(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 764 173**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2015 PCT/EP2015/065478**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005390**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2015 E 15735934 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3166632**

(54) Título: **Bacterias modificadas para vacunas mejoradas contra la brucelosis**

(30) Prioridad:

10.07.2014 EP 14306125
17.04.2015 EP 15305578

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

(73) Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%);
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (25.0%) y
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (25.0%)

(72) Inventor/es:

GORVEL, JEAN-PIERRE;
ARCE-GORVEL, VILMA;
HANNIFFY, SEAN;
CONDE-ALVAREZ, RAQUEL;
MORIYON, IGNACIO;
IRIARTE, MAITE y
ZUNIGA-RIPA, AMAIA

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 764 173 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

Bacterias modificadas para vacunas mejoradas contra la brucelosis

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a bacterias modificadas del género *Brucella*, para su uso como vacunas contra la brucelosis.

Estado de la técnica

La brucelosis es una zoonosis bacteriana provocada por *Brucella,* un género de bacterias gramnegativas que se comportan como patógenos intracelulares facultativos de rumiantes, súidos, cánidos, camélidos y varias formas de la flora y la fauna. Estas bacterias son extremadamente infecciosas, y los humanos adquieren brucelosis fácilmente a partir de los animales y sus productos. Hay varias especies *Brucella* altamente homólogas (Moreno *et al*., Vet.Microbiol.90, 209-227, 2002; Chain *et al*., Infect.Immun. 73,8353-8361,2005), entre las cuales *B. abortus* infecta preferentemente al ganado vacuno, *B. melitensis* ovejas y cabras, y *B. suis* cerdos y fauna salvaje. Estas tres especies son la principal de la brucelosis humana. Las ovejas también pueden estar infectadas por *B. ovis.*

La brucelosis es una causa principal de abortos e infertilidad en animales y, por lo tanto, de grandes pérdidas económicas. En el ganado vacuno, a menudo se da como una estimación una disminución de la producción del 50 % (carne, leche, costes de sacrificio). El número de animales domésticos en el mundo susceptibles a la brucelosis se estima en alrededor de 4.000.000.000 y, de este número, menos del 20 % se encuentran en países sin presencia de la enfermedad (fuente anónima, 2006). La incidencia de la brucelosis es muy alta en los países de los límites sur y este de la Unión Europea (Seimenis *et al*., Ann. Ist. Super. Sanita. 42, 437-445,2006) y en países de bajos ingresos en todo el mundo. En los Estados Unidos, el área del norte de la Unión Europea y Francia, se ha logrado el éxito en la erradicación de la enfermedad bovina después de grandes inversiones y muchos años de vacunación y sacrificio. La infección con *B. melitensis* ha demostrado ser más incoercible, en gran parte debido a las dificultades del manejo de los animales en condiciones de ganadería extensiva de las áreas semiáridas.

La brucelosis humana es siempre una consecuencia de la brucelosis animal y *B. melitensis.* es la que más frecuentemente la provoca. Si no se trata, la brucelosis humana conduce a graves consecuencias invalidantes y es mortal en aproximadamente el 3 % de los casos. Debido a las deficiencias en los servicios de salud de la mayoría de los países donde la enfermedad es endémica, no existen datos fiables sobre la incidencia global de la forma humana de la enfermedad. Las cifras de incidencia varían extensamente (de <0,01 a >200 por 100.000), lo que refleja las dificultades para reconocer una enfermedad que, aunque grave, carece de síntomas patognomónicos y, por lo tanto, se encuentra mal notificada (Corbel, Emerg.Infect.Dis. 3, 213-221,1997). Se da generalmente como estimación una cifra de 500.000 casos nuevos/año (Pappas *et al*., Lancet Infect.Dis. 6, 91-99,2006), y datos recientes provenientes de las economías emergentes en el Cercano Oriente y Asia confirman una incidencia muy alta de la enfermedad en seres humanos, donde sea que se implemente el diagnóstico (por ejemplo, 15.000 nuevos casos/año en Irán, o una incidencia de casi 1400 casos por cada 100 000 habitantes en el norte de China) (Anónimo, Iranian Journal of Microbiology, 5:183.1,2013). Debido a todas estas circunstancias, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado la brucelosis entre las siete principales "zoonosis olvidadas", un grupo de enfermedades que son simultáneamente una amenaza para la salud humana y una causa de la perpetuación de la pobreza (Maudlin y Weber, Informe de una reunión en Ginebra, 2006).

La vacunación es crucial para controlar y erradicar la brucelosis en rumiantes (Nicoletti, CRC Press, Boca Raton., 283-299,1990; Garin-Bastuji *et al*., Vet.Res. 29, 255-274, 1998). Como no hay vacuna humana, esta es también la mejor manera de disminuir las infecciones humanas. Las vacunas *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev 1 son eficaces contra *B. abortus* en ganado vacuno y *B. melitensis* en cabras y ovejas. Sin embargo, estas vacunas clásicas no proporcionan una protección del 100 %, son virulentas para los seres humanos y, en el caso de Rev 1, resistente a estreptomicina (uno de los antibióticos de elección para tratar la brucelosis) (Garin-Bastuji *et al*., Vet.Res. 29, 255-274, 1998; Ariza *et al*., PLoS.Med. 4, e317,2007). Además, son abortivas en animales preñados. Este último rasgo desventajoso es muy manifiesto con la vacuna Rev 1, y obstaculiza seriamente la aplicación de estrategias de vacunación masiva que son esenciales para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes en la mayoría de las zonas del mundo (Blasco y Molina-Flores, Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract. 27:95-104,2011). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar vacunas más seguras y más eficaces contra la brucelosis. *Brucella* tiene la capacidad de evitar la detección por parte de la inmunidad innata al inicio de la infección, retardando así la respuesta celular adaptativa y haciendo posible que el patógeno alcance nichos intracelulares protegidos. Esta capacidad está relacionada con el fracaso de los receptores de reconocimiento de patógenos (los PRR, forma siglada de *pathogen-recognition receptors*) de la inmunidad innata para identificar las moléculas de superficie de *Brucella* que normalmente portan los patrones moleculares asociados a patógenos afines (PAMP, forma siglada de *pathogen-associated molecular patterns*) (Barquero-Calvo E *et al*., PLoS ONE 2: e631, 2007), y en particular el lipopolisacárido (LPS) de estas cepas. Estas moléculas de *Brucella* son, por lo tanto, dianas para el desarrollo de vacunas más eficaces. El LPS, una de las moléculas que portan PAMP más destacadas de la superficie de las gramnegativa, es un glucolípido compuesto por tres secciones consecutivas: el lípido A, el oligosacárido central y las cadenas laterales

