

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 429**

51 Int. Cl.:

C12R 1/42 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013** **E 18181260 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3415643**

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:

30.07.2020

73 Titular/es:

ELANCO TIERGESUNDHEIT AG (100.0%)

Mattenstr. 24A

4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

LINDE, KLAUS y

GROSSE-HERRENTHEY, ANKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 776 429 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 proporciona un método 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 método.

5 El documento WO 95/07101 describe una vacuna de *Salmonella* viva.

Muchas de las vacunas bacterianas vivas comprenden bacterias atenuadas que se han manipulado por técnicas biomoleculares. Desafortunadamente, la mayoría de estas vacunas se considera que son insuficientes para cumplir los requisitos de la práctica por las siguientes razones:

- 10 (a) La producción es compleja y consume tiempo, el grado de atenuación no puede controlarse y, en consecuencia, la adaptación a la susceptibilidad del hospedante es a menudo insatisfactoria.
- (b) Los métodos de ensayo (pruebas clínicas) requeridos por la autoridad legislativa también son complicados.
- (c) La población que se va a vacunar es limitada.

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

- 15 (a) Los costes para la preparación son bajos y el grado de atenuación a través de la selección deseada de un número de generaciones 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 métodos de ensayo complicados.
- (c) Incluso tamaños de lote más pequeños darán buenos resultados.

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

- 25 (a) La interacción del agente patógeno frente al hospedante se basa en la tolerancia mutua. Los hospedantes altamente susceptibles sobreviven como individuos únicos cuando se infectan accidentalmente por un mutante atenuado de un agente patógeno altamente virulento. La población de hospedantes 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 dan como resultado disfunción (es decir, atenuación = coste de adaptación). Como una consecuencia, pueden encontrarse tamaños de colonias gradualmente reducidos (dependiendo del clon) en comparación con la cepa natural.
- 30 Normalmente, estos mutantes son eliminados por el hospedante inmunocompetente o, alternativamente, son sobrepasados en crecimiento por la flora normal adaptada.
- (c) Los tamaños de colonias reducidos de los mutantes DM se correlacionan inversamente con el número de generación (prolongado) y el grado de atenuación (creciente).
- (d) Se ha demostrado la efectividad convincente de las vacunas de ensayo atenuadas DM y las vacunas.

35 Los mutantes DM pueden seleccionarse y aislarse como:

- (a) clones de resistencia a antibióticos DM (DM "res") espontáneos de, por ejemplo, estreptomina, rifampicina, fosfomicina, ácido fusídico, ácido nalidixico. 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 la atenuación pueden considerarse como una entidad funcional.
- 40 (b) Mutantes de tolerancia al estrés ambiental aumentada (iet) que indirectamente se acumulan en el cultivo "que muere poco a poco".
- (c) Mutantes supresores independientes de estreptomina (Sm-id) derivados de clones dependientes de estreptomina (Smd). Estos dos mutantes marcadores consisten en un amplio espectro de clones caracterizados por tamaños de colonias reducidos gradualmente específicamente del clon y grados de atenuación en aumento,
- 45 respectivamente, desde virulencia casi tipo natural 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, los polluelos toleran la *Salmonella* patógena facultativa (y generalmente incluso *Campylobacter*) sin mostrar ningún síntoma clínico. De esta manera, la baja virulencia de estas cepas naturales para los polluelos requiere cepas de vacuna que muestren un grado moderado de atenuación que asegure por un lado la inmunogenicidad para los polluelos pero que excluya por otro lado un peligro para los seres humanos.

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

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 25% del tamaño de colonia de la cepa natural. Además, esta condición esencial debe estar en línea con los requisitos de seguridad de la OMS: 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 haciendo de esta manera a la vacuna menos eficaz.

De esta manera, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar cepas de vacunas vivas mejoradas caracterizadas por mayor estabilidad. La solución de dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones, es decir, proporcionar cepas de vacunas vivas mejoradas con una mayor estabilidad basada 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 podía mostrarse que mediante el uso de atenuación DM pueden generarse cepas de vacuna caracterizadas por tres (o incluso más) mutaciones atenuantes independientes que muestran mayor estabilidad 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 descritos 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, desde colonias tipo cepa natural 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 "res") 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 gradual de dos o tres mutaciones Sm-id y un marcador adicional DM "res" (A a, A α) son novedosas igualmente, para estreptomycin: Smd 1 $\rightarrow$ Sm-id I $\rightarrow$ Smd a $\rightarrow$ Sm-id II $\rightarrow$ Sm- α $\rightarrow$ 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 colonias gradualmente reducidos, de los mutantes Sm-id con combinaciones de dos, cuatro o seis marcadores empieza: (a) para cepas Sm-id con tamaños de colonias de la cepa natural, (b) para cepas Sm-id I/ Sm-id II con tamaños de colonias de los tamaños de colonias similares a 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 de tipo Sm-id I/ Sm-id II. De esta manera, estos no son revertientes de tipo cepas naturales.

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 10% de las colonias mutantes resistentes a Sm normales de, por ejemplo, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, son clones Smd (como un principio biológico evidente). 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 describe que es aproximadamente 0,1% o el aislamiento de dichas cepas solo se pudo lograr mediante el uso de mutagénesis, respectivamente.

