



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 662**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00201985 .9**
86 Fecha de presentación : **06.06.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1074266**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2001**

54 Título: **Bacteria atenuada viva para usar en una vacuna.**

30 Prioridad: **09.06.1999 US 328859**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Intervet International B.V.**
Wim de Korverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL
The Board of Governors for Higher Education,
State of Rhode Island and Providence Plantations

72 Inventor/es: **Cohen, Paul S.;**
Laux, David C. y
Nuijten, Petrus Johannes Maria

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 276 662 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

Bacteria atenuada viva para usar en una vacuna.

5 La presente invención se refiere a bacterias atenuadas vivas para usar en un medicamento, a vacunas basadas en tales bacterias útiles para la prevención de patogénesis microbianas, a bacterias atenuadas vivas que portan un gen heterólogo y a procedimientos para la preparación de tales vacunas y bacterias.

10 Los medios por los cuales un animal de sangre caliente supera la patogénesis microbiana son un proceso complejo. La inmunidad a patogénesis microbianas es un medio por el cual un animal de sangre caliente evita la patogénesis, o padece un estado patogénico menos intenso. La inmunidad incompleta a un patógeno dado produce morbilidad y mortalidad en una población expuesta a un patógeno. Generalmente, se está de acuerdo en que las vacunas basadas en microorganismos vivos pero atenuados (vacunas atenuadas vivas) inducen un tipo de respuesta inmune altamente eficaz. Tales vacunas tienen la ventaja de que, una vez que el hospedador animal se ha vacunado, la entrada de los patógenos microbianos en el hospedador induce un recuerdo acelerado de inmunidad temprana, mediada por células o humoral que es capaz de controlar el crecimiento adicional del organismo antes de que la infección pueda asumir proporciones clínicamente significativas. Se reconoce generalmente que las vacunas basadas en un patógeno muerto (vacuna muerta) son incapaces de lograr este tipo de respuesta. Sin embargo, las vacunas que contienen un patógeno vivo presentan, dependiendo del nivel de atenuación, el peligro de que el hospedador vacunado pueda contraer tras la vacunación la enfermedad contra la cual se está buscando protección. Por lo tanto, sería deseable tener una vacuna que posea los atributos inmunizantes de un microorganismo vivo pero que no sea capaz de causar efectos secundarios no deseados tras la vacunación.

25 La estrategia general para atenuar bacterias es la eliminación de uno o más factores virulentos. En la mayoría de los casos, sin embargo, los factores de virulencia juegan también un papel en la inducción de la inmunidad. En esos casos, la delección de los factores de virulencia deteriora inevitablemente las capacidades inmunogénicas de la bacteria. Esto es por supuesto una situación no buscada. Una vacuna viva debe mantener preferiblemente el complemento antigénico de la cepa de tipo salvaje.

30 Además, la vacuna viva debe ser suficientemente avirulenta para evitar efectos patológicos inaceptables, pero por otra parte debe provocar un nivel suficiente de inmunidad en el hospedador.

Finalmente, la vacuna viva atenuada no debe tener preferiblemente probabilidad de revertir en una cepa de tipo salvaje virulenta.

35 Se ha descubierto ahora de forma sorprendente que puede deleccionarse un gen que codifica una proteína conocida por jugar un papel en el metabolismo central de carbohidratos en muchos géneros bacterianos, provocando comportamiento atenuado *in vivo* sin deteriorar la viabilidad de tales bacterias *in vivo*. Las bacterias de las cuales se deleciona este gen muestran inesperadamente un carácter atenuado. Además, ya que la proteína codificada no juega un papel en la inducción de la inmunidad, la carga antigénica de las bacterias de las cuales se deleciona este gen, es idéntica a las de tipo salvaje. Por lo tanto, tales bacterias podrían usarse inesperadamente de forma ventajosa en el campo de la preparación de medicamentos, más específicamente para la preparación de vacunas vivas atenuadas.

40 El gen que de acuerdo con la presente invención puede deleccionarse y conduce a un comportamiento atenuado *in vivo* de los mutantes de delección es un gen conocido anteriormente como gen *fruR*, llamado sin embargo actualmente gen *cra*. Se sabía que los mutantes que carecían de este gen podían crecer *in vitro*, pero sólo si las deficiencias debidas a la carencia de la actividad de Cra se compensan con el medio de crecimiento. Esto significa que los nutrientes sobre los cuales el mutante deficiente en Cra puede crecer deben estar presentes en el medio de crecimiento.

50 Por lo general, las bacterias patogénicas son auto-mantenidas en el sentido de que adaptan su metabolismo a los nutrientes que están disponibles. El gen *cra* juega tal papel adaptativo en muchas rutas metabólicas principales (véase a continuación). Los mutantes de los cuales se ha deleccionado el gen *cra* pueden crecer sin embargo perfectamente bien en glucosa y muchos otros azúcares como fuente de carbono. En el animal hospedador, tales azúcares están disponibles y por lo tanto no se esperaría que el gen *cra* fuese funcional en condiciones *in vivo*. Y de ese modo, no se esperaría que mutantes negativos en Cra mostraran características atenuadas en el hospedador. Esto explica porque, aunque tales mutantes se conocían bien en la técnica, nunca se ha sugerido que fuesen candidatos potenciales para vacunas atenuadas vivas.

60 Una realización de la invención se refiere a bacterias atenuadas vivas que ya no son capaces de expresar una proteína Cra funcional como resultado de una mutación en el gen *cra*, para usar en una vacuna.

