

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de Octubre de 2006 (12.10.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/106166 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/085 (2006.01) **C12N 1/36** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000164

(22) Fecha de presentación internacional:
6 de Abril de 2006 (06.04.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200500809 7 de Abril de 2005 (07.04.2005) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**
[ES/ES]; Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **DE LA
FUENTE LOPEZ, Ricardo** [ES/ES]; Facultad de Veteri-
naria, Dpto. Sanidad Animal, Universidad Complutense
de Madrid, E-28040 Madrid (ES). **DOMINGUEZ
BERNAL, Gustavo** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria,
Dpto. Sanidad Animal, Universidad Complutense de
Madrid, E-28040 Madrid (ES). **ORDEN GUTIERREZ,
Jose Antonio**; Facultad de Veterinaria, Dpto. Sanidad
Animal, Universidad Complutense de Madrid, E-28040
Madrid. **MARTINEZ PULGARÍN, Susana** [ES/ES];
Facultad de Veterinaria, Dpto. Sanidad Animal, Univer-
sidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid (ES).

RUÍZ SANTA-QUITERIA, Jose antonio [ES/ES]; Fac-
ultad de Veterinaria, Dpto. Sanidad Animal, Universidad
Complutense de Madrid, E-28040 Madrid (ES). **CID
VAZQUEZ, Dolores** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria,
Dpto. Sanidad Animal, Universidad Complutense de
Madrid, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: ATTENUATED LIVE STRAIN OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AS A VACCINE AGAINST BOVINE MASTITIS

(54) Título: CEPA VIVA ATENUADA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COMO VACUNA EN MASTITIS DE RUMIANTES

(57) Abstract: The invention relates to the use of an attenuated live strain of *Staphylococcus aureus* as a vaccine against ruminant mastitis. More specifically, the invention relates to a novel live vaccine strain of *S. aureus* which, in addition to being attenuated, is characterized by the following more significant innovations, namely: greater proliferation rates and persistence in mammary epithelial cells. The aforementioned properties promote a prolonged immune response. Said strain has been deposited and registered in the Spanish Type Culture Collection (CECT) at the University of Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia), with reference number CECT 7061. The strategy used in the construction thereof confers complete genetic stability on the mutation. In addition, the vaccine strain lacks antibiotic resistance markers in order to fulfil the associated biological safety requirement.

(57) Resumen: Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* como vacuna en mastitis de rumiantes. La presente invención proporciona una nueva cepa vacunal viva de *S. aureus* que, además de ser atenuada, se caracteriza por presentar como novedades más significativas unas mayores tasas de proliferación y persistencia en células epiteliales mamarias. Estas propiedades favorecen una respuesta inmune prolongada en el tiempo. La cepa se encuentra depositada y registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia), con la referencia CECT 7061. La estrategia utilizada en su construcción confiere una total estabilidad genética a la mutación. También se cumple la falta de marcadores de resistencia antibiótica en la cepa vacunal como requerimiento de seguridad biológica.

WO 2006/106166 A1

TÍTULO

5 Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* como vacuna en mastitis de rumiantes.

CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención se encuadra dentro del campo de la Sanidad Animal. De forma más concreta, la invención se refiere a la producción de una cepa viva de *Staphylococcus aureus* atenuada mediante la delección de dos genes, genéticamente estable, sin marcadores de resistencia a antibióticos y con capacidad de proliferación y persistencia en células epiteliales mamarias. Constituye una nueva cepa vacunal para las mastitis de rumiantes.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA. ANTECEDENTES Y PROBLEMA A RESOLVER

20 *Staphylococcus aureus* es una bacteria muy ubicua, habitante natural de la piel y mucosas de los mamíferos y causante de distintas enfermedades en el hombre y los animales domésticos. En estos últimos, *S. aureus* está principalmente implicado en infecciones intramamarias, que ocasionan importantísimas pérdidas económicas en la producción bovina, ovina y caprina.

25 En los rumiantes *S. aureus* es el agente productor de mastitis más importante por su frecuencia y/o gravedad. En el ganado bovino se ha estimado que es responsable del 19 al 40% de las infecciones intramamarias, siendo gran parte de ellas subclínicas (Sutra and Poutrel, 1994, J Med Microbiol, 40: 79-89; Giraudo, et al., 1997, J Dairy Sci, 80: 845-53), en tanto que en los pequeños rumiantes, en los que también puede ocasionar infecciones intramamarias subclínicas, es la principal y
30 más grave causa de mamitis clínicas. Los tratamientos con antibióticos formulados para las infecciones intramamarias generalmente fracasan en la eliminación de las infecciones por *S. aureus*, además incrementan las pérdidas en la producción lechera por los correspondientes periodos de supresión que se establecen en la comercialización de la leche. Desde hace muchos años el desarrollo de vacunas
35 para controlar la mastitis producida por *S. aureus* en los rumiantes ha recibido una atención preferente y han sido muchos y muy variados los preparados vacunales ensayados: células vivas, bacterinas, toxoides, bacterinas-toxoides, paredes

celulares aisladas, etc. (Foster T. J., 1991, Vaccine, 9: 221-7. Review); (Sutra and Poutrel, 1994, J Med Microbiol, 40: 79-89); (patente US4840794). La eficacia de la mayoría de las vacunas ensayadas, sin embargo, es bastante limitada. En ensayos de campo los mejores resultados, traducidos en una reducción de la frecuencia y la gravedad de las infecciones intramamarias pero no en una protección frente a nuevas infecciones, se han obtenido con vacunas que combinan un toxoide con bacterias muertas de cepas productoras de cápsula o pseudocápsula y diferentes adyuvantes (Watson, S.A., 1998 Int J Cancer.;75(6): 873-7.; Amorena, B., et al. 1994. Vaccine. 12(3):243-9.; Nordhaug et al., 1994, J. Dairy Sci.. 77(5): 1267-75.). También se han obtenido resultados inmunizando vacas (Nelson et al. 1991. Flem Vet J. 62: 111-125) y ratones (Mamo et al., 1994. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 10(1): 47-53) con adhesinas de *S. aureus*. Últimamente se han desarrollado vacunas de DNA (patente CA2392756), sin embargo, aunque esperanzadoras, este tipo de vacunas presentan algunos problemas como son la necesidad de una gran cantidad de plásmido y su alto grado de pureza, lo que encarece y dificulta su producción (Dietrich, G. et al, 2003. Curr Opin Mol Ther. 5(1): 10-9. Review).