De forma interesante, después del análisis de aproximadamente 5000 mutantes resistentes a Sm los autores de la presente invención no pudieron encontrar ninguna cepa Smd. Además, se debe destacar 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 probablemente las rutas de Smd ribosómicas son un principio evolutivo de adaptación se ensayaron dos posibles mecanismos:

(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, p. ej. de cultivos ≤ 18 h/37°C pero no de cultivos ≥ 48 h/37°C

5 (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 pases.

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 resistentes a Sm: clones que muestran alta resistencia solamente podrían obtenerse mediante el uso de múltiples pases frente a concentraciones en aumento de estreptomicina. Una resistencia a Sm en una etapa solamente podría lograrse mediante el uso de una concentración de 20 µg de estreptomicina/ml. Los experimentos de los autores de la presente invención para aislar mutantes que muestran resistencia a Sm y mutantes Smd usando 100 µg de estreptomicina/ml (sembrando 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 de 24 h/39°C al de 72 h/39°C como se muestra en la siguiente tabla.

15 Tabla 1

Campylobacter coli y *Campylobacter jejuni*: Recuentos viables en placas Petri con agar Caso frente al periodo de incubación a 39°C

<i>Campylobacter</i>	24 h	48 h	72 h
<i>C. coli</i>	1×10^{10}	3×10^9	7×10^8
<i>C. jejuni</i>	3×10^{10}	5×10^9	1×10^9
<i>C. coli</i> Smd	3×10^9	3×10^8	4×10^7

20 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 a Sm solo podrían obtenerse sembrando 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 podían caracterizarse como clones Smd.

25 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.

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

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

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

40 (A) *Salmonella virchow*:

cepa natural / Sm-id I 1.4/ Sm-id II 0.3/ Sm 4;
 cepa natural/ Sm-id I 1.4/ Sm-id II 0.3/ Sm-id III 0.x.

(B) *Salmonella infantis*

45 cepa natural/ Sm-id I 4.22/ Sm-id II 0.1/ Rif 2;
 cepa natural/ 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* // cepa natural/ Sm-id I 18.1/ Sm-id II a.1. Esta cepa se caracteriza en cuanto que la segunda mutación Sm-id a.1 da como resultado una resistencia a Sm.

5 (B) *Campylobacter coli* // cepa natural/ Sm-id I 17.7/ Sm-id II a.1/ Phol, cepa natural/ Sm-id I 17.7/ Sm-id II a.1/ Sm-id III a.1.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los siguientes aspectos:

- 10 1. Las cepas de *Campylobacter* depositadas 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 26683 o DSM26684.
2. Una vacuna que comprende una o más cepas según el aspecto 1.
3. Uso de la cepa o cepas del aspecto 1 para la preparación de una vacuna.
4. Una vacuna según el aspecto 2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección por *Campylobacter*.

15 Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona

un método 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 método comprende las siguientes etapas:

- 20 (a) proporcionar una cepa bacteriana y hacer crecer dicha cepa en presencia de un primer antibiótico, preferentemente estreptomycinina;
- (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 natural;
- 25 (d) hacer crecer un clon obtenido en la etapa (c) en un medio complementado con un segundo antibiótico que puede diferir del primer antibiótico (p. ej., un aminoglucósido tal como estreptomycinina, neomicina, kanamicina, espectinomycinina, gentamicina, amikacina y tobramicina; rifampicina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, fosfomicina), que tiene una concentración adecuada, preferiblemente de aproximadamente diez veces la CIM;
- (e) aislar y realizar pases seriados de colonias que muestran un tamaño reducido (DM A “res”); y
- 30 (f) aislar clones que tienen la reducción gradual del tamaño de colonia como propiedad estable.

La cepa bacteriana de la etapa (a) se obtiene, preferentemente, a partir de cepas virulentas “naturales”. Estas cepas pueden tomarse de animales enfermos (p. ej., pollos). Las cepas naturales de partida que se usan deben tener un cierto grado de virulencia.

35 La elección del antibiótico para seleccionar los mutantes de la etapa (a) está guiada por razones de una naturaleza práctica. Por ejemplo, se sabe que la estreptomycinina rápidamente da lugar al desarrollo de resistencia y cepas dependientes entre los microorganismos.

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

40 Se sabe que la resistencia al antibiótico puede resultar de diferentes mecanismos de modificación. En particular, la modificación genética puede afectar a 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.

45 La frase “mini colonias” como se usa en el presente documento se refiere a colonias bacterianas caracterizadas por una reducción del tamaño. Preferiblemente, se caracterizan por un tamaño $\leq 10\%$ de las colonias de cepas naturales correspondientes.

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

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, p. ej., 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. Preferiblemente, 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) (p. ej., para *Salmonella*) o un medio Caso (p. ej., para *Campylobacter*).

La etapa (d) permite introducir una mutación (como un tercer marcador de atenuación) de resistencia a antibióticos ("res") DM adicional. Preferiblemente, el antibiótico es estreptomina, rifampicina o fosfomicina. La concentración del antibiótico en la etapa (d) la puede determinar la persona experta en la materia de acuerdo con procedimientos rutinarios. Preferiblemente, para *Salmonella* la concentración de rifampicina, estreptomina (nota: la mayoría de mutantes Sm-id son sensibles a estreptomina y por lo tanto adecuados para un marcador DM Sm "res" adicional) y fosfomicina corresponden a un valor de CIM de aproximadamente diez veces y para ácido fusídico a un valor de CIM de aproximadamente cuatro veces. Preferiblemente, para *Campylobacter*, se usan al menos 200 µg de fosfomicina/ml y al menos 100 µg de estreptomina/ml, respectivamente.