El producto del gen, (anteriormente conocido como FruR; proteína represora de fructosa), conocida ahora también como Cra (represor de catabolitos/proteína activadora), es una proteína reguladora en muchas rutas principales del metabolismo de carbohidratos.

65 El producto del gen *cra*, Cra, regula el metabolismo central del carbono. Más específicamente, Cra regula de forma positiva la transcripción de genes que codifican enzimas biosintéticas y oxidativas (por ejemplo, enzimas clave en el ciclo de TCA, el shunt glioxalato, la ruta gluconeogénica y el transporte de electrones) uniéndose cadena arriba de los

ES 2 276 662 T3

promotores de estos genes y regula negativamente la transcripción de genes que codifican enzimas glicolíticas (por ejemplo, enzimas clave en las rutas Embden-Meyerhof y Entner-Doudoroff).

Debido a su posición clave en el metabolismo de carbohidratos, el gen *cra* y su producto génico Cra están generalizados en el reino bacteriano. La proteína Cra es una proteína altamente conservada. Puede encontrarse por ejemplo en especies de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, tales como los serotipos *Typhimurium*, *Enteritidis* y *Dublin*, en especies de *Actinobacillus* tales como *A. pleuropneumoniae*, en especies de *Haemophilus* tales como *H. paragallinarum*, en *Aeromonas salmonicidae*, en especies de *Pasteurella*, tales como *P. piscida* y *P. multocida*, en especies de *Streptococcus* tales como *S. equi* y *S. suis* y en especies de *Yersinia* tales como *Y. pestis*.

El gen por sí mismo y su secuencia de nucleótidos completa en *Salmonella* y *Escherichia* la han elucidado en 1991 Jahreis, K. *et al.* (Mol. Gen. Genet. 226: 332-336 (1991)). Jahreis mostró que la proteína Cra en *Salmonella enterica*, serotipo *Typhimurium* y *Escherichia coli* diferían sólo en 4 posiciones, de las cuales dos eran intercambios simplemente conservadores. Esto está por supuesto en línea con lo que podía esperarse para una proteína que juega un papel en tantas rutas universales en el metabolismo de carbohidratos bacteriano, especialmente donde *E. coli* y *Salmonella* no divergieron tanto durante la evolución. El mecanismo de unión de la proteína Cra lo han elucidado al menos parcialmente Ramseier, T.M. *et al.* (J. Mol. Biol. 234:28-44 (1993)). El papel y función de la proteína Cra (represor de catabolitos/proteína activadora) se han descrito de forma regular en la bibliografía, por ejemplo en un minianálisis reciente de Saier, M.H. y Ramseier, T.M. (Journ. Bacteriol. 178: 3411-3417 (1996)).

Tal mutación puede ser una inserción, una delección, una sustitución o una combinación de las mismas, con tal que la mutación conduzca al fallo en la expresión de una proteína Cra funcional. Una proteína Cra funcional se entiende que es una proteína que tiene las características reguladoras de la proteína de tipo salvaje. Por lo tanto, una proteína Cra que sea defectuosa en al menos una de estas funciones se considera que es una proteína Cra no funcional.

Las bacterias atenuadas vivas para usar de acuerdo con la invención pueden obtenerse de diversas formas. Una forma posible de obtener tales bacterias es por medio de procedimientos tales como el tratamiento de bacterias tipo salvaje que tienen el gen *cra* con agentes mutagénicos tales como análogos de bases, tratamiento con luz ultravioleta o tratamiento por temperatura.

Las cepas que no producen una proteína Cra funcional pueden recogerse fácilmente. Crecen en medio mínimo exclusivamente en presencia de glucosa y otros azúcares como fuentes de carbono (lo que las diferencia de los mutantes *cya* y *crp*) pero no son capaces de crecer con sustratos gluconeogénicos como única fuente de carbono. (Chin *et al.*, J. Bacteriol. 169: 897-899 (1987)). Por lo tanto, pueden seleccionarse fácilmente *in vitro*.

La naturaleza de la mutación causada por técnicas de mutación clásicas es desconocida. Puede ser una mutación puntual que, aunque es improbable que suceda, puede revertir con el tiempo al tipo salvaje. Para evitar este riesgo pequeño, la mutagénesis de transposones sería una buena alternativa.

La mutagénesis por mutagénesis de transposones es también una técnica de mutagénesis bien conocida en la técnica. Ésta es una mutación lograda en un sitio localizado del cromosoma. Las inserciones de transposones no pueden dirigirse a un gen específico. Sin embargo, es muy fácil recoger mutantes *cra* ya que no crecen *in vitro* sin compensación de nutrientes para la carencia de actividad de Cra. Por lo tanto, pueden seleccionarse fácilmente a partir de un conjunto de bacterias mutadas con transposones de manera aleatoria. Utley *et al.* (FEMS Microbiology Letters 166:3: 125-134 (1998)) describen una cepa SR-11 Fad⁻ de *Salmonella Typhimurium* avirulenta e inmunogénica obtenida por mutagénesis de transposones y que es incapaz de utilizar acetato o isocitrato como única fuente de carbono. Sin embargo, el gen defectuoso no está identificado. Una posibilidad para introducir una mutación en un sitio predeterminado, de forma deliberada en lugar de aleatoria, la ofrece la tecnología del ADN recombinante. Tal mutación puede ser una inserción, una delección, un reemplazamiento de un nucleótido por otro o una combinación de los mismos, con la única condición de que el gen mutado no codifique más la Cra funcional. Tal mutación puede hacerse por ejemplo por delección de varios ácidos nucleicos. Incluso delecciones muy pequeñas tales como trozos de 10 ácidos nucleicos pueden volver ya a Cra no funcional. Incluso la delección de un único ácido nucleico puede conducir ya a una Cra no funcional, ya que como resultado de tal mutación, el otro ácido nucleico no está ya en la fase de lectura correcta. Cada delección o inserción de varios ácidos nucleicos indivisibles por tres causan tal cambio de fase. Más preferiblemente, se elimina un trozo más grande, por ejemplo 100 ácidos nucleicos. Incluso más preferiblemente, se deleciona el gen *cra* completo.

