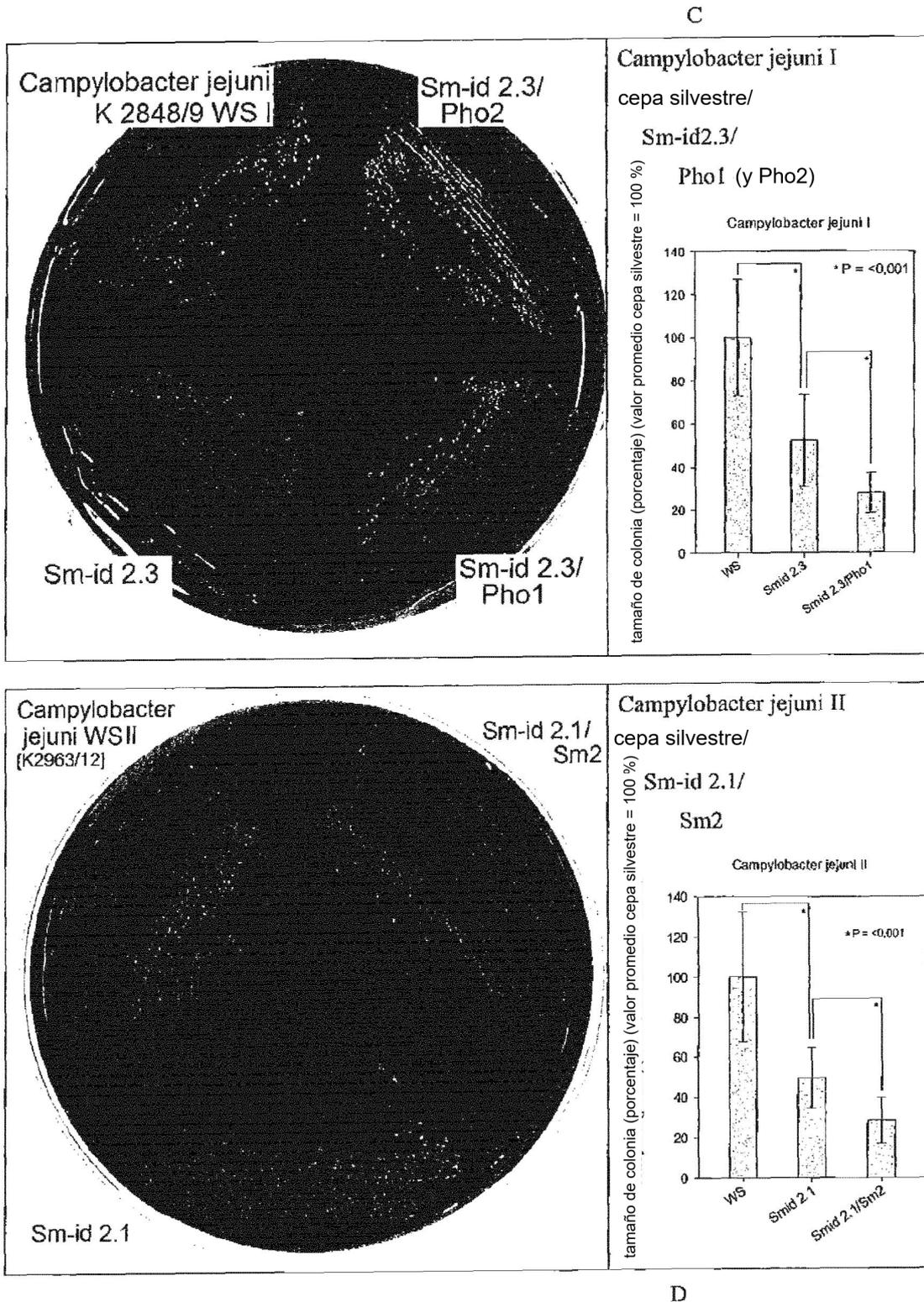


Figura 3

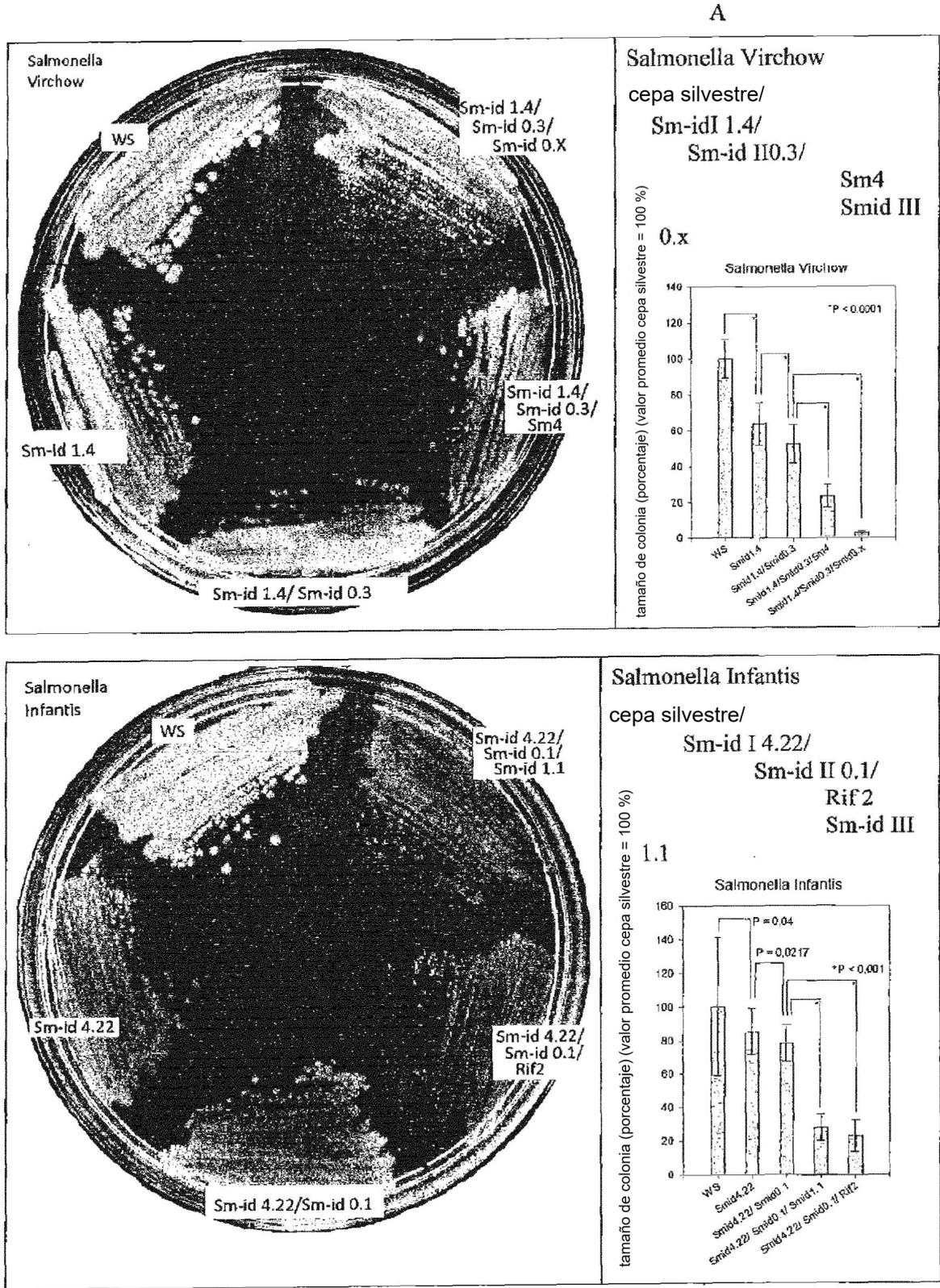