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

Finalmente, en la etapa (f) se proporcionan los clones aislados de la etapa (e) que tienen la reducción gradual del tamaño de colonia como una propiedad estable.

Preferiblemente, las etapas (a) a (c) se repiten al menos una vez para la generación de bacterias que llevan al menos cuatro mutaciones de atenuación. Este método permite generar nuevos mutantes de atenuación, p. ej. 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 α → Sm-id III;
- (c) Smd 1 → Sm-id I → Smd a → Sm-id II → Smd α → Sm-id III → DM "res" a 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 de "res" a antibiótico está guiada por 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, p. ej., estreptomina (nota: la mayoría de mutantes Sm-id son sensibles a estreptomina y por lo tanto adecuados para un marcador DM Sm "res" adicional), rifampicina, fosfomicina, ácido fusídico o ácido nalidixico.

El método 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 métodos descritos.

Sin embargo, las bacterias preferidas son *Salmonella* y/o *Campylobacter*, especialmente *Salmonella bongori*, *S. enterica* subespecies *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae* e *indica*, preferiblemente *S. enterica* subespecie *enterica* tales como las siguientes Sero variedades: Dublin, Gallinarum (bio variedades 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*.

Preferiblemente, 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 de 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 de incubación a 39°C.

La presente invención también proporciona cepas de bacterias vivas obtenibles por el método descrito, así como una vacuna que comprende cepas bacterianas vivas de la invención y un vehículo biológicamente aceptable. Las

composiciones de vacunación pueden por supuesto estar constituidas por medio de bacterias recientemente cultivadas.

Preferiblemente, la composición de vacuna de la presente invención está liofilizada.

5 Para administrar las bacterias de vacunación, 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.

10 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 la que un individuo puede inmunizarse. Una "cantidad adecuada para la inmunización de un individuo" puede determinarse usando métodos 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 seres humanos).

La administración preferida de la vacuna 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 refuerzo" que tengan aproximadamente cantidades iguales.

15 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, p. ej., una infección/colonización provocada por *Salmonella* o *Campylobacter*.

Las siguientes cepas se han depositado con la Colección Alemana de Cultivos Tipo (Deutsche Sammlung von 25 Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig) el 27 de noviembre de 2012 bajo el Tratado de Budapest:

Nombre	Número de acceso
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serovariedad 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

20

Los ejemplos a continuación explican la invención con más detalle.

Ejemplo 1

Materiales

(A) Cepas

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

30 (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).

35 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)

(D) Valores de CIM de cepas de tipo natural

40

Cepa	Estreptomicina	Rifampicina	Fosfomicina
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovariedad Virchow	12,5	12,5	n.d.
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovariedad Infantis	12,5	12,5	n.d.
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovariedad Hadar	25	12,5	n.d.
<i>Salmonella paratyphi</i> B (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

(a) Aislamiento orientado a la práctica de mutantes Smd de *Salmonella*.

- 5 Aproximadamente 10^{10} ufc de un cultivo de 18 h/37°C de *Salmonella* se colocaron en una placa Petri que contiene agar SC complementado con 500 µg de estreptomycin/ml. Aparte de colonias que tenían tamaños normales y colonias individuales que tenían tamaños ligeramente disminuidos (clones resistentes a Sm virulentos y clones DM Sm "res") pudieron detectarse "mini colonias" (predominantemente variantes de colonia pequeña = scv) con frecuencias variables, dependiendo de la cepa. Después de un tiempo de incubación de aproximadamente ≥ 48 h (a 37°C) pudieron
- 10 detectarse 1 a 2 mini colonias adicionales (por aproximadamente 30 colonias que tenían tamaños normales y colonias que tenían tamaños ligeramente disminuidos) que no se podían distinguir de las scv. Dependiendo de la frecuencia de aparición del fenotipo scv, se podría mostrar que de 3% a 20% de estas mini colonias representan mutantes Smd.

La frecuencia calculada de los clones Smd en relación con los mutantes resistentes fue $\geq 1\%$.

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

(b) Aislamiento orientado a la práctica de mutantes Smd de *Campylobacter*.

- 20 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 cubierta, se colocó en 1 o 2 placas Petri con agar Caso complementado con 100 µg de estreptomycin/ml y se incubaron durante 72 h a 39°C. Dependiendo de la cepa fueron detectables ≤ 10 colonias/placa (valor promedio) que tenían tamaños normales y colonias que tenían tamaños ligeramente disminuidos (clones resistentes a estreptomycin y DM Sm "res"). Además, fueron detectables las colonias que tenían un tamaño claramente reducido (el diámetro es $\leq 25\%$ del tamaño normal) con una frecuencia de aproximadamente 20%, en comparación con las colonias que tenían tamaños normales y colonias que tenían tamaños ligeramente reducidos. Aproximadamente un tercio de estas colonias fueron clones Smd.