de polisacárido O (O-PS). Los estudios comparativos han establecido un papel claro del lípido A de *Brucella* en la virulencia (Lapaque *et al*., 2005). De manera similar, el O-PS del LPS de *Brucella* es crucial en la virulencia, pero su eliminación genera sobre atenuación y vacunas deficientes (forma R de *Brucella)* (González *et al*., 2008; Barrio *et al*., 2009). El documento WO2011/033129 divulga una nueva vacuna contra la brucelosis basada en una *Brucella* modificada que porta un gen inactivado *(wadC)* que codifica una glucosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS. La alteración de *wadC* elimina parte del núcleo sin afectar al O-PS. Se ha publicado el análisis de las propiedades biológicas de un mutante de *wadC* de *B. abortus (BABΔwadC)* (esta cepa se describió previamente como BaΔwadC por Conde-Álvarez *et al*., PLoS Pathog., 8(5),e1002675,2012). BABΔwadC no puede multiplicarse en macrófagos procedentes de médula ósea (BMDM, forma siglada de *bone marrow derived macrophages*) y desencadena una fuerte respuesta de IL-12 en estas células, lo que da como resultado una respuesta Th1 protectora. BABΔwadC proporciona una protección contra *B. abortus* que es similar a la obtenida con la vacuna S19 (Conde-Álvarez *et al*., PLoS Pathog., 8(5),e1002675,2012). Por tanto, la vacuna de BABΔwadC contra *Brucella* es tan eficaz como S19, al tiempo que porta menos mutaciones que las descritas para S19.

Por tanto, el mutante BABΔwadC representa una gran mejora en el campo de las vacunas contra la brucelosis, pero aún existe la necesidad de desarrollar vacunas nuevas y más seguras con mayor eficacia contra esta enfermedad.

Objeto de la invención

Los inventores han elaborado un conjunto de mutantes metabólicos de *Brucella* contenidos dentro de las rutas glucolíticas/gluconeogénicas y del ciclo de Krebs, y utilizaron uno de estos mutantes como vacuna contra la brucelosis. La bacteria mutada del género *Brucella* de la invención porta un gen inactivado que codifica una glucosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS (BABΔwadC) y un gen inactivado que codifica una enzima implicada en varias rutas metabólicas, tales como el ciclo de Krebs y la gluconeogénesis: la piruvato fosfato diquinasa (ppdK: ORF BAB1_0525; u homólogos). Por consiguiente, la presente invención se refiere al mutante BABΔwadCΔppdK.

Los inventores descubrieron que tal mutante BABΔwadCΔppdK presenta un tráfico intracelular normal, pero es defectuoso en la multiplicación intracelular una vez que ha alcanzado el nicho de replicación. La combinación de mutaciones en los genes ppdK y wadC genera vacunas altamente eficaces contra la brucelosis en el modelo de ratón de brucelosis.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una bacteria modificada que pertenece al género *Brucella* que porta una doble mutación que comprende:

- un gen *wadC* inactivado y
- un gen ppdK inactivado.

La invención también se refiere a una vacuna contra la brucelosis en humanos y/o animales, que comprende dicha bacteria modificada que pertenece al género *Brucella* que porta un gen *wadC* inactivado y un gen *ppdK* inactivado.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a una bacteria del género *Brucella* que porta un gen *wadC* inactivado y un gen *ppdK* inactivado.

De acuerdo con la invención, por "gen inactivado" se entiende un gen que codifica una proteína no funcional o ninguna proteína. De acuerdo con la invención, la inactivación de un gen puede llevarse a cabo mediante los diversos métodos conocidos por el experto. Los ejemplos de métodos para inactivar un gen son la genosupresión, particularmente por mutagénesis dirigida o recombinación homóloga, como se describe en Conde-Álvarez R. *et al*., Cell Microbiol agosto de 2006;8(8): 1322-35. En la sección experimental se describe un método particular para inactivar un gen de acuerdo con la invención.

Por "wadC" se entiende el gen *wadC* de una bacteria de género *Brucella*, incluyendo *B. abortus.* El gen *wadC* de *B. abortus* se ha descrito en el documento WO2011/033129 como "BABLpcC" y tiene la secuencia correspondiente a la "SEQ ID NO: 1" en esta solicitud PCT.

wadC es un gen que codifica una glucosiltransferasa implicada en la síntesis del núcleo del LPS en *Brucella.*

La bacteria de la invención porta un gen *wadC* inactivado. Por lo tanto, y de manera similar al BABΔwadC mutante presentado en el documento WO2011/033129, la bacteria de la invención presenta un LPS que carece de parte de su núcleo pero que mantiene una cadena O intacta. Esta propiedad permite que la bacteria mutante de la invención desencadene una respuesta inmunitaria más intensa y protectora que las vacunas comúnmente disponibles/utilizadas contra *Brucella* (S19, rev1). La inactivación de *wadC* se ha descrito en el documento WO2011/033129 y se realiza de manera similar en la presente solicitud. Los ejemplos de genes *wadC* presentes entre las especies de *Brucella* incluyen los que se presentan a continuación.

Especie de *Brucella*	ID del gen wadC
Brucella abortus	ID del gen: 3788779
Brucella melitensis	ID del gen: 1196220
Brucella suis	ID del gen: 1167186
Brucella ovis	ID del gen: 5203447
Brucella pinnipedialis	ID del gen: 10998034
Brucella ceti	ID del gen: 17713240
Brucella microti	ID del gen: 8321077
Brucella canis	ID del gen: 5785277

Por *"ppdK"* se entiende el gen *ppdK* de una bacteria del *género Brucella*, incluyendo *B. abortus. ppdK* es un gen que codifica una enzima implicada en rutas metabólicas en *Brucella* (tales como el ciclo de Krebs y la gluconeogénesis): la fosfoenolpiruvato diquinasa o la piruvato fosfato diquinasa *(ppdK* de *B. abortus:* ORF BAB1_0525). *ppdK* es necesario para la multiplicación intracelular eficaz de *B. abortus* en macrófagos cultivados (Zúñiga-Ripa *et al*., J Bact, doi:10.1128/JB.01663-14).

Los ejemplos de genes *ppdK* presentes entre las especies de *Brucella* incluyen los que se presentan a continuación:

Especie de *Brucella*	ID del gen *ppdK* (o nombre homólogo)
Brucella abortus	ID del gen: 3788861
Brucella melitensis	ID del gen: 1197147
Brucella suis	ID del gen: 12136820
Brucella ovis	ID del gen: 5201697
Brucella pinnipedialis	ID del gen: 10997008
Brucella ceti	ID del gen: 17714040
Brucella microti	ID del gen: 8320067
Brucella canis	ID del gen: 5784717

La bacteria de acuerdo con la invención está inactivada en cuanto a *wadC* y *ppdK*.