En la última década se ha avanzado bastante en el conocimiento tanto de la compleja patogenia de la mamitis estafilocócica como de los mecanismos de defensa inmunes, específicos y no específicos, de la glándula mamaria. Se han asociado con la patogenicidad intramamaria de *S. aureus* distintos factores: componentes superficiales de la bacteria (adhesinas, proteína A, polisacáridos capsulares), toxinas, enzimas extracelulares y coagulasa (revisados por Sutra and Poutrel. J Med Microbiol. 1994. 40: 79-89). No obstante, se considera que tres factores principales podrían estar implicados en la virulencia de la bacteria: las adhesinas, los polisacáridos capsulares y las toxinas (especialmente la α y la β).

La β -toxina o β -hemolisina es una esfingomielinasa C dependiente de Mg^{2+} que degrada la esfingomielina presente en la capa externa de fosfolípidos de la membrana celular. La lisis celular que produce se correlaciona con el contenido de esfingomielina de la membrana, por ello, los eritrocitos de rumiantes, que tienen el porcentaje de esfingomielina más alto de todos los mamíferos, son los más sensibles. La mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones intramamarias bovinas (75-100%) producen esta hemolisina (codificada por el gen *hly*), mientras que las cepas humanas raramente la expresan (Aarestrup et al. 1999. APMIS. 107(4): 425-30; Larsen et al. 2002. Vet Microbiol. 85(1): 61-7.). Se ha sugerido que la β -toxina, al igual que otras esfingomielinasas bacterianas, podría

contribuir a la patogénesis de *S. aureus* por su actividad sobre membranas celulares (incluida su participación en la ruptura del fagosoma). Sin embargo, la posible participación de la β -toxina en la patogénesis de *S. aureus*, y en concreto en la infección mamaria, no se ha demostrado concluyentemente hasta la fecha. Así, en estudios con toxina purificada, se ha descrito que la β -toxina induce cambios inflamatorios moderados en la glándula mamaria de ratón (Calvinho et al. 1993. Zentralbl Veterinarmed B. 40(8): 559-68) y de conejo (Ward et al. 1979. J Comp Pathol. 89: 169-177) y que es citotóxica para células epiteliales mamarias bovinas en cultivo (aunque en menor medida que la α toxina), (Cifrian et al. 1996. Vet Microbiol. 48: 187-198). Por otra parte, los estudios con mutantes que no expresan la β -toxina son escasos y poco concluyentes (Bramley et al. 1989. Infect Immun. 57: 2489-2494; Cifrian et al. 1996. Vet Microbiol. 48: 187-198). En un modelo murino de artritis séptica, no se han encontrado diferencias en la virulencia entre cepas parentales y mutantes nulos del gen *hly* (Nilsson et al. 1999. Infect Immun. 67: 1045-1049). Tampoco se ha descrito un papel claro de esta toxina en la virulencia en un modelo de infección corneal en conejos (O'Callaghan et al. 1997. Infect Immun. 65: 1571-1578; Dajcs et al. 2002. DNA Cell Biol. 21: 375-382).

S. aureus produce numerosas enzimas extracelulares como hialuronidasa, nucleasa, lipasa, catalasa, fosfatasa, estafiloquinasa y proteasas que también se han relacionado con la patogenicidad de la bacteria en las infecciones intramamarias (Sutra and Poutrel. J Med Microbiol. 1994. 40: 79-89), si bien, por el momento, el posible modo de acción patógena de estas enzimas se desconoce.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular en agua y oxígeno molecular. Con frecuencia se ha sugerido que las catalasas bacterianas pueden jugar un papel relevante en la protección de los microorganismos frente a la acción bactericida derivada del metabolismo oxidativo de las células fagocíticas. Así, en diversos microorganismos, como *Nocardia asteroides* (Beaman et al. 1985. Infect Immun. 47: 135-141), *Mycobacterium tuberculosis* (Mança et al. 1999. Infect Immun. 67: 74-79), *Candida albicans* (Wyson et al. 1998. Infect Immun. 66: 1953-1961; Nakagawa et al. 2003. Microbiol Immunol. 47: 395-403), *Campylobacter jejuni* (Day et al. 2000. Infect Immun. 68: 6337-6345), *Edwardsiella tarda* (Mathew et al. 2001. Microbiology. 147: 449-457), y *Helicobacter pylori* (Basu et al. 2004. Helicobacter. 9: 211-216) se ha demostrado que la catalasa es un factor de virulencia puesto que influye en su capacidad para sobrevivir en el interior de células fagocíticas. En *S. aureus* no se ha