- 25 La frecuencia calculada de los clones Smd en relación con los mutantes resistentes fue $\geq 5\%$.

Ejemplo 3

Selección y aislamiento de mutantes Sm-id

(a) Aislamiento de mutantes Sm-id de *Salmonella* a partir de clones Smd.

- 30 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 se trataron adicionalmente aquellos mutantes que mostraron un tamaño de colonia de aproximadamente $\geq 50\%$ en comparación con las colonias de cepas de tipo natural (de acuerdo con el objetivo para obtener clones Sm-id que tienen solo baja atenuación).

(b) Aislamiento de mutantes Sm-id de *Campylobacter* a partir de clones Smd.

- 35 El material bacteriano obtenido de un cultivo de placa Petri de agar Caso (complementado con 100 µg 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 ≤ 10 revertientes atenuados (en promedio). La mayoría de estos revertientes atenuados fueron sensibles a Sm. Generalmente, los clones Sm-id que mostraban un tamaño de colonia reducido de
- 40 aproximadamente $\geq 50\%$ en comparación con colonias de cepas de tipo natural se procesaron adicionalmente.

Algunas cepas, p. ej., *Campylobacter jejuni*, permitieron el aislamiento solamente de Sm-id que tenía un tamaño de colonia de $\leq 50\%$ en comparación con la cepa de tipo natural.

- 45 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

Aislamiento de un mutante de "res" a antibiótico DM adicional

La incorporación de una mutación de “res” a 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,

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

10 (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 sembró en placa en una relación de 1:4 a 1:8 en medio Caso complementado con 200 µg de fosomicina/ml o 100 µg de estreptomicina/ml y se incubaron durante ≥ 72 h a 39°C.

Las colonias que mostraban tamaños (más o menos) reducidos se aislaron y se sometieron a pases seriados. Aproximadamente 20% de estos clones mantuvo la reducción del tamaño de colonia gradual específicamente según el clon como un rasgo estable.

15 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.

20 (a) *Salmonella*: Aproximadamente 10^{10} ufc de los mutantes Sm-id I básicos (o la cepa de partida Sm-id II) se sembraron en placa en medio SC complementado con 500 µg de estreptomicina/ml y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Aproximadamente 5% de las colonias resistentes a Sm son mutantes Smd (que 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 3(a). Los clones que tienen la reducción de tamaño de colonia deseada se trataron adicionalmente.

25 (b) *Campylobacter*: El material obtenido a partir de un cultivo de placa Petri en medio Caso que se inoculó con un mutante Sm-id de manera tal que cubriera la superficie entera e incubado durante 24 h a 39°C, se sembró en placa en una relación de 1:4 en medio Caso complementado con 100 µg de estreptomicina/ml y se incubó durante 72 h a 39°C. Además de las aproximadamente 15 colonias resistentes a 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 mostraban la reducción del tamaño de colonia deseada se trataron adicionalmente.

Ejemplo 6

35 Aislamiento de un mutante de “res” a antibiótico DM de mutantes Sm-id II seleccionados

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

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

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

Ejemplo 7

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

50 Las suspensiones de las correspondientes cepas de tipo natural y los mutantes MD derivados de estas cepas se diluyen logarítmicamente y después se siembran en placa en medios de cultivo de tal manera que puedan obtenerse de 10 a 50 colonias individuales 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 individuales que

crecen en condiciones estandarizadas (p. ej., 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 natural (dadas como el 100%).

5 Ejemplo 8

Preparación de vacunas a partir de cepas de vacuna adecuadas y uso para la vacunación de polluelos/pollos y hospedantes adicionales que se van a proteger, respectivamente

10 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 complementaron 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. Las cepas de *Campylobacter* depositadas con la Colección Alemana de Cultivos Tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) el 27 de noviembre de 2012 con los números de acceso DSM 26683 o DSM26684.

- 5 2. Una vacuna que comprende una o más cepas según la reivindicación 1.
3. Uso de la cepa o cepas de la reivindicación 1, para la preparación de una vacuna.
4. Una vacuna según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento o la prevención de infección por *Campylobacter*.