El mutante BABΔwadCΔppdK presenta tráfico intracelular normal y es solo defectuoso en la multiplicación intracelular una vez que ha alcanzado el nicho de replicación. Los inventores han descubierto que una combinación de mutaciones en los genes ppdK y wadC genera vacunas altamente eficaces en ratones BALB/c. Los ratones vacunados con el mutante doble BABΔwadCΔppdK estaban tan protegidos frente a la exposición a la virulenta 2308 como los vacunados con S19 o BABΔwadC pero, por el contrario, no contenía casi ninguna presencia residual de vacuna en sus bazos a las dos semanas posexposición (véase la siguiente tabla). Las vacunas actuales no se pueden aplicar de manera segura en animales adultos debido a que su extenso período de permanencia en el hospedador implica un alto riesgo de aborto inducido por la vacuna y de excreción de leche. Por lo tanto, el corto período de permanencia presentado por el mutante BABΔwadCΔppdK aumenta la seguridad y el intervalo de edad de los animales para su uso como vacunas contra la brucelosis. Adicionalmente, se espera que una corta permanencia reduzca la interferencia de la nueva vacuna en las pruebas de diagnóstico serológico, una desventaja de las vacunas clásicas (es decir, S19 y Rev 1), y esto contribuirá así a resolver el problema DIVA (véase más adelante).

La siguiente tabla representa la protección frente a la infección por *B. abortus* en ratones BALB/c obtenida mediante la vacunación con BABΔwadC, BABΔwadCΔppdK o *B. abortus* S19.

	X $\log_{10}$ de UFC en el bazo ± DT en la semana posterior a la exposición			
	2		6	
Vacuna	*B. abortus* 2308	Vacuna	*B. abortus* 2308	Vacuna
S19	1,30 ± 0,35	4,06 ± 1,19	3,59 ± 1,40	2,99 ± 0,15
BABΔwadC	1,58 ± 0,04	3,90 ± 0,07	4,44 ± 0,18	2,88 ± 0,13
BABΔ wadCΔppdK	2,07 ± 1,17	0,49 ± 0,04	3,89 ± 1,94	0,77 ± 0,22
Solución salina	6,14 ± 0,25		6,07 ± 0,22	

Los ratones vacunados con la bacteria modificada de acuerdo con la invención muestran una respuesta inmunitaria más alta que la obtenida con ratones vacunados con los mutantes individuales BABΔwadC o BABΔppdk.

Cuando se administra a un ser humano o un animal, el mutante de acuerdo con la invención desencadena una liberación intensa de varias interleucinas inflamatorias, en particular de IL6, IL12 y TNFα. La combinación específica

de mutaciones en los genes ppdK y wadC en una bacteria de acuerdo con la invención genera una fuerte respuesta inmunitaria y, por lo tanto, potencia la eficacia de una vacuna que contiene dicho mutante.

Por tanto, los inventores demostraron que, sorprendentemente, existe un efecto sinérgico entre las mutaciones de ppdK y wadC.

En una realización particular, la invención también se refiere a una bacteria de acuerdo con la invención que comprende además una mutación que permite diferenciar fácilmente el mutante de la invención de la bacteria de tipo silvestre.

Una de las principales desventajas de las vacunas de *Brucella* actuales es el problema comúnmente denominado "DIVA" (diferenciación de animales infectados y vacunados). Las pruebas de diagnóstico de brucelosis más eficaces son las que detectan anticuerpos frente a la sección O-PS del LPS de la membrana externa. Sin embargo, como la infección por cepas de tipo silvestre, la vacunación con Rev 1 o S19 desencadena anticuerpos frente al O-PS, lo que dificulta así la diferenciación de los animales infectados y vacunados. La vacunación conjuntival de rumiantes durante los primeros meses de vida resuelve parcialmente este problema. Sin embargo, esto no es compatible con los programas de vacunación masiva. Si bien el uso de mutantes desprovistos del O-PS (los mutantes R) se ha propuesto como una solución, se ha demostrado que las vacunas con el O-PS delecionado son considerablemente menos eficaces que las vacunas clásicas (González *et al*., PLoS ONE 3, e2760,2008; Barrio *et al*., Vaccine, 27(11):1741-9, 2009).

El O-polisacárido del S-LPS de *Brucella* es un homopolímero de N-formil-perosamina que se produce exclusivamente como enlaces α (1-2) o como una combinación de enlaces α (1-2) más α (1-3) en una proporción > 4:1 (Perry y Bundle, Adams LG, ed. Advances in brucellosis research. College Station: Texas A&M University Press, 76-88, 1990). Este O-polisacárido porta tres tipos básicos de epítopos solapantes: C (común a todos los tipos químicos de O-polisacárido de *Brucella*); M (presente en los O-polisacáridos con enlaces α (1-3)) y A (presente en los O-polisacáridos sin enlaces α (1-3) o con una proporción de enlaces α (1-2) con respecto a α (1 -3) superior a 4:1). En todos estos epítopos, el grupo formilo desempeña un papel esencial (Bundle *et al*., Infect Immun., 57(9):2829-36 1989).

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es proporcionar un mutante de *Brucella* de acuerdo con la invención que desencadena una respuesta inmunitaria en donde los anticuerpos desencadenados contra el O-PS del LPS de la bacteria modificada son distintos de los desencadenados contra el O-PS del LPS de la bacteria de tipo silvestre. Por lo tanto, los anticuerpos desencadenados por la vacuna de acuerdo con la invención se detectan y diferencian fácilmente de los anticuerpos desencadenados por la bacteria de tipo silvestre, permitiendo de este modo la diferenciación de animales vacunados e infectados. Para este fin, los inventores han añadido una etiqueta antigénica al O-PS del LPS de la bacteria modificada de acuerdo con la invención. Esta adición se logra mediante la expresión de una enzima heteróloga dirigida al O-PS en las bacterias modificadas de acuerdo con la invención.

Por tanto, en una realización particular, la bacteria de acuerdo con la invención expresa adicionalmente una enzima heteróloga que acila, normalmente esta enzima heteróloga acetila el O-PS del LPS.

Más particularmente, dicha enzima heteróloga acila la perosamina del O-PS.

Dicha enzima heteróloga es capaz de transferir al O-PS un grupo acilo que no es formilo, normalmente un grupo acetilo; tal grupo puede incluir 3-desoxi-L-glicerotetronilo, 33-hidroxipropionilo, S(+)2-hidroxipropionilo y R(-)2-hidroxipropionilo.

Por tanto, en una realización particular, la bacteria de acuerdo con la invención puede expresar una enzima heteróloga que es N-aciltransferasa y, normalmente, dicha enzima heteróloga es una N-acetiltansferasa (número de la Comisión de Enzimas 2.3).

Preferentemente, el gen wbdR de *E. coli* O:157:H7 (ID del gen: 962088) expresa dicha N-acetiltransferasa.

Por lo tanto, en una realización adicional, la bacteria modificada de la invención es una mutante BABΔwadCΔppdK::wbdR.

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para introducir genes heterólogos en una bacteria.

El O-PS de *E. coli* O:157:H7 contiene solo una unidad de N-acetil-perosamina en un tetrasacárido repetitivo y reacciona de forma cruzada con *Brucella* solo débilmente.