Se puede ver fácilmente, que especialmente las mutaciones que introducen un codón de parada en la fase de lectura abierta, o las mutaciones que causan un cambio de fase en la fase de lectura abierta, son muy adecuados para obtener una cepa que no codifique más una Cra funcional.

Todas las técnicas para la construcción de mutantes negativos en Cra son técnicas convencionales bien conocidas. Se refieren a la clonación del gen de Cra, a la modificación de la secuencia del gen por mutagénesis dirigida al sitio, a digestión con enzimas de restricción seguido por re-ligación o estrategias de PCR y a reemplazamiento posterior del gen *cra* de tipo salvaje con el gen mutante (intercambio alélico o reemplazamiento alélico). Las técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como clonación del gen *cra* en un plasmido, digestión del gen con una enzima de restricción, seguido por tratamiento con endonucleasas, re-ligación y recombinación homóloga en la cepa hospedado-

ES 2 276 662 T3

ra, son todas conocidas en la técnica y se describen entre otros en el documento de Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. *et al.* Molecular Cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6). Las mutaciones dirigidas al sitio pueden hacerse por ejemplo por medio de mutagenesis dirigida al sitio usando el kit Transformer® vendido por Clontech. Las técnicas de PCR se describen de forma extensa en el documento (Dieffenbach & Drekler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-3 e ISBN 0-87969-447-5).

El gen *cra* comprende no sólo la secuencia codificante que codifica la proteína Cra, si no también las secuencias reguladoras tales como el promotor. El gen comprende también sitios esenciales para la traducción correcta del ARNm de Cra, tales como el sitio de unión del ribosoma.

Por lo tanto, no sólo las mutaciones de las regiones codificantes sino también las mutaciones de las secuencias esenciales para la transcripción y traducción correctas se consideran que pertenecen al alcance de la invención.

En una realización preferida, la invención se refiere a bacterias atenuadas vivas del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Streptococcus* y *Yersinia* para usar en una vacuna.

En una forma más preferida de la invención, la bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo constituido por *S. enterica* serotipo *Typhimurium*, *Enteriditis*, *Choleraesuis*, *Dublin*, *Typhi*, *Gallinarum*, *Abortusovi*, *Abortus-equi*, *Pullorum*, *E. coli* o *Y. pestis*. Estos géneros bacterianos comprenden un gran número de especies que son patogénicas tanto para seres humanos como una diversidad de animales diferentes.

En una forma incluso más preferida de la misma, la bacteria atenuada viva de acuerdo con la invención es *S. enterica*, *E. coli* o *Y. pestis*.

En una forma incluso más preferida más, esta realización se refiere a bacterias atenuadas vivas de acuerdo con la invención en las que la mutación en el gen de Cra se ha hecho por tecnología de ADN recombinante.

Las mutaciones bien definidas y hechas de manera deliberada que implican la delección de fragmentos del gen *cra* o incluso el gen completo o la inserción de fragmentos de ADN heterólogo o ambos, tienen la ventaja, en comparación con las mutaciones inducidas de manera clásica, de que no revertirán a la situación de tipo salvaje.

De ese modo, en una forma incluso más preferida, esta realización de la invención se refiere a bacterias atenuadas vivas en las que el gen *cra* comprende una inserción y/o delección.

Dada la gran cantidad de vacunas que se dan actualmente tanto a mascotas como animales de granja, está claro que sería deseable la administración combinada de varias vacunas, aunque sea sólo por razones de disminuir los costes de la vacunación. Es por lo tanto muy atractivo usar bacterias vivas atenuadas como un vehículo recombinante para genes heterólogos, que codifican antígenos seleccionados entre otros microorganismos o virus patogénicos. La administración de tal vehículo recombinante tiene la ventaja de que se induce inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Las bacterias vivas atenuadas para usar en una vacuna, de acuerdo con la presente invención, proporcionan vehículos muy adecuados para genes heterólogos, ya que el gen que codifica la proteína Cra puede usarse como un sitio de inserción para tales genes heterólogos. El uso de los genes *cra* como un sitio de inserción tiene la ventaja de que al mismo tiempo el gen *cra* se inactiva y el gen heterólogo introducido de nuevo puede expresarse (en concierto con los genes bacterianos homólogos). La construcción de tales vehículos recombinantes puede hacerse de forma rutinaria, usando técnicas de biología molecular convencionales tales como intercambio alélico. Por lo tanto, otra realización de la invención se refiere a bacterias recombinantes atenuadas vivas, preferiblemente del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Streptococcus* y *Yersinia* que no producen una proteína Cra funcional, y en las que se inserta un gen heterólogo. Tal gen heterólogo puede ser, como se ha mencionado anteriormente, por ejemplo una gen que codifica un antígeno seleccionado entre otros microorganismo o virus patogénicos. Tales genes pueden derivar por ejemplo de herpesvirus patogénicos (por ejemplo los genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus), retrovirus (por ejemplo la proteína de la envuelta gp160), adenovirus y similares. También puede obtenerse un gen heterólogo de bacterias patogénicas. Como ejemplo, los genes que codifican toxinas bacterianas tales como toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, toxinas de *Clostridium*, proteínas de la membrana externa y similares son genes heterólogos bacterianos muy adecuados. Otra posibilidad es insertar un gen que codifica una proteína implicada en la activación del sistema inmune, tal como una interleucina o un interferón, u otro gen implicado en la regulación inmune.