Figura 1

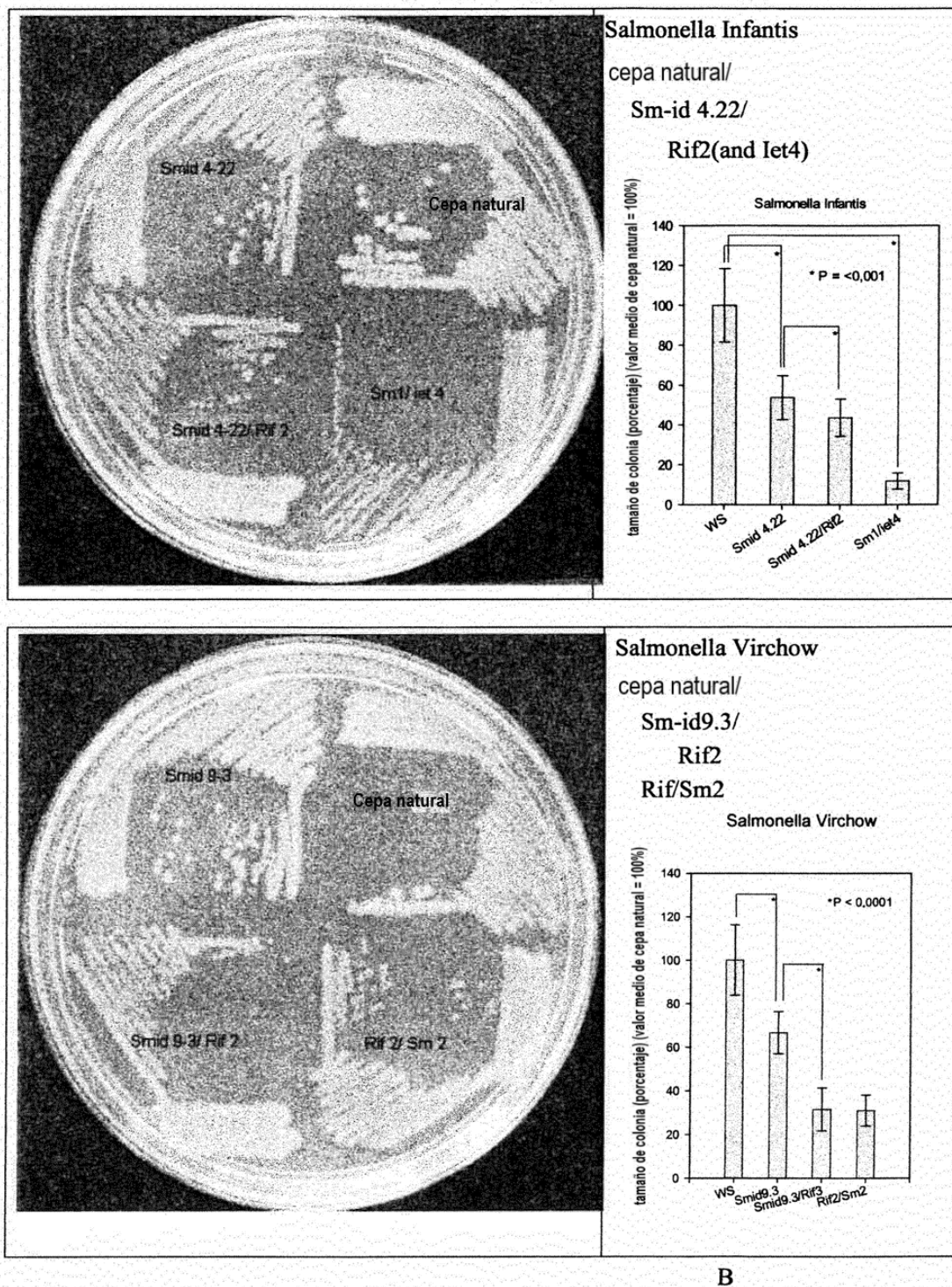


Figura 1