- determinado con precisión hasta la fecha el posible papel que la catalasa pueda jugar en su patogénesis, si es que lo juega. No obstante, desde hace más de 25 años y basándose en evidencias indirectas, varios autores relacionaron la actividad catalasa de *S. aureus* con su virulencia (Mandell, G., L. 1975. J Clin Invest. 55: 561-566; Kanafani and Martín. 1985. J Clin Microbiol. 21: 607-610; Nishihara et al. 1985. Microbiol Immunol. 29: 151-155; Martin and Chaven. 1987. Appl environ Microbiol. 53: 1207-1209). Sin embargo, en estudios en los que se ha comparado la patogenicidad de un mutante catalasa negativo con su cepa parental se ha comprobado que, aunque el mutante era más sensible al peróxido de hidrógeno *in vitro*, era igual de patógeno que su cepa parental en el modelo murino de abscesos cutáneos (Horsburgh et al. 2001b. Infect Immun. 69: 3744-3754). Resultados similares han sido descritos por Messina et al. (2002. FEBS Lett. 518: 107-110) quienes analizaron la virulencia de un mutante catalasa negativo de *S. aureus* en comparación con aislados clínicos de *S. aureus* catalasa positivos midiendo la capacidad de supervivencia de las bacterias en el hígado de ratones inoculados por vía intravenosa y concluyeron que la ausencia de actividad catalasa no disminuía la virulencia de *S. aureus*. El gen que codifica la catalasa (*katA*) en *S. aureus* ha sido secuenciado y caracterizado (Sanz et al. 2000. Microbiology. 146: 465-475).
- Aunque *S. aureus* ha sido tradicionalmente considerado como un patógeno extracelular, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que es capaz de adherirse y ser internalizado por una gran variedad de tipos celulares, pudiendo sobrevivir y, en ocasiones, multiplicarse en el interior de células epiteliales (Almeida et al. 1996. J. Dairy Sci. 79: 1021-1026; Bayles et al. 1998. Infect Immun. 66: 336-342; Kahl et al. 2000. Infect Immun. 68: 5385-5392 ; Brouillette et al. 2003. Microb Pathog. 35: 159-168; Hess et al. 2003. J Surg Res. 114: 42-49), endoteliales (Hamill et al. 1986. Infect Immun. 54: 833-836; Yao et al. 1995. Infect Immun. 63: 1835-1839; Menzies and Kourteva. 1998. Infect Immun. 66: 5994-5998), fibroblastos (Fowler et al. 2000. Eur J Cell Biol. 79: 672-679), osteoblastos (Hudson et al. 1995. Microb Pathog. 19: 409-419; Ahmed et al. 2001. Infect Immun. 69: 2872-2877) e, incluso, células fagocíticas (Gresham et al. 2000. J Immunol. 164: 3713-3722; Hébert et al. 2000. FEMS Microbiol Lett. 193: 57-62; Brouillette et al. 2003. Microb Pathog. 35: 159-168). La internalización de *S. aureus* por las células del hospedador puede contribuir a la persistencia de la infección al proporcionar una resistencia frente al sistema inmune y frente a los tratamientos antibióticos (Ferens and Bohach. 2000. J Lab Clin Med. 135: 225-230).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención consiste en la construcción de una cepa viva atenuada, de *S. aureus*, para ser utilizada como vacuna, incapaz de producir actividad catalasa y β -toxina, genéticamente estable y sin marcadores de resistencia antibiótica. Se considera
5 cepa viva atenuada aquella estirpe que mantiene su capacidad de invadir y multiplicarse en el interior de su hospedador, pero sin desarrollar el cuadro patogénico.

10 Aunque la información publicada no permitía aventurar el uso de los genes *katA* y *hly* como dianas para construir una cepa viva atenuada de *S. aureus* con aplicación vacunal, la construcción del doble mutante por delección de estos dos genes ha supuesto la obtención de una nueva cepa vacunal. Se ha elegido una estrategia basada en la delección en fase de la totalidad de los genes que codifican la catalasa,
15 *katA* y la β -toxina, *hly*, mediante doble recombinación homóloga.

El método utilizado para realizar esta invención cumple los requerimientos indispensables de seguridad biológica en cuanto a vacunas de nueva generación. Por un lado, asegura la estabilidad de la mutación puesto que la reversión al fenotipo
20 silvestre está totalmente impedida debido a la ausencia de dianas requeridas para la recombinación homóloga o ilegítima a partir de poblaciones naturales de bacterias. Por otro lado, la cepa construida carece de marcadores de resistencia a antibióticos.

A pesar de los resultados conocidos hasta el momento, sorprendentemente, la
25 novedosa combinación de las dos delecciones de los genes *katA* y *hly* proporciona a esta cepa una dosis letal cincuenta (DL_{50}) más de 5 veces superior a la de la cepa parental (véase figura 3), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. La avirulencia de esta cepa evidencia su empleo como cepa vacunal.

30 La doble mutación tiene un claro efecto incrementando la proliferación y la persistencia del mutante en la línea celular MAC-T de células epiteliales mamarias y la persistencia en la línea celular de macrófagos J774A.1, observándose un efecto sinérgico y potenciador entre ambas mutaciones (véanse figuras 4 y 5). La proliferación del mutante es más lenta que la de la cepa parental, alcanzándose más
35 tarde el máximo de bacterias intracelulares viables. La mayor permisividad para la replicación del mutante en células epiteliales mamarias es una consecuencia de su menor toxicidad para este tipo celular.

Los mayores niveles de proliferación y persistencia de la cepa atenuada en células epiteliales mamarias unidos a una mayor persistencia en células del sistema inmune (macrófagos) con respecto a su cepa parental, junto con la mayor DL₅₀ en el modelo murino de infección, hacen del doble mutante una vacuna viva atenuada frente a las infecciones producidas por *S. aureus* y más concretamente frente a las mastitis producidas por este microorganismo.

Por lo tanto, un aspecto de esta invención incluye un kit de vacunación para mamíferos contra las enfermedades infecciosas producidas por *S. aureus*, que comprende los elementos y adyuvantes necesarios para contener y vehicular la cepa vacunal.

Otra aplicación de esta invención consiste en la utilización de la cepa atenuada como candidato ideal para ser utilizado como vector vacunal de expresión o transporte de antígenos heterólogos favorecido por su mayor persistencia en células del sistema inmune junto a su menor toxicidad y su mayor persistencia en el interior de células epiteliales mamarias con respecto a las cepas silvestres de *S. aureus*.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompañan una serie de figuras. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Muestra el esquema de la construcción del plásmido termosensible pERh1b. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio para la amplificación de fragmentos de ADN fueron diseñados a partir de secuencias del genoma de *S. aureus* COL (TIGR Microbial Database). Los números 1, 2, 3 y 4 se corresponden con la nomenclatura de los oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Figura 2. Esquema de la construcción del plásmido termosensible pERkat. Los números 5, 6, 7 y 8 se corresponden con la nomenclatura de los oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

Figura 3. Ensayos de DL_{50} en el modelo murino. Se representan las medias aritméticas del número de ufc necesario para producir la muerte en el 50% de los animales de estudio más/menos la desviación estándar (DS). El valor de p obtenido en el análisis de varianza fue $p=0,0032$. Los valores representados son: (1) para *S. aureus* 2386 ($2,80E+9 \pm DS\ 2,33E+9$); (2) para su doble mutante *katA/hlb*, *S. aureus* CECT 7061, ($1,41E+10 \pm DS\ 4,68E+9$); y (3) para dicho mutante complementado con el plásmido que contiene ambos genes $5,77E+8 \pm DS\ 3,11E+8$.

Figura 4. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su doble mutante *katA/hlb* (*S. aureus* CECT 7061) y dicho mutante complementado con el plásmido que contiene ambos genes, en la línea celular macrofágica J774A.1 durante 24 horas. Con un rombo se representa la cepa 2386, con un cuadrado el doble mutante y mediante un triángulo el doble mutante complementado. En el eje de las ordenadas se representa el porcentaje (%) de bacterias intracelulares viables. Este dato se corresponde con la media del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ($\pm DS$), expresado en porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En el eje de abscisas se señala el tiempo (T) en horas (h).