La inserción del gen heterólogo en el gen *cra* es ventajosa, ya que no hay necesidad de encontrar un sitio de inserción para el gen heterólogo, y al mismo tiempo el gen *cra* se elimina.

De ese modo, en una forma preferida de esta realización, el gen heterólogo se inserta en el gen *cra*. El gen heterólogo puede insertarse en algún lugar en el gen *cra* o puede insertarse en el sitio del gen *cra* mientras que este gen se haya delecionado parcial o completamente.

Debido a su inesperado carácter atenuado pero inmunogénico *in vivo*, las bacterias para usar en una vacuna, de acuerdo con la invención, son muy adecuadas como una base para vacunas atenuadas vivas. De ese modo, otra realización más de la invención se refiere a vacunas atenuadas vivas para la protección de animales y seres humanos contra la infección con una bacteria de la cual la forma de tipo salvaje comprende un gen *cra*.

ES 2 276 662 T3

Tales vacunas comprenden una cantidad inmunogénicamente eficaz de una bacteria atenuada viva para usar en una vacuna, de acuerdo con la invención o una bacteria vehículo recombinante viva de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Preferiblemente, la vacuna comprende una bacteria atenuada viva de acuerdo con la invención, seleccionada entre el grupo de *Escherichia*, *Salmonella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Streptococcus* y *Yersinia*.

10 Inmunogénicamente eficaz significa que la cantidad de bacterias atenuadas vivas administradas en la vacunación es suficiente para inducir en el hospedador una respuesta inmune eficaz contra formas virulentas de la bacteria.

15 Además de una cantidad inmunológicamente eficaz de la bacteria atenuada viva descrita anteriormente, una vacuna de acuerdo con la presente invención contiene también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo puede ser tan simple como agua, pero puede comprender por ejemplo también el fluido de cultivo en el que se cultivó la bacteria. Otro vehículo adecuado es por ejemplo una solución de concentración salina fisiológica.

20 La dosificación útil a administrar variará dependiendo de la edad, peso y animal vacunado, el modo de administración y el tipo de patógeno contra el cual se busca vacunación.

25 La vacuna puede comprender cualquier dosis de bacterias, suficiente para provocar una respuesta inmune. Las dosis que varían entre 10^3 y 10^{10} bacterias son por ejemplo dosis muy adecuadas.

Opcionalmente, pueden añadirse a la vacuna uno o más compuestos que tienen actividad adyuvante. Los adyuvantes son estimuladores no específicos del sistema inmune. Potencial la respuesta inmune del hospedador a la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes conocidos en la técnica son adyuvantes completos e incompletos Freund's, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos, muramildipéptidos, ISCOM (complejos estimuladores inmunes, consúltese por ejemplo la patente europea EP 109942), saponinas, aceite mineral, aceite vegetal y Carbopol.

30 Los adyuvantes, especialmente adecuados para aplicación a la mucosa, son por ejemplo la toxina lábil al calor de *E. coli* (LT) o la toxina de *Cholera* (CT).

Otros adyuvantes adecuados son por ejemplo el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio, emulsiones de aceite (por ejemplo, de Bayol F^(R) o Marcol 52^(R)), saponinas o vitamina E solubilizada.

35 Por lo tanto, en una forma preferida, las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un adyuvante.

Otros ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizantes tales como SPGA, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo tampón fosfato).

40 Especialmente cuando se añaden tales estabilizantes a la vacuna, la vacuna es muy adecuada para secado por congelación. Por lo tanto, en una forma más preferida, la vacuna está en una forma seca por congelación.

45 Para administrar a animales o seres humanos, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede darse entre otras de forma intranasal, intradérmica, subcutánea, oral, por aerosol o intramuscular. Para aplicación a aves de corral, es muy adecuada la administración por gotas oculares o al tejido del ala.

Otra realización más se refiere al uso de una bacteria para usar en una vacuna o una bacteria recombinante de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para la protección de animales y seres humanos contra la infección con una bacteria de tipo salvaje o los efectos patogénicos de la infección.

Otra realización más de la invención se refiere a procedimientos para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención. Tales procedimientos comprende la mezcla de una bacteria atenuada viva de acuerdo con la invención o una bacteria vehículo recombinante viva de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

60 *Identificación, clonación y secuenciación del gen mutado en S. typhimurium SR-11 Fad⁻*

El gen mutado por transposones del mutante *S. typhimurium* SR-11 se ha identificado, clonado y secuenciado.

65 La secuencia de nucleótidos del gen mutante que vuelve a la SR-11 Fad⁻ descrita avirulenta se expone en la Secuencia ID N°: 1.

La Secuencia ID N°: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la molécula de proteínas que codifica la secuencia de nucleótidos de la Secuencia ID N°: 1.

ES 2 276 662 T3

Se determinó ahora que *S. typhimurium* SR-11 Fad⁻ es mutante en el gen *cra*. El punto de inserción del transposón se ha descubierto que se sitúa dentro del intervalo de aproximadamente 45 pares de bases desde el extremo 3' del codón de parada traduccional de *cra*.