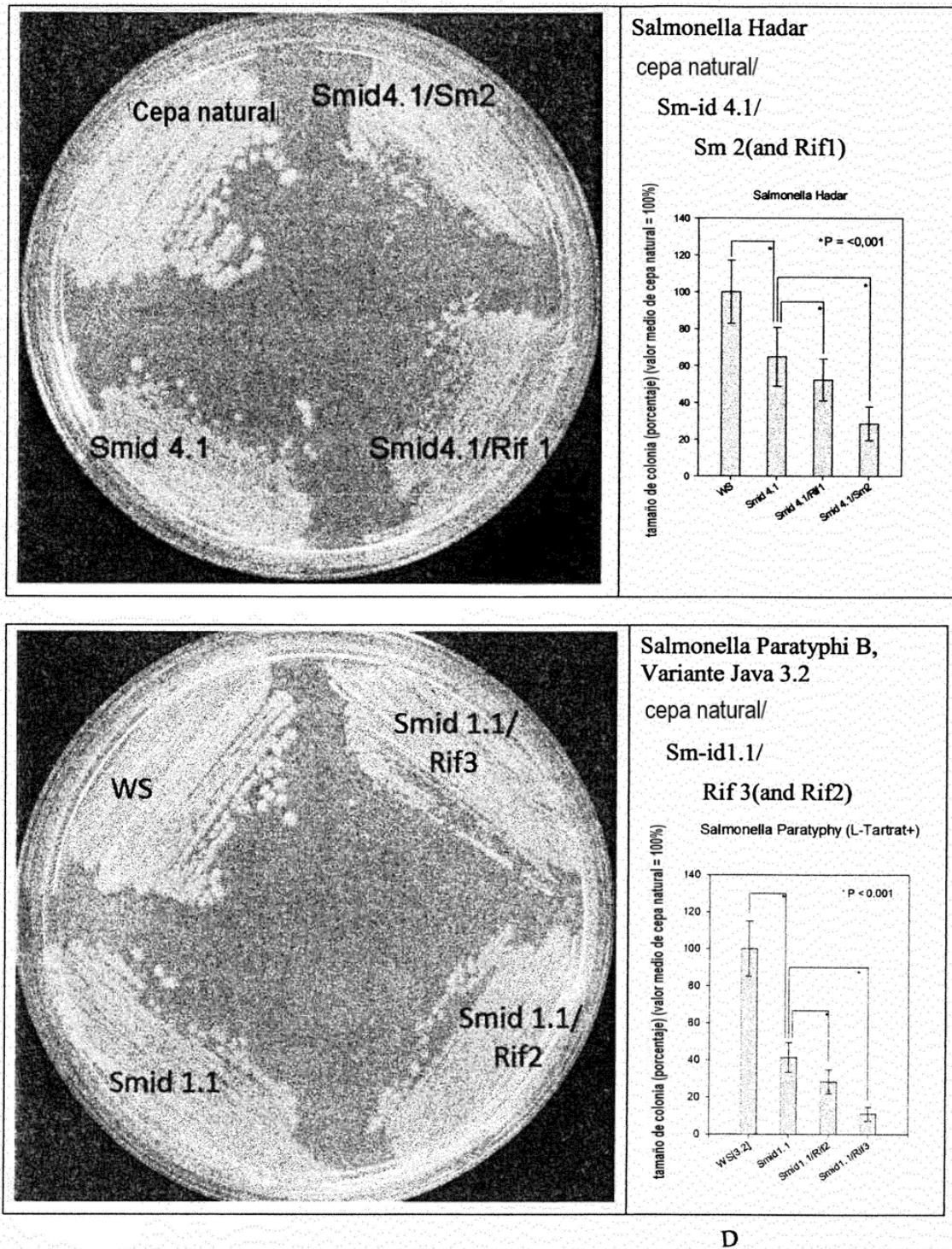
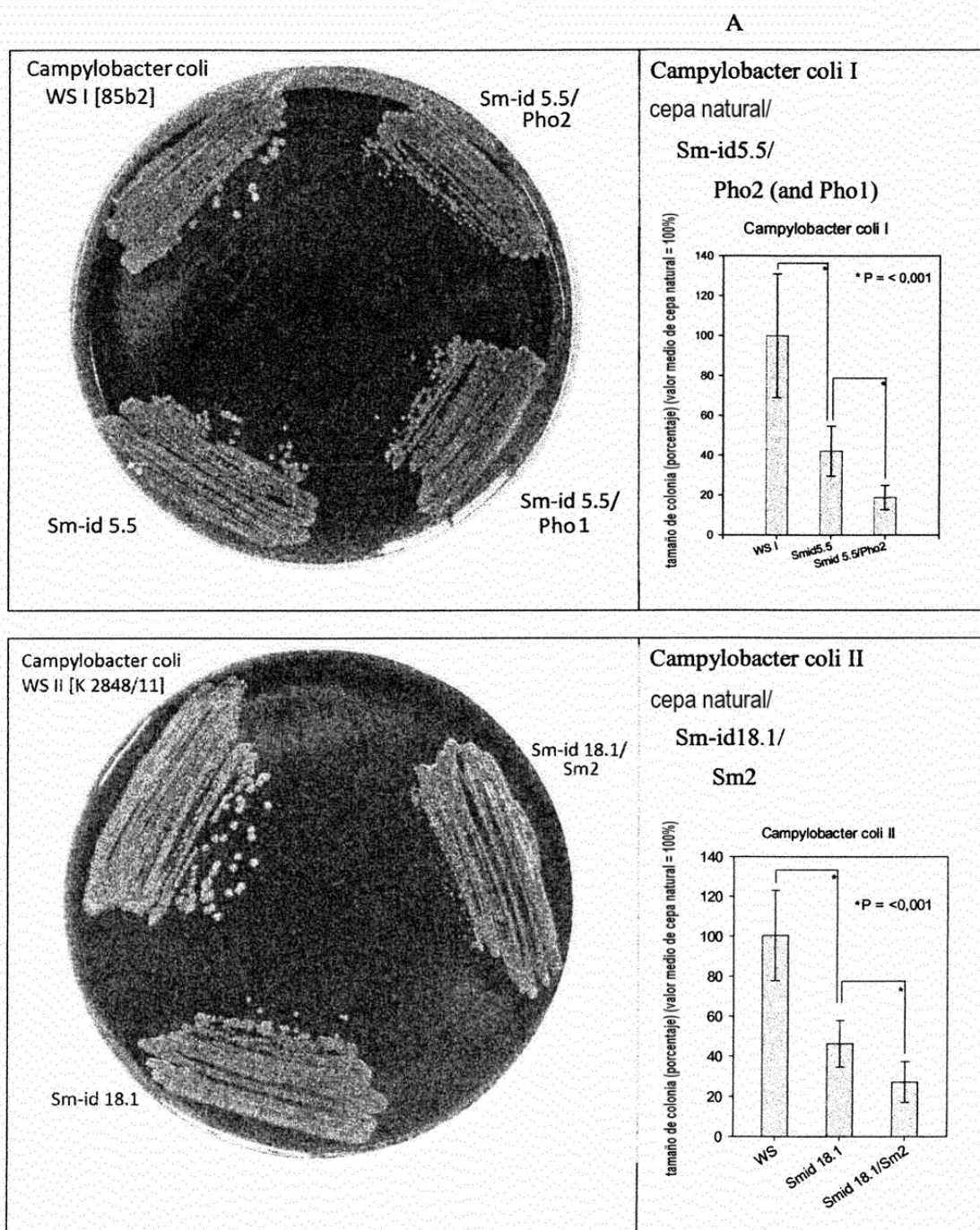