Figura 5. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su doble mutante *katA/hlb* (*S. aureus* CECT 7061) y dicho mutante complementado con el plásmido que contiene ambos genes, en la línea celular epitelial mamaria MAC-T. En los ejes de abscisa y ordenada se representan las mismas variables que en la figura 4. Asimismo, las diferentes cepas están señaladas por los mismos símbolos que en la figura anterior.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Las cepas de *S. aureus* y *E. coli* empleadas se cultivaron rutinariamente a $37^{\circ}C$ con agitación en medio BHI (Infusión Cerebro-Corazón) y LB (Luria-Bertani), respectivamente. Las cepas transformadas con plásmidos termosensibles se incubaron a $32^{\circ}C$ para evitar la pérdida del plásmido. Los medios se complementaron con eritromicina ($5\mu g/ml$) cuando fue necesario. Para obtener medio sólido se añadió agar ($15g/l$).

Se utilizó *S. aureus* 2386 como cepa silvestre para construir las cepas mutantes

Por otro lado, en los ensayos realizados con *S. aureus* 2386 y sus mutantes se utilizó un análisis de varianza. Cuando *p* fue menor de 0,05 (diferencias estadísticamente significativas) se realizó el test de Tukey-Kramer para un nivel de
5 confianza del 95%.

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido
10 exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1: Construcción de un mutante por delección del gen *hly*, un mutante por delección del gen *kata* y un doble mutante por delección de ambos genes *kata/hly* de *S. aureus*. Utilizando las parejas de oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 1 y 2
15 por un lado y SEQ ID NO: 3 y 4 por otro se amplificaron por PCR dos fragmentos situados delante y detrás, respectivamente, del gen *hly* (véase figura 1). Los fragmentos obtenidos se unieron mediante PCR recombinante siguiendo la técnica descrita por Vallejo et al. (1994) y se clonaron en pE194t, un plásmido derivado de *S. aureus* que confiere resistencia a la eritromicina, obteniendo el plásmido pERhly.
20 Este plásmido recombinante se introdujo en *S. aureus* 2386 mediante transformación de protoplastos, empleando el método descrito por Götz et al. (1981. J Bacteriol. 145: 74-81). Las bacterias transformadas, verificadas por PCR, se incubaron a 32°C en presencia de eritromicina hasta la fase estacionaria de crecimiento. A continuación se elevó la temperatura a 43°C durante 6 horas para inducir la
25 recombinación homóloga entre el plásmido y el cromosoma bacteriano. Posteriormente se realizaron subcultivos a 37°C sin eritromicina para favorecer la pérdida del plásmido. Los mutantes por delección de *hly* se seleccionaron en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero por carecer de halo de β -hemólisis y ser CAMP negativos en presencia de *Rhodococcus equi* (Brzin, et al. 1990. Zentralbl
30 Bakteriologie. 273(2): 179-83). Por último se confirmó la delección del gen *hly* mediante técnicas de PCR.

El mutante por delección de *kata* se construyó de la misma forma descrita anteriormente. Para ello, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos descritos en
35 SEQ ID NO: 5 y 6 por un lado y SEQ ID NO: 7 y 8 por otro para amplificar los fragmentos situados delante y detrás del gen *kata*, respectivamente (véase figura 2). Con el plásmido resultante, pERkat, se transformó la cepa silvestre *S. aureus* 2386

obteniéndose mutantes por delección de *katA*. Los mutantes por delección de *katA* se seleccionaron en medio sólido por la ausencia de actividad catalasa al ser puestos en contacto con peróxido de hidrógeno al 3%. Asimismo se comprobó la delección del gen *katA* por PCR.

5

El doble mutante por delección de *hlyB/katA* se construyó transformando con el plásmido pERkat el mutante por delección de *hlyB* ya construido y siguiendo la misma estrategia descrita para el mutante por delección de *katA*. Este doble mutante se encuentra depositado y registrado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 10 46100 Burjassot (Valencia), con la referencia CECT 7061.

Por último, todos los mutantes se complementaron utilizando el plásmido pHpS9, en el que se clonaron los genes *hlyB* (pHhlyB), *katA* (pHkat) y ambos (pHkathlyB). En todos 15 los casos, la complementación reprodujo en los mutantes el fenotipo de las cepa silvestre de la que derivaban, por lo que el fenotipo observado se asociaba a la delección específica del gen.

Ejemplo 2: Ensayos de supervivencia intracelular en las líneas celulares J774A.1 y 20 MAC-T. Para estudiar si la pérdida de actividad catalasa, la falta de producción de b-toxina o la ausencia de las dos actividades afectan a la supervivencia y a la proliferación intracelular de *S. aureus*, se realizaron estudios de supervivencia intracelular en dos líneas celulares diferentes: macrófagos J774A.1 y células epiteliales mamarias MAC-T. Los macrófagos constituyen una de las piezas 25 esenciales de la inmunidad innata, y participan activamente en la presentación de antígenos para inducir una inmunidad adquirida satisfactoria. Las células epiteliales mamarias se utilizaron como modelo de estudio *in vitro* del comportamiento de *S. aureus* en la glándula mamaria de los rumiantes.

30 Las líneas celulares J774A.1 y MAC-T se mantuvieron con *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) al que se añadió un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de Pen/Strep/Fungizones Mix (Biowhittaker) y las incubaciones se hicieron a 37°C con un 5% de CO₂. El medio de crecimiento de la línea MAC-T contenía además 5 µg de insulina/ml y 1 µg de hidrocortisona/ml. *S. aureus* 2386, sus 35 mutantes por delección de *katA*, *hlyB* y *katA/hlyB*, así como los tres mutantes complementados, se cultivaron durante 18-20 horas en medio BHI a 37°C con agitación. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron dos veces con tampón fosfato

salino (PBS) pH 7, se resuspendieron en PBS + 20% Glicerol y se conservaron a -80°C en alícuotas de 1 ml. Se determinó la concentración bacteriana de las alícuotas tras su congelación sembrando diluciones seriadas en placas de BHI. Para preparar las suspensiones bacterianas se descongelaron las alícuotas necesarias, se lavaron dos veces con PBS pH 7 y se resuspendieron a la concentración deseada (3-5 x 10⁵ unidades formadoras de colonias/ml (ufc/ml)) en medio de invasión (medio de cultivo celular sin antibióticos). Los ensayos de supervivencia intracelular se realizaron en placas de 24 pocillos. Se inocularon los pocillos con 3 x 10⁴ células y se incubaron durante 48 horas en las condiciones descritas anteriormente.