5 Un fragmento *Pst*I de 4,5 kb que contenía la inserción Tn10 d Cam de 1,5 kb flanqueada por un fragmento de ADN de *S. typhimurium* SR-11 de 1,9 kb en un extremo y un fragmento de ADN de *S. typhimurium* SR-11 de 1,1 kb en el otro extremo se insertó en el sitio *Pst*I de pBluescript II SK (+). El plásmido resultante, pJHA7, se puso dentro de *E. coli* HB101 por electroporación. Las regiones que flanqueaban la inserción Tn10 d Cam se secuenciaron usando el método de ciclación térmica dideoxi de Sanger. Se descubrió que las secuencias de nucleótidos que flanqueaban
10 inmediatamente cada lado de la inserción Tn10 d Cam eran el 100% homólogas al gen *cra* (*fruR*) de *S. typhimurium* y se descubrió que el punto de inserción estaba a 45 nucleótidos del extremo 3' del codón de parada traduccional de *cra*. Esto sugirió que *S. typhimurium* SR-11 Fad⁻ era un mutante *cra*.

Al contrario que SR-11, SR-11 Fad⁻ no pudo crecer en placas de agar mínimo M9 que contenían citrato, oleato,
15 piruvato, acetato, succinato y fumarato.

El *cra* de tipo salvaje de *S. typhimurium* SR-11 (*fruR*) se amplificó por PCR y se insertó en el sitio *Pst*I en el gen de resistencia a ampicilina de pBR322. El plásmido resultante, pJHA8, retomó la capacidad de *S. typhimurium* SR-11 Fad⁻ de crecer así como sus parentales de tipo salvaje que utilizan cada uno de los compuestos mencionados
20 anteriormente como fuentes de carbono. Estos experimentos establecen que *S. typhimurium* SR-11⁻ es un mutante *cra* (*fruR*).

SR-11 Fad⁻ se construyó con la transducción del bacteriófago P22 HT105 *int* de resistencia a cloranfenicol a partir de un mutante de minitransposón de LT-2 en SR11. Aunque improbable, era por lo tanto posible que la avirulencia de SR-Fad⁻ fuese debida a la pérdida de algunos ADN de SR-11 tras la transducción, por ejemplo, pérdida de una isla de patogenicidad, en lugar de ser debido a un gen *cra* defectuoso. Por lo tanto, como se describe inmediatamente a continuación, se construyó por intercambio alélico una cepa idéntica a SR-11, en lo sucesivo SR-11 Cra^{mod} AX-2, excepto en que contiene la misma mutación en el gen *cra* que está presente en SR-Fad⁻.

30 El fragmento de ADN de *Pst*I SR-11 Fad⁻ de 4,3 kb que contenía el gen *cra* mutante de SR-11 Fad⁻ (gen de resistencia a cloranfenicol en *cra*) se insertó dentro del sitio *Pst*I de pLD55, un vector suicida que contiene tanto un gen de resistencia a ampicilina como un gen de resistencia a tetraciclina (*tetAR*). Éste se llamó pMJN10. Se puso pMJN10 dentro de *E. coli* S17- λ pir por electroporación. Posteriormente al apareamiento de *E. coli* S17- λ pir (pMJN10) con SR-11, se analizó la capacidad de varios transconjugantes SR-11 de ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol DE utilizar oleato, citrato, acetato, piruvato, succinato y fumarato como únicas fuentes de carbono. Todos fueron capaces de hacerlo como se esperaría si pMJN10 se hubiese integrado en el cromosoma por una fusión única usando secuencias homólogas, es decir, como si tanto el alelo *cra* de tipo salvaje como el mutante estuvieran presentes en el cromosoma. Se analizó en cinco de estos "integrantes" la presencia de pMJN10 como un plásmido libre y ninguno lo tenía, sugiriendo además que el plásmido se había insertado en el cromosoma SR-11. Cada uno de los cinco integrantes se sembró en estrías sobre una placa de agar Luria que contenía cloranfenicol. En este caso, las células en las que ocurre una segunda fusión sobreviven sólo si el alelo *cra* izquierdo en el cromosoma es el alelo mutante que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol. Las muestras de los integrantes sembrados en estrías se sembraron después en estrías sobre agar de selección sensibles a tetraciclina (agar TSS). El agar TSS contiene ácido fumárico y células sensibles a tetraciclina, es decir, las células que han perdido el plásmido suicida aparecen como colonias muy grandes en relación con las células resistentes a tetraciclina que todavía tienen el plásmido en el cromosoma. Se analizó en un total de 34 colonias grandes la resistencia a cloranfenicol, sensibilidad a ampicilina y tetraciclina y la capacidad de utilizar oleato, acetato, piruvato, citrato, succinato y fumarato como únicas fuentes de carbono. De los 34 aislados, seis eran resistentes a cloranfenicol, sensibles a ampicilina y tetraciclina, y eran incapaces de utilizar los compuestos mencionados anteriormente como únicas fuentes de carbono. Uno de los aislados, denominado SR-11 Cra^{mod} AX-2 (significando AX intercambio alélico), se transformó con pBR322 o pJHA8 (conteniendo pJHA8 el gen *cra* de tipo salvaje) y se analizó en ambas cepas la capacidad de utilizar glucosa, glicerol, oleato, acetato, piruvato, citrato, succinato y fumarato como únicas fuentes de carbono. Al contrario que SR-11 Cra^{mod} AX-2 (pBR322), SR-11 Cra^{mod} AX-2 (pJHA8) fue capaz de utilizar los compuestos mencionados anteriormente como únicas fuentes de carbono, sugiriendo que SR-11 Cra^{mod} AX-2 es un mutante *cra*. Ambas cepas, como se esperaba, fueron capaces de usar glucosa y glicerol como
55 únicas fuentes de carbono.