En los hospedadores naturales, el etiquetado con el uso del gen *wbdR* de *E. coli* O:157:H7 solo se observa claramente en animales inmunizados con bacterias destruidas en adyuvante de Freund, y la infección desencadena solo anticuerpos IgM transitorios. La construcción de *Brucella-wbdR* modificada de acuerdo con la invención muestra un nuevo epítopo que no existe en la cepa original, y los anticuerpos para este nuevo epítopo se generan tras la

infección en animales de laboratorio. Después, estos anticuerpos *específicos para Brucella-wbdR* de acuerdo con la invención se pueden detectar, por ejemplo, en una prueba ELISA, que sería uno de los posibles formatos de una prueba para diferenciar animales infectados de vacunados.

La invención también se refiere a las aplicaciones terapéuticas de la bacteria mutante de acuerdo con la invención. En particular, la invención se refiere a la *Brucella* modificada de acuerdo con la invención para su uso como una vacuna del cuerpo humano o animal.

De hecho, los inventores han demostrado que las bacterias modificadas de acuerdo con la invención pueden usarse como vacuna elaborada con microbios vivos.

La invención se refiere, así, a la bacteria modificada del género *Brucella* de acuerdo con la invención, para su uso en un método para la vacunación del cuerpo humano o animal contra una enfermedad provocada por el tipo silvestre de dicha *Brucella* modificada.

En otro aspecto adicional de la invención, esta enfermedad es la brucelosis.

La invención también se refiere a un método para la vacunación de un sujeto contra una enfermedad provocada por una bacteria del género *Brucella,* comprendiendo dicho método la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha bacteria *Brucella* modificada de acuerdo con la invención.

En otro aspecto adicional de la invención, la bacteria del género *Brucella* se selecciona de *Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella suis, Brucella ovis, Brucella pinnipedialis, Brucella ceti, Brucella microti* y *Brucella canis.*

Preferentemente, la bacteria se selecciona de *Brucella abortus, Brucella melitensis,* más preferentemente, la bacteria es de la especie *Brucella abortus*.

Cuando la bacteria de acuerdo con la invención es de la especie *Brucella abortus*, puede usarse como una vacuna universal contra la brucelosis.

Por "vacuna universal contra la brucelosis", se entiende una vacuna que es eficaz contra todas las especies de bacterias del género *Brucella.*

Por "eficaz" se entiende que puede reducir significativamente una infección posterior provocada por una bacteria del género *Brucella.*

Los inventores descubrieron que, sorprendentemente, una vacuna que comprende una bacteria modificada de acuerdo con la invención, donde dicha bacteria modificada es de la especie *Brucella abortus*, puede usarse para vacunar a un ser humano o un animal contra todas las especies de bacterias que pertenecen al género *Brucella.*

Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a un ser humano o animal que puede beneficiarse de la administración de una bacteria modificada como se indica en el presente documento.

En una realización preferente, el sujeto es un animal seleccionado del grupo de ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos.

La siguiente tabla representa la asociación de las distintas especies de *Brucella* con su hospedador preferente.

Especie de *Brucella*	**Hospedador preferente**
Brucella abortus	Ganado vacuno
Brucella melitensis	Ovejas, cabras
Brucella suis	Cerdos, liebres y roedores silvestres
Brucella ovis	Ovejas
Brucella pinnipedialis	Cetáceos, Focas
Brucella ceti	Cetáceos, Focas
Brucella microti	Topillo campesino (*Microtus arvalis)*
Brucella canis	Cánidos

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una bacteria *Brucella* modificada como se describió anteriormente, se entiende una cantidad suficiente para tratar la enfermedad, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Una vacuna se define en el presente documento como un agente biológico que es capaz de proporcionar una

respuesta protectora en un animal o un ser humano al que se le ha suministrado la vacuna, y que es incapaz de provocar una enfermedad grave. La vacuna estimula la producción de anticuerpos o la inmunidad celular contra el patógeno que provoca la enfermedad; así, la administración de la vacuna da como resultado una inmunidad contra la enfermedad.

Si se desea, las vacunas vivas de acuerdo con la invención pueden contener un adyuvante. Los ejemplos de compuestos y composiciones adecuados con actividad adyuvante son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, pueden incorporarse a la vacuna secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos para aplicaciones farmacéuticas o de diagnóstico, en particular inmunomoduladores tales como linfocinas, interferones o citocinas.

Una vacuna de acuerdo con la invención puede prepararse por métodos convencionales tales como los utilizados comúnmente para las vacunas elaboradas con microbios vivos atenuadas disponibles en el mercado.

La vacuna puede administrarse por inoculación intramuscular, intradérmica, subcutánea o intranasal, o por inyección en una cantidad que sea eficaz para proteger al sujeto contra la exposición a una cepa virulenta de *Brucella.* Esta cantidad puede variar de acuerdo con el sujeto a inocular, teniendo en cuenta el tamaño y el peso del sujeto. La vacuna de acuerdo con la invención comprende una dosis eficaz del mutante de *Brucella* como componente activo, es decir, una cantidad suficiente del mutante de *Brucella* que inducirá inmunidad en los animales vacunados, frente a la exposición a la *Brucella* virulenta.

En el presente documento la inmunidad se define como la inducción de un nivel de protección significativamente más alto en una población de animales o seres humanos frente a la mortalidad y/o síntomas clínicos después de la vacunación, en comparación con un grupo no vacunado. En particular, la vacuna de acuerdo con la invención previene a una gran proporción de sujetos vacunados frente a la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad y/o a la mortalidad. Al proporcionar a un sujeto vacunas elaborada con bacterias vivas, la dosificación de bacterias administradas variará dependiendo de factores tales como la vía de administración, especie del sujeto, edad, peso, altura, sexo, estado médico general, antecedentes médicos previos, etc. En general, es conveniente proporcionar al receptor una dosificación de las bacterias anteriores que varía de aproximadamente 10^5 ufc/kg a 10^8 ufc/kg (peso corporal del sujeto), aunque se puede administrar una dosificación menor o mayor.

Además del mutante de *Brucella* (o las variantes descritas de lo mismo), la invención también puede incluir vacunas combinadas que comprenden una cepa vacunal capaz de inducir protección frente a otro patógeno.

En las siguientes figuras y ejemplos se divulgarán aspectos y ventajas adicionales de la presente invención, los cuales deben considerarse como ilustrativos y no limitantes del alcance de la presente solicitud.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Multiplicación intracelular de la cepa parental de Ba y las cepas de construcción BABAwadC, *BABAppdK, BAB-ΔppdK pRH001_ppdK, BABAwadCAppdK* y *BABΔwadCΔppdKv.wbdR* en CDMO a las 24 h y 48 h posinfección. Los resultados son representativos de la media ± el error típico de tres experimentos independientes, y cada experimento se realizó por triplicado.