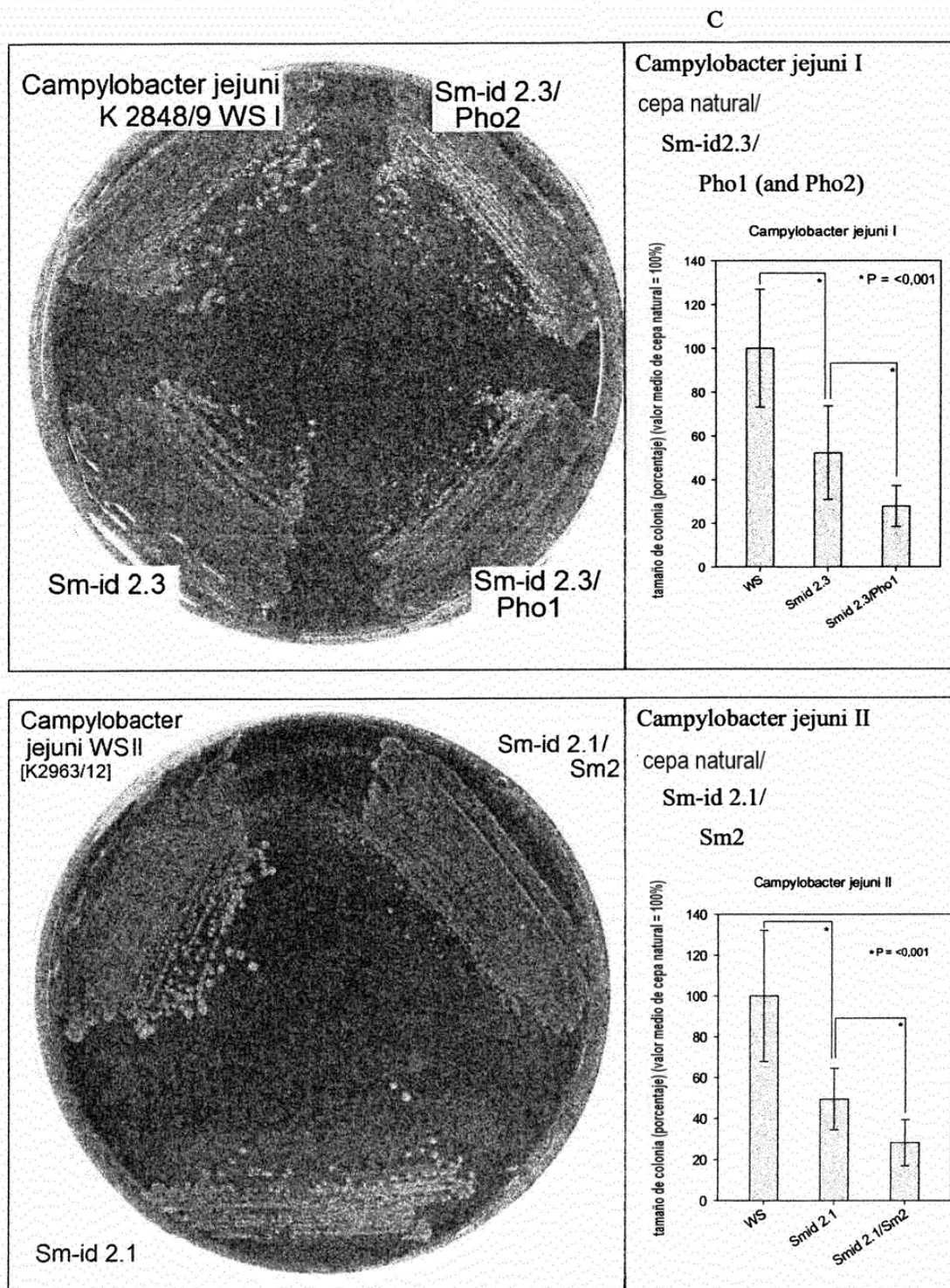