Para determinar si un gen *cra*(*fruR*) funcional vuelve virulenta a *S. typhimurium* SR-11, se realizaron los siguientes experimentos.

60 Se infectaron cuatro ratones BALB/c de forma peroral con SR-11 (2,1 x 10⁸ cfu/ratón) y 5 ratones con SR-11 Cra^{mod} AX-2 (2,8 x 10⁸ cfu/ratón). A los 8 días post infección, todos los 4 ratones infectados con SR-11 habían muerto, mientras que todos los 5 ratones infectados con SR-11 Cra^{mod} AX-2 se mantuvieron sanos y activos (Tabla 1). Ya que SR-11 Cra^{mod} AX-2 es idéntico a SR-11 con la excepción de que la misma mutación en *cra* que está presente en SR-11 Cra^{mod} elimina la posibilidad de que suceda algo anómalo durante la construcción de SR-11 Cra^{mod} por transducción de la cepa LT-2, no relacionada con *cra*, que podía considerarse por su pérdida de virulencia.
65

Era también posible que la inserción del módulo de resistencia a cloranfenicol en el gen *cra* produjera un efecto polar sobre genes cadena abajo y por lo tanto la atenuación de SR-11 Fad⁻ no se debería a un gen *cra* defectuoso.

ES 2 276 662 T3

Por lo tanto, se complementó SR-11 Cra^{mod} con pJHA8, que contenía sólo el gen *cra* de tipo salvaje, con el intento de determinar si SR-11 Cra^{mod} (pJHA8) recuperaba la virulencia. Como control, se complementó SR-11 Cra^{mod} con pBR322, el vector usado en la construcción de pJHA8. Se infectaron de forma peroral cuatro ratones BALB/c con 3,1 x 10⁸ cfu/ratón de SR-11 Cra^{mod} (pBR322) y 4 ratones con 4,3 x 10⁸ cfu/ratón de SR-11 Fad⁻ (pJHA8). A los 9 días post infección 3 de los 4 ratones infectados con SR-11 Cra^{mod} (pJHA8) habían muerto mientras que los 4 ratones infectados con SR-11 Cra^{mod} (pBR322) se mantuvieron sanos y activos (Tabla 1). Los hígados y bazo de todos los ratones que murieron tenían más de 10⁸ cfu por órgano de SR-11 Fad⁻ (pJHA8). Este resultado descarta la posibilidad de que la inactivación del gen *cra* con un módulo de cloranfenicol cause un efecto cadena abajo que produzca avirulencia y prueba que se requiere un gen *cra* funcional para la virulencia de SR-11.

TABLA 1

Detección del gen cra en diversos géneros de bacterias

<u>Cepa de <i>S. typhimurium</i></u>	<u>Número de infectados</u>	<u>Número de supervivientes</u>
SR-11	4	0
SR-11 Cra ^{mod} AX-2	5	5
SR-11 Cra ^{mod} (pBR322)	4	4
SR-11 Cra ^{mod} (pJHA8)	4	1

^a Los ratones se infectaron de forma peroral con entre 2,0 x 10⁸ cfu/ratón y 5,0 x 10⁸ cfu/ratón, dependiendo de la cepa. Todos los ratones que murieron lo hicieron a los 9 días post infección. Todos los ratones que sobrevivieron se recuperaron completamente.

Se analizó en cuatro cepas de *S. typhimurium*, y una cepa de cada uno de *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. dublin* y *S. choleraesuis* el gen *cra* por hibridación de Southern. En todos los casos se encontró el gen *cra* en el mismo fragmento de ADN *Pst*I de 4,3 kb que SR-11. Se analizaron también seis cepas patogénicas diferentes de *E. coli* y todas tenían el gen *cra*, aunque el gen estaba presente en tres fragmentos *Pst*I de tamaño diferente entre las seis cepas. Además, se analizaron una cepa de *Aeromonas salmonicidae* y cepas de los géneros bacterianos *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Streptococcus* y *Yersinia* y todas mostraron la presencia de un gen *cra*.

La presencia del gen *cra* en las bacterias mencionadas anteriormente se demostró como sigue: Se digirió el ADN genómico de estas cepas con 20 unidades de *Pst*I (Promega) a 37°C durante toda la noche. Se usó electroforesis en gel (agarosa al 0,7%, TAE 1x) para separar los diversos tamaños de los fragmentos de ADN *Pst*I. El ADN separado se transfirió en condiciones alcalinas a nylon cargado positivamente durante 3 horas usando el sistema S&S Turboblotter (Schleicher y Schuell). La membrana se coció durante 30 minutos a 90°C para unir el ADN a la membrana. La membrana se prehibridó (en un horno de hibridación de botellas rotatorias) a 62°C durante 2-4 horas en tampón de hibridación que contenía SSC 5x, N-laurilsarcosina al 0,1%, SDS al 0,02%, reactivo bloqueante al 1,5% (del DIG Detection Starter Kit II con CSPD, Boehringer Mannheim). Se desnaturalizó la sonda marcada y se añadió a tampón de hibridación fresco y la transferencia se incubó a 62°C durante 16-20 horas. Las transferencias se lavaron dos veces con SSC 2x, SDS al 0,1% a 62-65°C durante 5 min. Las transferencias se lavaron después con SDS al 0,1%, SSC 0,5x a 60°C durante 15 min. Las transferencias se desarrollaron como se había recomendado con la siguiente modificación: se usó reactivo bloqueante al 2% en la solución bloqueante (se usa normalmente al 1%), las transferencias se bloquearon durante una hora (30 min es el tiempo de bloqueo normal) y se usó una concentración más baja del anticuerpo (el 70% de la concentración usada normalmente) para la detección de la sonda marcada con DIG. Estos cambios los recomendó el fabricante para una señal de fondo más baja.