Figura 2: Expresión superficial de las moléculas de activación CD40, CD80, CD86 y MHCII en CDMO a las 24 h posinfección con las cepas parental de Ba, BABAwadC, BABAppdK, *BABΔppdKpRH001_ppdK, BABAwadCAppdK* y *BABΔwadCΔpp-dKv.wbdR*, medidas por citometría de flujo. Los resultados son representativos de la intensidad media, mediana ± error típico y son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 3: IL-6, IL-12 p70 y TNF-α liberados por CDMO a las 24 h después de la infección con las cepas parental de Ba, BABAwadC, BABAppdK, *BABΔppdKpRH001_ppdK, BABAwadCAppdK* y *BABAwadCΔppdK:.wbdR* medidos por ELISA. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 4: IL-6, IL-12 y TNF-α liberados por CDMO a las 24 h después de la infección con las cepas parental de Bm, BmΔwadC, *BmΔwadCΔppdk* medidos por ELISA.

Ejemplos

1) Construcción del mutante de *wadC* (BABAwadC)

BABAwadC ya se ha descrito en el documento WO2011/033129 bajo el nombre de BABLpcC mutante con un gen *lpcC* inactivado y se realiza de manera similar en la presente invención.

2) Construcción de mutantes en el gen ppdK que codifican la piruvato fosfato diquinasa (BABAppdK)

La mutación del gen *ppdK* (ORF BAB1_0525 u homólogos) se construyó mediante solapamiento por PCR en *B.*

abortus 2308 de la siguiente manera. Se utilizaron los cebadores ppdK-F1 (5'-CTCCCGATTCATTTTTCACG-3'SEQ ID NO: 1) y *ppdK-R2* (5'-TGCTCATTTCAGCCAGGTT-3' SEQ ID NO: 2) para amplificar un fragmento de 288 pb que incluía los primeros 103 pb del ORF de *ppdK*, así como 185 pb cadena arriba del codón de iniciación *ppdK*, y los cebadores ppdK-F3 (5'-AACCTGGCTGAAATGAGCACGGGTCTCGACTATGTGTCC-3' SEQ ID No.3) y ppdK-R4 (5'-TCAACGCATCAAAGCAGAAG-3' SEQ ID NO: 4) para amplificar unos 220 pb que incluían los últimos 86 pb del ORF de *ppdK* y 134 pb cadena abajo del codón de terminación de *ppdK*.

Ambos fragmentos se ligaron mediante PCR solapante utilizando los cebadores ppdK-F1 y ppdK-R4, y el fragmento obtenido, que contenía el alelo de deleción, se clonó en pCR2.1 para generar pMZI-1, se secuenció para confirmar que se había mantenido el marco de lectura y se subclonó en pJQKm para producir el plásmido mutador pMZI-2. Este plásmido se introdujo en *B. abortus* 2308 y tanto la mutación de deleción (BABAppdK) como la cepa retromutante hermana generada por intercambio alélico se seleccionaron por resistencia a Nal y sacarosa y sensibilidad a Km, y por PCR utilizando *ppdK*-F1 y ppdK-R4, que amplificaron un fragmento de 508 pb en BABAppdK y un fragmento de 2983 pb en la cepa retromutante hermana de BABppdK. La mutación generada dio como resultado una pérdida del 93 % del orf de *ppdK*, y la complementación con un plásmido que porta el gen de tipo silvestre (cepa BABAppdK pRH001_ppdK) confirmó que el fenotipo del mutante estaba provocado por la deleción en *ppdK.*

3) Construcción de un doble mutante de acuerdo con la invención: BABΔwadCΔppdK

Para construir el doble mutante BABΔwadCΔppdK, el plásmido mutador pMZI-2 se introdujo en la cepa BABΔwadC que portaba la mutación de*wadC*. Después del intercambio alélico, el doble mutante se seleccionó como se describe anteriormente, utilizando los cebadores ppdK-F1 (SEQ ID NO: 1) y ppdK-R4 (SEQ ID NO: 4).

El doble mutante BmΔwadCΔppdK se ha construido de manera similar pero utilizando en su lugar una cepa de *Brucella melitensis*.

4) Etiquetado genético de los candidatos vacunales de *Brucella*.

Utilizando un plásmido no integrativo, se clonó el gen *wbdR* (ORF z3192), que codifica la transferasa que acetila la perosamina en el polisacárido O del LPS heteropolimérico de *E. coli* O:157:H7 y el plásmido que lo portaba se introdujo en *B. abortus* por conjugación. El análisis por 1H-RMN demostró que esta construcción expresa un polisacárido O que contiene el 60 % de N-acetilperosamina y el 40 % de formilperosamina. El análisis por anticuerpos monoclonales mostró que la construcción carece del epítopo A mientras que mantiene el epítopo C. Además, el polisacárido N-acetilperosamina-N-formilperosamina portaba un nuevo epítopo (o nuevos epítopos) no presente en *B. abortus* de tipo silvestre, como demostró la inmunización de animales de laboratorio.

Para superar cualquier posible inestabilidad del plásmido, el gen *wbdR* se integró en el cromosoma de los candidatos vacunales de *B. abortus* (BABΔwadC, BABΔppdK and BABΔwadCΔppdK). Para esto, se utilizó una técnica de direccionamiento a genes con mini-Tn7, utilizando el plásmido suicida pUC18R6KTmini-Tn7TKm (Llobet *et al*, Antimicrob Agents Chemother.,53(1):298-302, 2009). Esta estrategia se basa en la inserción estable de Tn7 en la región colocada en la región intergénica entre los genes *glmS* (que codifica la glucosamina-6-fosfato sintasa) y *recG* (que codifica una helicasa de ADN dependiente de ATP) (Choi *et al*., Nat Methods., 2(6):443-8,2005; y Nat Protoc., 1(1):170-8,2006)
Para el etiquetado, se emparejaron las construcciones de *B. abortus* con *E. coli* S17λpir donantes (que porta el pUC18R6KTmini-Tn7TKm-PwbdR) y pTNS2 *E. coli* SM10λpir (plásmido que codifica la información para la transposición de Tn7) con la ayuda de pRK2013 de *E. coli* HB101 (que permite la movilización de plásmidos). Las bacterias en las que se produjo la integración se seleccionaron en medios que contenían kanamicina (BAB ΔwadCΔppdK::wbdR). Para garantizar que la inserción se produjera inmediatamente después del codón de terminación de *glmS,* las PCR se realizaron utilizando los oligonucleótidos Tn7R-Tn7L específicos para los extremos de Tn7, y oligonucleótidos específicos para *glmS* y recG. Para confirmar que se había producido una única inserción de Tn7, se realizó transferencia de Southern. Este método de etiquetado también se aplica a otras construcciones.