10 Aproximadamente 16 horas antes del ensayo se lavaron las células con PBS estéril y se reemplazó el medio de cultivo por medio de invasión. Antes del experimento se contaron las células presentes en uno de los pocillos para comprobar que hubiera 5-6 x 10⁴ células/pocillo. Para el experimento se añadió nuevo medio de invasión a las células y se inocularon los pocillos con las suspensiones bacterianas a una

15 multiplicidad de infección de 10:1 (J774A.1) ó 50:1 (MAC-T). A continuación, las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂. Tras esta incubación, se retiró el medio, se lavaron las células dos veces con PBS estéril y se añadió medio de invasión con 100 µg de gentamicina/ml a cada pocillo para destruir las bacterias extracelulares. Después de

20 la incubación con gentamicina durante 1 (bacterias internalizadas), 4, 8 y 24 horas, se realizaron dos lavados con PBS estéril y se lisaron las células infectadas añadiendo Tritón x-100 al 0,2%. Se hicieron diluciones seriadas de los lisados y se sembraron en placas de BHI para hacer el recuento de ufc. Las bacterias intracelulares supervivientes a las 4, 8 y 24 horas se expresaron como porcentaje de

25 la bacterias intracelulares presentes en la primera hora.

El comportamiento tanto de la cepa parental de *S. aureus*, como de los mutantes por delección de *katA* y de *hly* fue análogo hallándose una disminución progresiva de las bacterias intracelulares viables. En el análisis de varianza no se encontraron

30 diferencias significativas tras 4, 8 y 24 horas postinfección.

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 y su doble mutante *katA/hly* (*S. aureus* CECT 7061), se constató que, contrariamente al comportamiento mostrado por los mutantes

35 simples, el doble mutante presentaba mayor proliferación a las 4 horas postinfección en MAC-T y una mayor persistencia intracelular que la cepa parental: en J774A.1 a las 4, 8 y 24 horas postinfección, y en MAC-T a las 8 y 24 horas. Además, se

encontró que estas diferencias eran estadísticamente significativas en el análisis de varianza en los tres tiempos considerados. La prueba de Tukey-Kramer reveló la existencia de diferencias significativas entre la cepa parental y el doble mutante, lo que implica que las diferencias observadas se deben a la delección de estos dos genes.

Ejemplo 3: Cálculo de las dosis letales 50 (DL₅₀) en ratón. Con el fin de evaluar el efecto en la virulencia de los tres mutantes, se estimó la dosis letal cincuenta (DL₅₀) tras inocular ratones por vía intraperitoneal, tal y como se detalla a continuación.

10

S. aureus 2386 y sus mutantes por delección de *katA*, *hly* y *katA/hly* se cultivaron durante 18-20 horas en 100 ml de medio BHI a 37°C con agitación. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS estéril y se resuspendieron en 5 ml de PBS estéril para obtener la dosis de inoculación más alta. Las demás dosis se obtuvieron mediante diluciones seriadas de ésta. Las dosis utilizadas oscilaron entre 1x10⁶ y 1x10¹¹ ufc/ml. Las ufc se confirmaron mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de BHI. Para el ensayo se utilizaron ratones Swiss hembras de 4 semanas de edad (21-23 g), que se dispusieron en 5 grupos de 5 animales cada uno y a los que se suministró agua y comida *ad libitum* bajo condiciones normales de luz y temperatura. Los animales se inocularon intraperitonealmente con 0,4 ml de las suspensiones bacterianas y se registraron las muertes producidas cada 24 horas durante 7-10 días. Las DL₅₀ se calcularon por el método de Reed y Muench (1938. Am J Hyg. 27: 493-497).

La DL₅₀ del mutante por delección de *katA* fue inferior a la de la cepa silvestre *S. aureus* 2386, si bien en el análisis de varianza estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, la catalasa por sí sola no es un factor que intervenga significativamente en la virulencia.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las DL₅₀ del mutante por delección del gen *hly* y la cepa parental. Lo que significa que la β-toxina, por sí misma, tampoco tiene un papel significativo en la patogenicidad de *S. aureus*.

Sin embargo, la atenuación del doble mutante *katA/hly* sí fue significativa dado que se observó un incremento de 5 veces en la DL₅₀ del mutante con respecto a la cepa parental (véase figura 3).

REIVINDICACIONES

- 1.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* caracterizada porque carece de actividad catalasa y de beta toxina.
- 5 2.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según la reivindicación 1, caracterizada por la delección de los genes *katA* y *hly* que codifican las enzimas responsables de la actividad catalasa y la beta toxina, respectivamente.
- 10 3.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según la reivindicación 2, caracterizada porque la delección de los genes *katA* y *hly* es una delección en fase.
- 4.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según la reivindicación 3, caracterizada porque la delección en fase de *katA* y *hly* se realiza mediante una
- 15 estrategia que evite la reversión de la cepa mutada al fenotipo silvestre.
- 5.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según la reivindicación 4, caracterizada porque la estrategia elegida para evitar la reversión de la cepa mutada al fenotipo silvestre es la doble recombinación homóloga.
- 20 6.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la delección de *katA* y *hly* no deja en la bacteria marcadores de selección por resistencia a antibióticos.
- 25 7.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presenta mayor capacidad de proliferación y persistencia en células epiteliales de la glándula mamaria que la cepa parental.
- 8.- Cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según reivindicaciones
- 30 anteriores, donde la cepa es *Staphylococcus aureus* CECT 7061.
- 9.- Uso de una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según se describe en las reivindicaciones anteriores, como vacuna frente a enfermedades infecciosas producidas por *Staphylococcus aureus*.

- 10.- Uso de una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según se describe en las reivindicaciones 1 a 8, como vacuna frente a enfermedades infecciosas producidas por *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de rumiantes.
- 5 11.- Un kit de vacunación para mamíferos contra las enfermedades infecciosas producidas por *Staphylococcus aureus* que comprenda un contenedor que incluya una cepa viva atenuada como la descrita en las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 12.- Uso de una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, según reivindicaciones 1 a 8, como vehículo vacunal de antígenos heterólogos.