Ejemplo 2

*Vacunación de pollos con la cepa SR-11 Cra^{mod} de *Salmonella typhimurium* negativa en Cra*

Eficacia de la vacunación. Las condiciones de crecimiento para las cepas de *Salmonella* eran comparables a las descritas en el Ejemplo 2. En un experimento, se vacunaron dos grupos de 20 pollos (de 3 días de edad) de forma oral con 6 x 10⁷ CFU de *Salmonella t.* SR-11 Cra^{mod} en PBS. Un grupo se reforzó después de 11 días con 8,3 x 10⁷ CFU de la misma cepa. Después de 18 días, ambos grupos se estimularon de forma subcutánea, intramuscular y oral con 1,9 x 10⁹ bacterias de una cepa de tipo salvaje virulenta. La Tabla 2 da los resultados.

ES 2 276 662 T3

TABLA 2

	SR-11 Cra ^{mod}	SR-11 Cra ^{mod}	Control
Dosis de Vac. día 1	6,0 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁷	--
Dosis de vac. día 11	--	8,3 x 10 ⁷	--
Dosis de estim. día 18	1,9 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁹
Mortalidad (%)	15	10	100

Experimento de seguridad y eficacia de la vacunación combinadas. En un segundo experimento, se determinaron tanto la eficacia de la vacuna como la seguridad de la vacuna. La seguridad de la vacuna se determinó sobre la base del retraso en el crecimiento. Se vacunó un grupo de 15 pollos de forma oral con 2,7 x 10⁸ CFU de *Salmonella t.* SR-11 Cra^{mod} en medio de cultivo. Se vacunó otro grupo de 15 pollos de forma oral con 1,3 x 10⁸ CFU de la misma cepa en PBS. Después de 18 días, ambos grupos se estimularon de forma subcutánea, intramuscular y oral con 6,5 x 10⁸ bacterias de una cepa de tipo salvaje virulenta.

La Tabla 3 da los resultados.

TABLA 3

	SR-11 Cra ^{mod} (i)	SR-11 Cra ^{mod} (ii)	Control
Dosis de vac. día 1	2,7 x 10 ⁸	2,7 x 10 ⁸	--
Peso día 7	178	ND	185
Peso día 18	733	722	749
Dosis de estim. día 18	6,5 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁸
Mortalidad (%)	0	13	100

i = medio de cultivo, ii = PBS

Resultados: ambos experimentos muestran que se obtiene un nivel muy alto de protección con una cepa de *Salmonella typhimurium* negativa en Cra, a pesar de la alta dosis de estimulación dada. Además, no se ve retraso en el crecimiento significativo como resultado de la vacunación. Por lo tanto, puede concluirse que las cepas de *Salmonella typhimurium* negativas en Cra son muy adecuadas para vacunas atenuadas vivas para la protección de aves de corral contra la infección con una bacteria de tipo salvaje.

Ejemplo 3

Introducción

Se hizo un estudio de estimulación de cerdos para determinar la seguridad de las cepas 34682 y 35276 de *Salmonella choleraesuis* negativas en Cra knockout (KO) comparadas con las cepas parentales positivas en cra 34682 y 35276. Estos mutantes knockout se hicieron usando plásmidos y procedimientos idénticos a los descritos anteriormente para la construcción de Cra^{mod} AX-2.

1. Análisis de seguridad en cerdos

A. Animales y alojamientos

Se adquirieron veinte (20) cerdos de 5-6 semanas de edad que nunca se habían vacunado de *Salmonella* de una granja sin historia de *Salmonella*. Los cerdos se dividieron en cuatro grupos de 5 cerdos. Durante todo el estudio, los cerdos se albergaron en 4 habitaciones de aislamiento.

ES 2 276 662 T3

B. Estimulación

Se estimularon cinco cerdos en cada grupo a las 5-6 semanas de edad. Los cerdos se estimularon de forma intranasal (0,5 ml/orificio nasal) y oral (1,0 ml de cultivo + 4,0 ml de diluyente bacteriano). El cultivo de estimulación era aproximadamente $9,0 \times 10^8$ CFU/ml. Posteriormente a la estimulación, se observó diariamente en los cerdos los signos típicos de la infección por Salmonella incluyendo pérdida de peso, diarrea y temperatura rectal elevada.

C. Sacrificio

A los siete días post-estimulación, los cerdos se sacrificaron. Se les hizo la necropsia a los cerdos y se cultivaron los pulmones, hígado, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) e íleo para el crecimiento de *S. choleraesuis*.

D. Ganancia de peso

Se calculó la ganancia diaria media (ADG) restando el peso de comienzo del peso final y dividiendo por el número de días desde la estimulación hasta el sacrificio. La ADG del grupo es la media de las ADG de los cerdos individuales.

2. Análisis de seguridad en ratones

Se realizó un estudio en ratones para determinar la LD₅₀ de diversas cepas de *S. choleraesuis*; las cepas parentales positivas en *cra* 34682 y 35276, y las cepas knockout (KO) negativas en *cra* 34682 y 35276.

A. Animales

Se dividieron doscientos (200) ratones CF-1 Sasco de 16-20 gramos en 20 grupos de 10 ratones cada uno para el análisis de seguridad en ratones. Durante todo el estudio, los ratones se albergaron en la misma habitación, pero en diferentes cubetas.