Ensayos de multiplicación intracelular

Se aislaron células de médula ósea de fémures de ratones hembra C57B1/6 de 6-8 semanas de edad y se diferenciaron en células dendríticas (CDMO) como se ha descrito anteriormente (Inaba *et al*., J Exp Med, 176: 1693-1702, 1992), en presencia de suero de ternera fetal descomplementado (eurobio, Francia) y GM-CSF. Las infecciones se realizaron centrifugando las bacterias sobre las células diferenciadas (400xg durante 10 min a 4 ºC) a una relación bacterias:células de 30:1, y se incubaron a 37 ºC (CO_2 al 5 %) durante 30 min. Después, las células se lavaron suavemente con medio de cultivo para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron en medio complementado con 50 µg/ml de gentamicina durante 1 h para destruir cualquier bacteria extracelular restante. Después de eso, se redujo la concentración de antibiótico a 10 µg/ml. Para detectar la supervivencia intracelular de *Brucella*, las células infectadas se lisaron con Triton X-100 al 0,1 % (vol/vol) en H_2O a las 24 h y 48 h posinfección, y se realizaron diluciones en serie de los lisados recuperados antes sembrar en placas con agar de soja tríptico (por triplicado) para enumerar las UFC.

Los niveles de IL-6, IL-12 p70 y TNF-α, se determinaron mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISA de eBioscience) en los sobrenadantes de las CDMO a las 24 horas posinfección (véase arriba), con distintas cepas de *Brucella* de tipo silvestre y mutantes.

Citometría de flujo

A las 24 h después de la infección con los distintos tipos cepas de *Brucella* de tipo silvestre y mutantes (véase arriba), se recogieron las CDMO y se tiñeron inmediatamente para la expresión del receptor de superficie, antes de la fijación con paraformaldehído al 3 %. Las células se marcaron con los anticuerpos conjugados con fluorocromo específicos para CD11c de ratón:PE-Cy7 (clon N418), IA-IE:PE (MHC de clase II clon M5/114.15.2) (PE), CD86:FITC (Clon GL-1), CD40:AlexaFluor 647 (clon 3/23) y CD80:PE-Cy5 (clon 16-10A1), todos de BioLegend. Después, las células marcadas se sometieron a citometría multicolor utilizando un FACScanto II (Becton Dickinson) y los datos se analizaron con el programa informático FlowJo, seleccionando en primer lugar la población CD11c+ antes de cuantificar la expresión de los receptores.

Las Figuras 2 a 4 demuestran que el doble mutante puede desencadenar una liberación intensa de varias interleucinas inflamatorias, en particular de IL6, IL12 y TNFα. La combinación específica de mutaciones en los genes ppdK y wadC en una bacteria de acuerdo con la invención genera una fuerte respuesta inmunitaria y, por lo tanto, potencia la eficacia de una vacuna que contiene dicho mutante. El doble mutante induce una producción de citocinas proinflamatorias significativamente más alta que el mutante simple ΔwadC (independientemente de la cepa utilizada).

La Figura 1 demuestra adicionalmente que las células dendríticas pueden eliminar por completo al doble mutante a las 48 h después de la inyección.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> BACTERIAS MODIFICADAS PARA VACUNAS MEJORADAS CONTRA LA BRUCELOSIS

<130> BEP140372

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
ctcccgattc atttttcacg 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 2
tgctcatttc agccaggtt 19

<210> 3
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3
aacctggctg aaatgagcac gggtctcgac tatgtgtcc 39

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
tcaacgcatc aaagcagaag 20

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria modificada del género *Brucella* que porta un gen *wadC* inactivado y un gen *ppdK* inactivado, en donde dichos genes codifican una proteína no funcional o ninguna proteína.

2. La bacteria modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha bacteria expresa adicionalmente una enzima heteróloga que acila las cadenas laterales del polisacárido O (O-PS) del lipopolisacárido (LPS).

3. La bacteria modificada de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha enzima heteróloga acila la perosamina del O-PS.

4. La bacteria modificada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde dicha enzima heteróloga transfiere un grupo acetilo al O-PS.

5. La bacteria modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha enzima heteróloga es una N-acetiltansferasa expresada por el gen wbdR de *E. coli*.

6. La bacteria modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha bacteria pertenece a una especie seleccionada del grupo que consiste en *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella ceti*, *Brucella microti* y *Brucella canis*.

7. La bacteria modificada de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la especie de dicha bacteria es *Brucella abortus* o *Brucella melitensis*.

8. La bacteria modificada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la especie de dicha bacteria es *Brucella abortus*.

9. La bacteria modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como vacuna del cuerpo humano o animal.

10. La bacteria modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para la vacunación de un sujeto contra una enfermedad provocada por una bacteria del género *Brucella*.

11. La bacteria modificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad es la brucelosis.

12. La bacteria modificada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde dicho sujeto es un animal seleccionado del grupo que consiste en ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos.

Figura 1

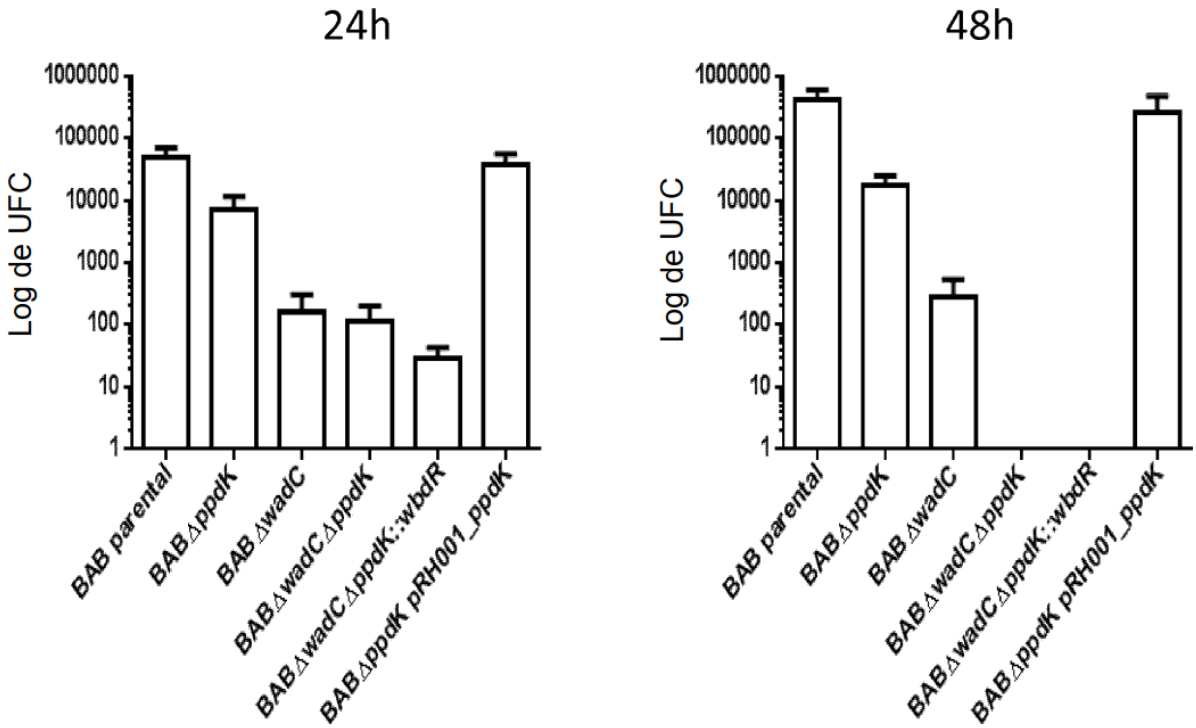

24h
48h
Log de UFC
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
BAB parental
BAB Δ ppdK
BAB ΔwadC
BAB ΔwadC Δ ppdK
BAB ΔwadC Δ ppdK::wbdR
BAB Δ ppdK pRH001_ppdK