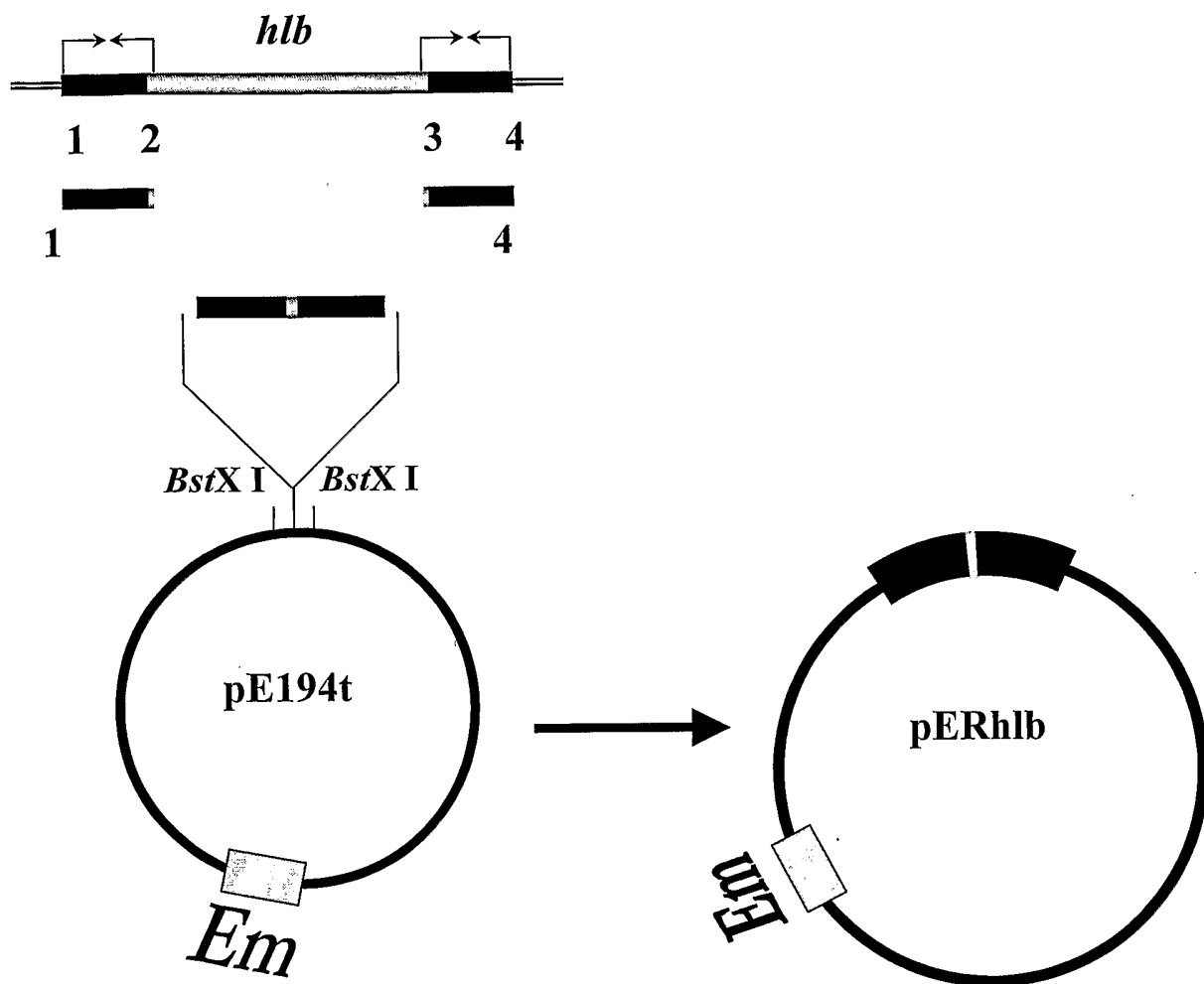


FIG.1

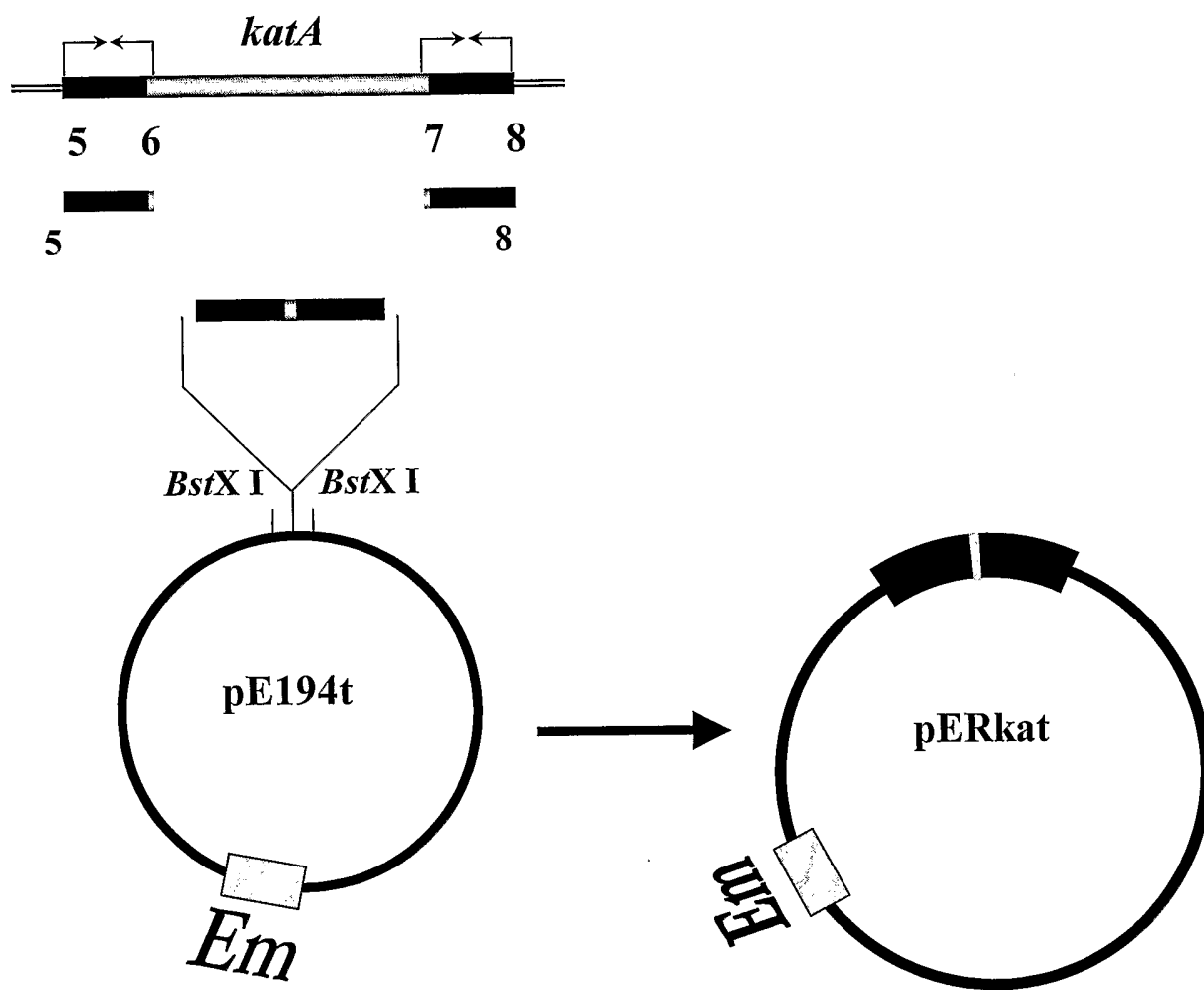


Fig.2

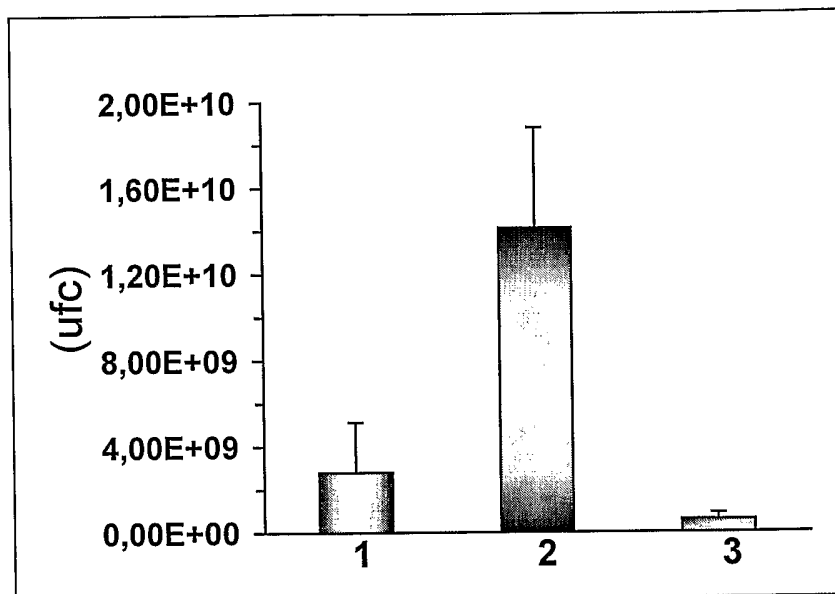


FIG.3

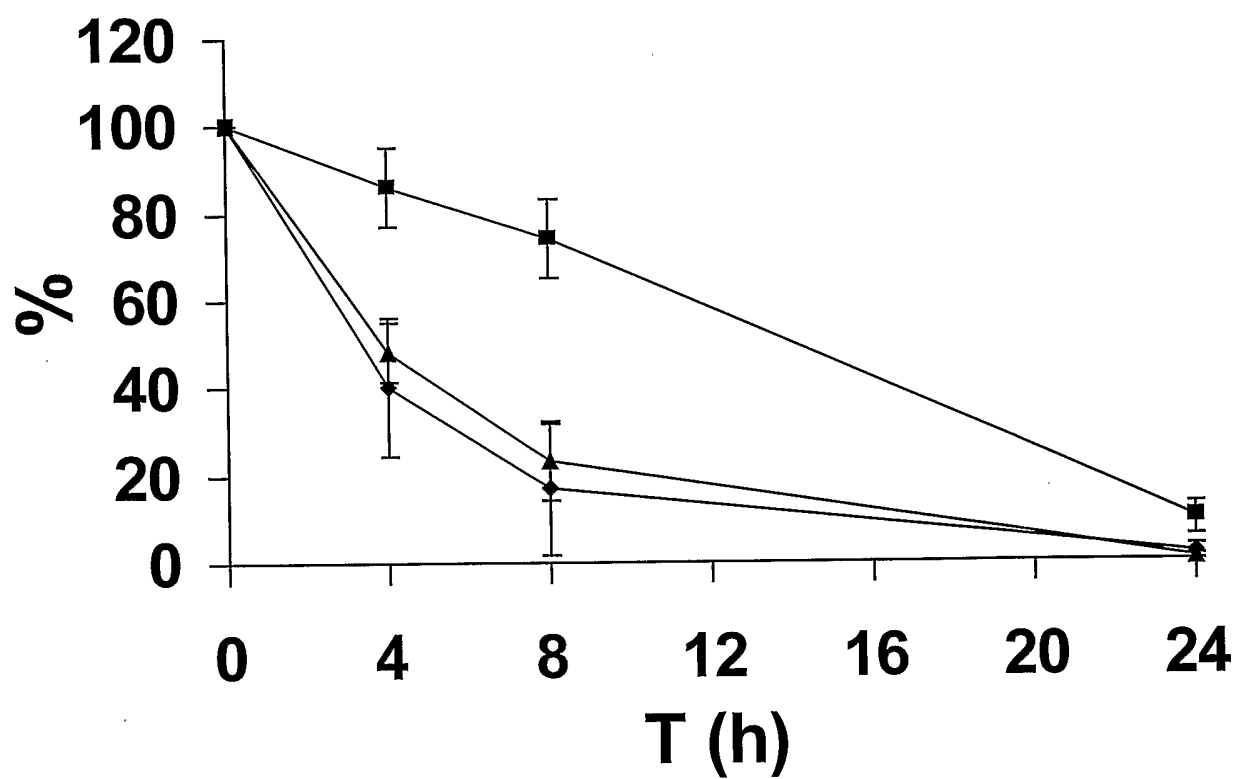


FIG.4

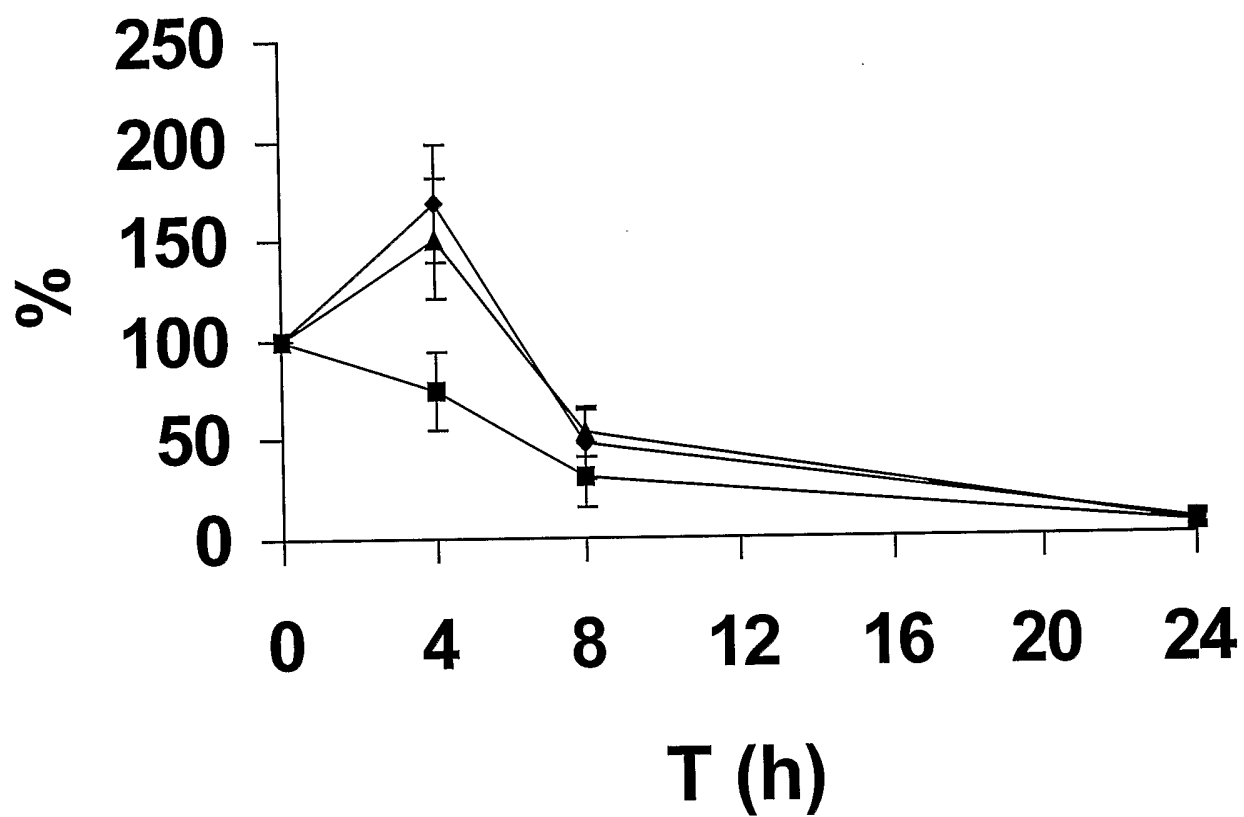


FIG.5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Cepa viva atenuada de Staphylococcus aureus como
vacuna en mastitis de rumiantes

<160> 8

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> primer

<400> 1

aacttttcttt gttccatttt t

21

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> primer

<400> 2

agcactattt caccatcatt atcactcctt

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> primer

<400> 3

aatgatggtg aaatagtgct gaactaacta

30

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> primer

<400> 4

ttattcagag acgattagtt a

21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> primer

<400> 5
atgaccacaa tgcccaatac a 21

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> primer

<400> 6
atcaaattta tgacatagtc atccctccac 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> primer

<400> 7
gactatgtca taaatttgat atgtagtttc 30

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> primer

<400> 8