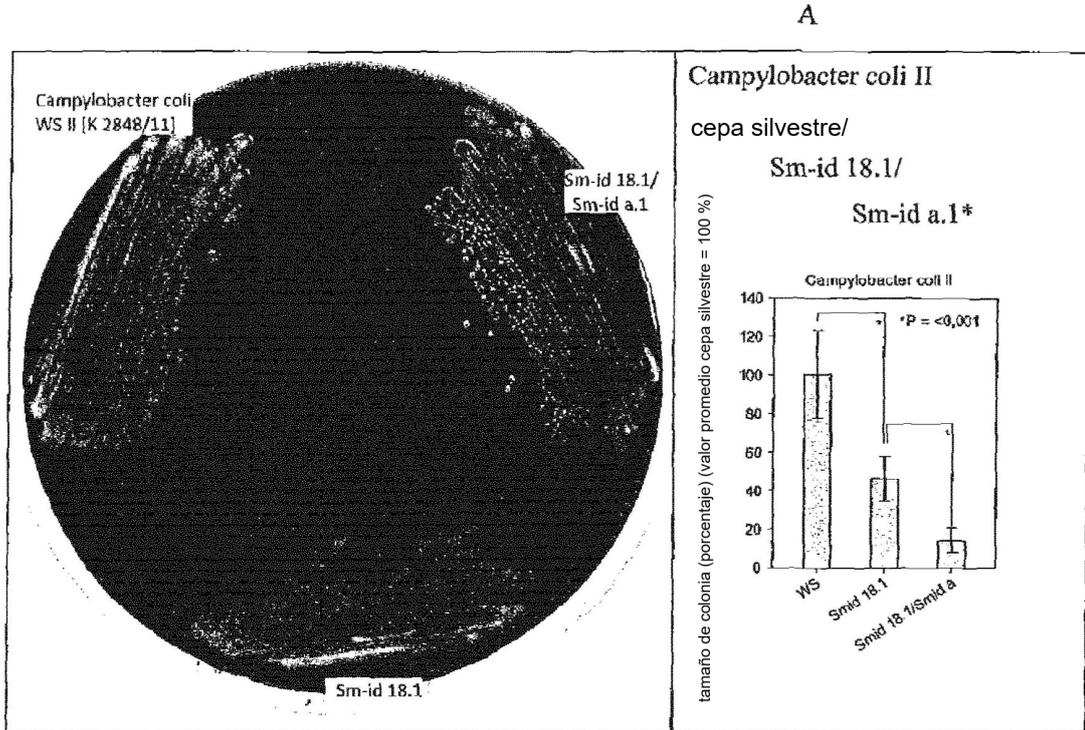


Figura 4



*) La segunda mutación Sm id a.1 provoca una resistencia Sm para esta cepa