Figura 2



B

Figura 2



D

Figura 3

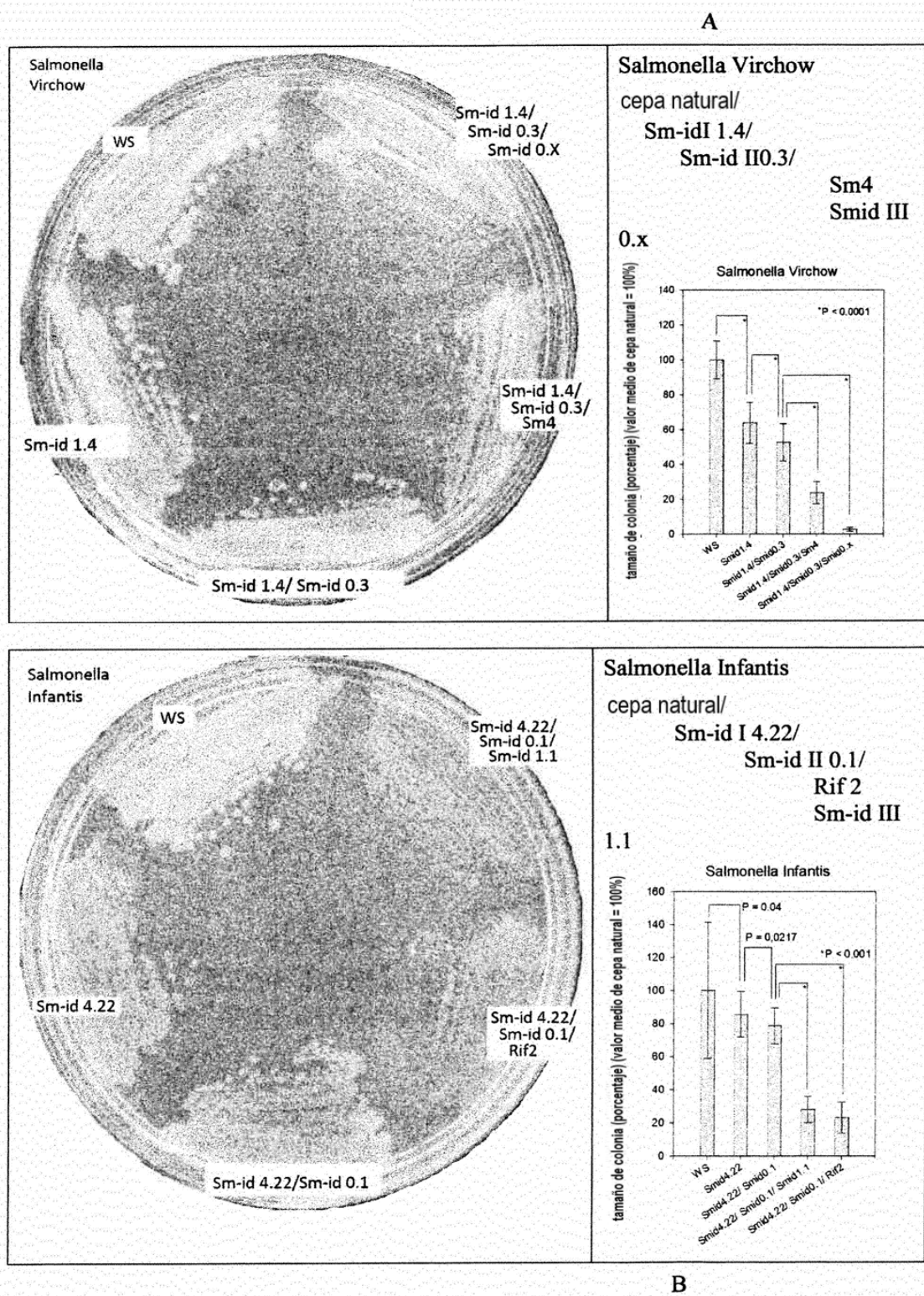
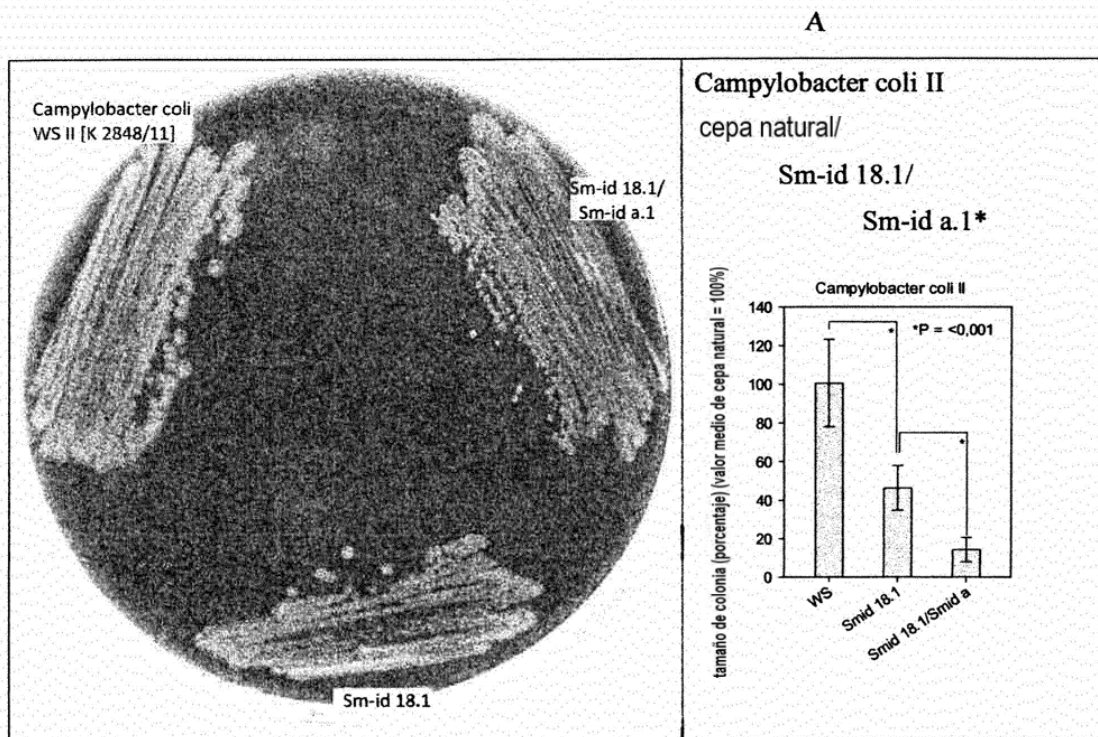


Figura 4



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