ttccgctttg aaattttaaa t 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/000164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANZ et al., "Catalase deficiency in Staphylococcus aureus subsp. anaerobius is associated with natural loss-of-function mutations within the strustural gene". Microbiology. Feb. 2000. Vol. 146 (2). Pages 465-475	1- 12
A	BRAMLEY et al., "Roles of alpha toxin and beta toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland". Infection and Immunity. 1989. Vol. 57 (8), Pages 2489-2494	1-12
A	COLEMAN D. et al., "Insertional inactivation of the staphylococcus aureus beta toxin by bacteriophage phi-13 occurs by site and orientation-specific integration of the phi-13 genome". Molecular Microbiology. 1991. Vol. 5 (4), Pages 933-940	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 August 2006 (08.08.06)Date of mailing of the international search report
(10-08-2006)Name and mailing address of the ISA/
S.P.T.OPaseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304Authorized officer
A. Collados Martín Posadillo

Telephone No. + 34 91 349

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000164

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to cla No.
A	ODIERNO L. et al., "Pathogenicity in mice of Staphylococcus aureus mutants deficient in exoprotein synthesys". Veterinary Microbiology. Aout.1994. Vol. 41(3), Pages249-258	1-12

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/085 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2006/000164

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SANZ et al., "Catalase deficiency in Staphylococcus aureus subsp. anaerobius is associated with natural loss-of-function mutations within the strustural gene". Microbiology. Feb. 2000. Vol. 146 (2). Páginas 465-475	1- 12
A	BRAMLEY et al., "Roles of alpha toxin and beta toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland". Infection and Immunity. 1989. Vol. 57 (8), Páginas 2489-2494	1-12
A	COLEMAN D. et al., "Insertional inactivation of the staphylococcus aureus beta toxin by bacteriophage phi-13 occurs by site and orientation-specific integration of the phi-13 genome". Molecular Microbiology. 1991. Vol. 5 (4), Páginas 933-940	1-12

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
08 agosto 2006 (08-08-2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
10 AGOSTO 2006 (10-08-2006)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado
A. Collados Martín Posadillo
Nº de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/000164

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ODIERNO L. et al., "Pathogenicity in mice of Staphylococcus aureus mutants deficient in exoprotein synthesis". Veterinary Microbiology. Agosto.1994. Vol. 41(3), Páginas249-258	1-12

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/085 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)