Figura 2

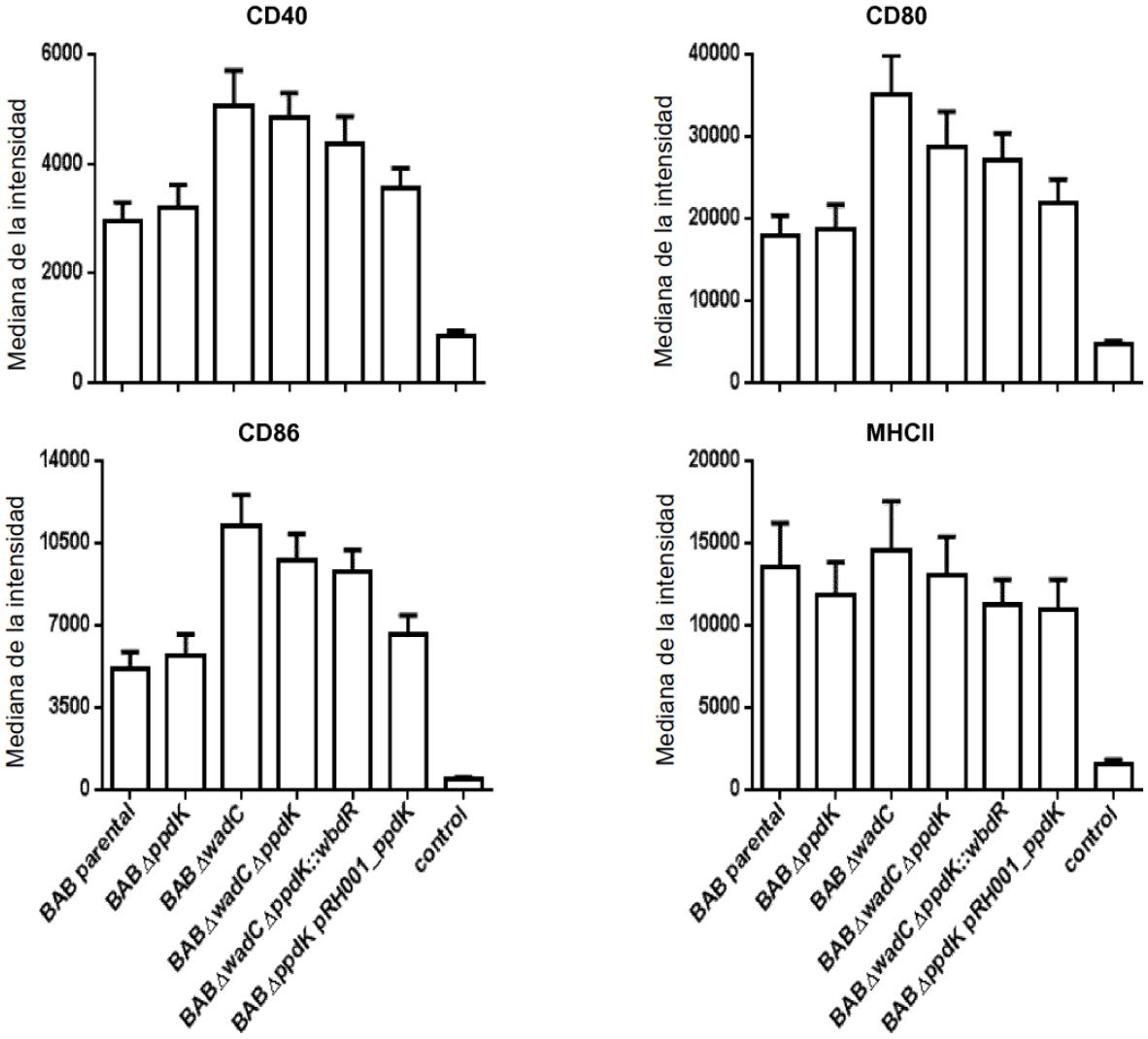

CD40
Mediana de la intensidad
6000
4000
2000
0
CD80
Mediana de la intensidad
40000
30000
20000
10000
0
CD86
Mediana de la intensidad
14000
10500
7000
3500
0
MHCII
Mediana de la intensidad
20000
15000
10000
5000
0
BAB parental
BAB ΔppdK
BAB ΔwadC
BAB ΔwadC ΔppdK
BAB ΔwadC ΔppdK::wbdR
BAB ΔppdK pRH001_ppdK
control

Figura 3

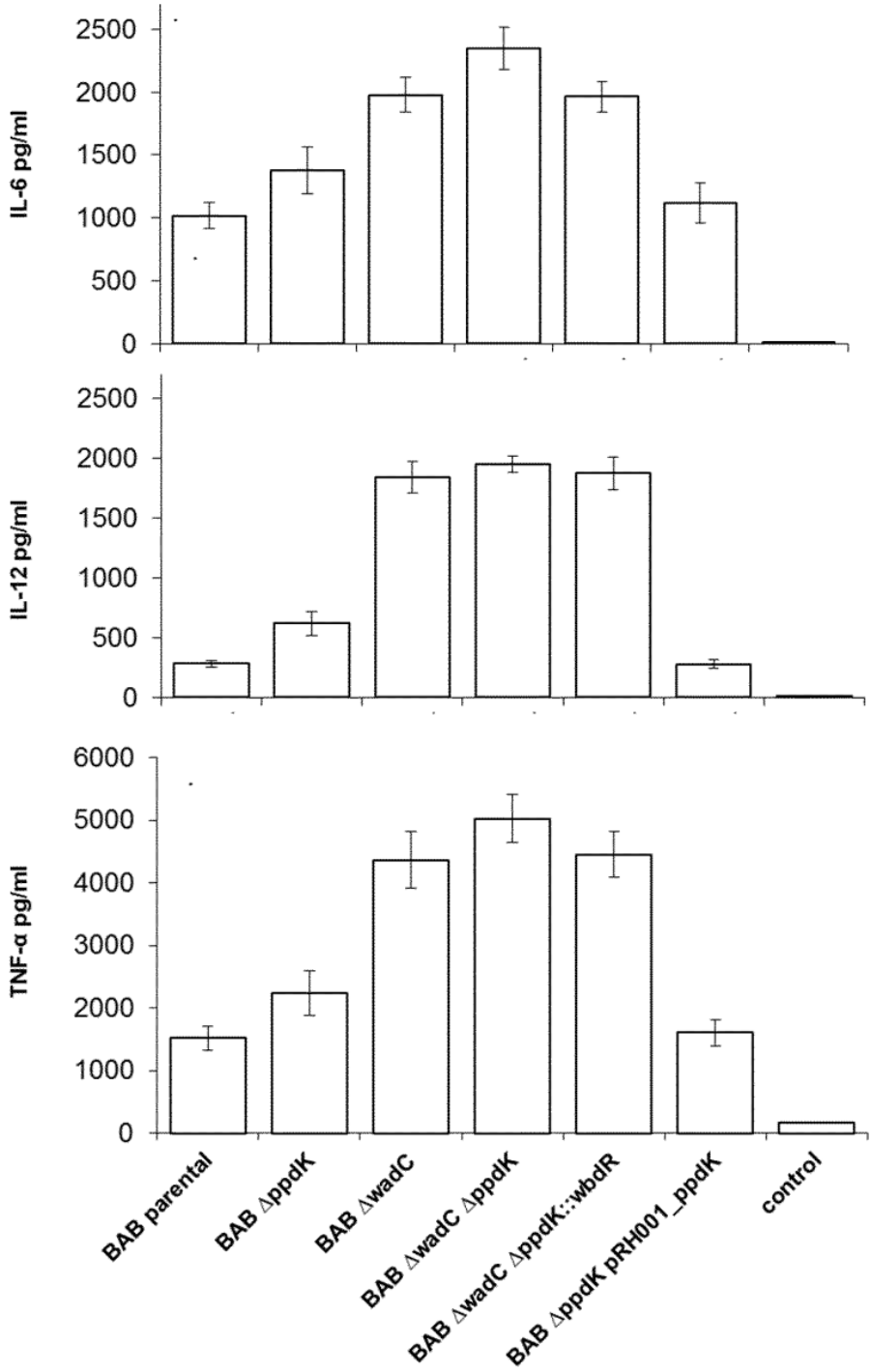
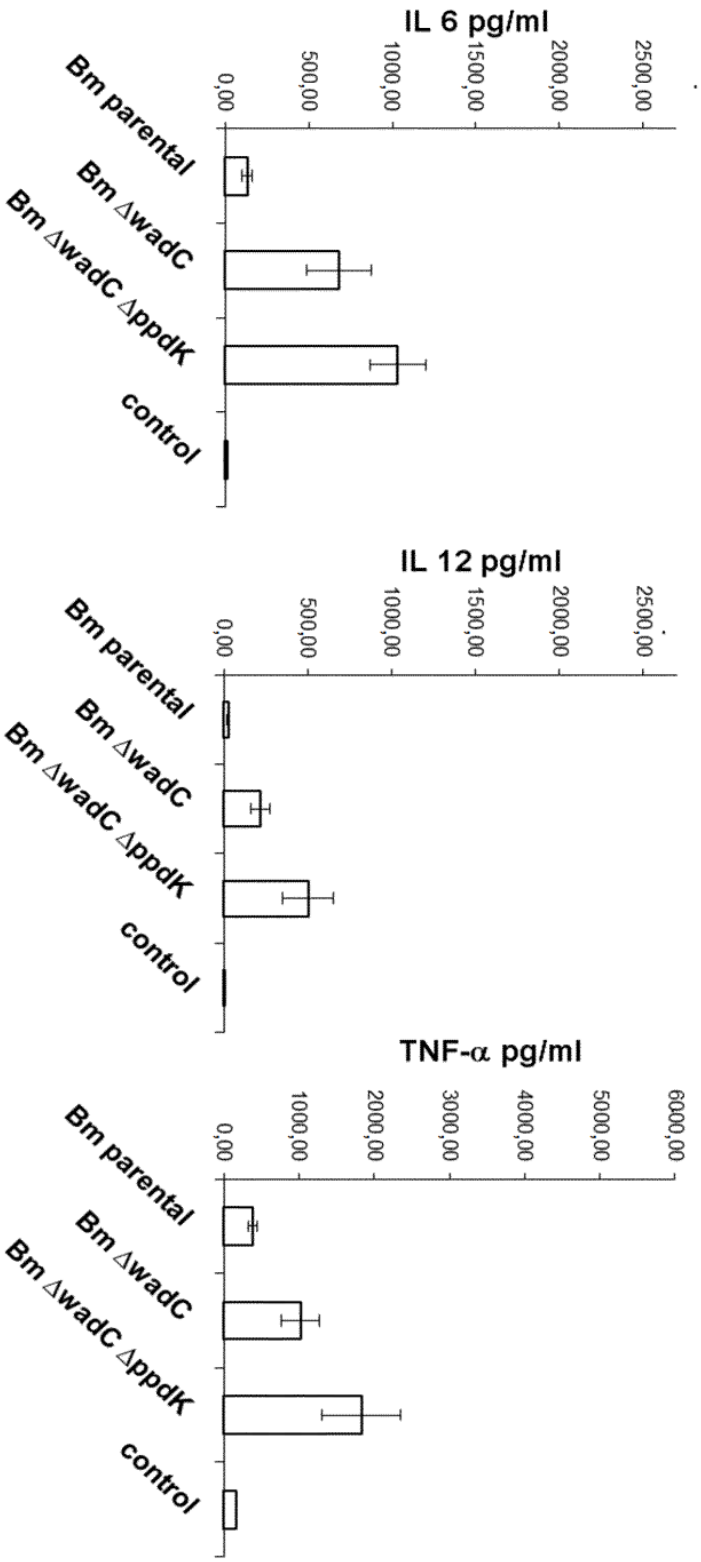

IL-6 pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
IL-12 pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
TNF-α pg/ml
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
BAB parental
BAB ΔppdK
BAB ΔwadC
BAB ΔwadC ΔppdK
BAB ΔwadC ΔppdK::wbdR
BAB ΔppdK pRH001_ppdK
control

Figura 4


IL 6 pg/ml
2500,00
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
0,00
Bm parental
Bm ΔwadC
Bm ΔwadC ΔppdK
control
IL 12 pg/ml
2500,00
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
0,00
Bm parental
Bm ΔwadC
Bm ΔwadC ΔppdK
control
TNF-α pg/ml
6000,00
5000,00
4000,00
3000,00
2000,00
1000,00
0,00
Bm parental
Bm ΔwadC
Bm ΔwadC ΔppdK
control