B. Estimulación

Cada cepa tenía 5 subgrupos que contenían 10 ratones cada uno. Estos subgrupos se estimularon con 0,25 ml de forma intraperitoneal (IP) usando 5 soluciones diferentes de la cepa (10^{-3} - 10^{-7}).

Se diluyeron semillas congeladas de cada una de las cuatro cepas a 10^{-3} - 10^{-7} . Cada una de estas diluciones se inyectó de forma intraperitoneal (0,25 ml) en 10 ratones.

Resultados

I. Análisis de seguridad en cerdos

A. Ganancia de peso

Se muestra la ganancia de peso de los cerdos en la figura 1. Estos datos muestran claramente las diferencias entre los cerdos estimulados con cepas KO y cerdos estimulados con cepas parentales. Estos datos reflejan también las diferencias en la salud general de los animales. Ambos grupos de cerdos estimulados con las cepas parentales perdieron peso desde el momento de la estimulación hasta el sacrificio; mientras que los cerdos estimulados con las cepas KO ganaron aproximadamente 0,75 kilogramos por día.

II. Análisis de seguridad en ratones

A. Muerte

Los resultados del estudio en ratones se muestran en la tabla 4 a continuación. La columna de la derecha muestra la LD₅₀ en CFU de las diversas cepas. Las cepas knockout muestran claramente un alto nivel de atenuación.

ES 2 276 662 T3

TABLA 4

Cepa	LD ₅₀ cfu
35276 Parental	< 7,7 cfu
35276 Knockout	1,5E+04 cfu
34682 Parental	12,5 cfu
34682 Knockout	> 9,0E+0,4 cfu

Conclusión

A partir del análisis de seguridad en cerdos se muestra que las cepas Cra knockout (KO) dan una ganancia de peso post estimulación significativamente más alta, comparadas con las cepas parentales. Esto demuestra el carácter atenuado de los mutantes Cra KO. Además del análisis de seguridad en cerdos, el análisis de seguridad en ratones mostró también que las cepas Cra KO estaban atenuadas: La LD₅₀ de los mutantes KO es espectacularmente más alta que la de las cepas parentales.

Ejemplo 4

Introducción

El propósito de este Ejemplo era evaluar la seguridad del mutante Cra KO-34682 comparado con su cepa parental, y determinar la eficacia de la cepa de *Salmonella* KO-34682 contra la estimulación con la cepa 35276 de *Salmonella* virulenta heteróloga. Además, se comparó la eficacia del mutante Cra KO-34682 con controles no vacunados.

Animales y alojamientos

Se adquirieron veinte cerdos de 3 semanas de edad que nunca se habían vacunado de *Salmonella* de una granja sin historia de *Salmonella*. Los cerdos se dividieron en cuatro grupos de 5 cerdos y se alojaron en 4 habitaciones de aislamiento separadas.

Vacunas y vacunaciones

Los cerdos se vacunaron de forma oral a las 3 semanas de edad con aproximadamente 1×10^9 CFU/ml de cepa KO-34682 de *Salmonella choleraesuis*, la 34682 parental o se dejaron sin vacunar.

Estimulación

A los veintiún días posteriores a la vacunación, los cerdos se estimularon de forma intranasal (0,5 ml/orificio nasal) y oral (1,0 ml de cultivo + 4,0 ml de diluyente bacteriano) con la cepa 35276 de *Salmonella choleraesuis* virulenta. La cepa de estimulación 35276 se hizo resistente a ácido nalidíxico (Nal) antes de la estimulación para que las placas que contenían Nal pudieran usarse para diferenciar la cepa de estimulación de la cepa de vacunación. Posteriormente a la estimulación, se observó en los cerdos diariamente signos clínicos típicos de infección por *Salmonella* incluyendo pérdida de peso, diarrea y temperatura rectal elevada. La duración del espasmo de *Salmonella* se evaluó cultivando las superficies diariamente.

A los nueve días post-estimulación, los cerdos se sacrificaron. Se les hizo la necropsia a los cerdos y se cultivaron los pulmones, hígado, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) e íleo para el crecimiento de *Salmonella choleraesuis* sobre placas de agar *Hektoen enteris* (HE) que contenían 80 µg/ml de ácido nalidíxico.

Valor de diarrea

Se calculó el valor de diarrea dando un punto a cada cerdo por cada día de diarrea post-estimulación. Al final del análisis, el número total de puntos conseguidos durante el estudio se dividió por el número de días desde la estimulación hasta el sacrificio. Este número se multiplicó por 100 para dar el porcentaje de días en que fue vista la diarrea.

ES 2 276 662 T3

Esporcimiento de Salmonella

Se tomaron heces de cerdos diariamente para determinar la longitud del esparcimiento de *Salmonella choleraesuis* post-vacunación y de nuevo post-estimulación. Después de dos días de resultados negativos, se paró la toma de heces. Las heces se titularon en placas HE para aislamiento. Se dieron puntos en relación con el crecimiento visto después de diversas diluciones de las muestras. Los puntos se asignaron como sigue:

	10^{-1}	1 pt
10	10^{-2}	2 pts
	10^{-3}	3 pts
	10^{-4}	4 pts
	10^{-5}	5 pts

15 *Ganancia de peso*

Se calculó la ganancia diaria media (ADG) restando el peso de comienzo del peso final y dividiendo por el número de días desde la estimulación hasta el sacrificio. La ADG del grupo es la media de las ADG de los cerdos individuales.

20 *Resultados*

Muerte post-vacunación

25 Dos cerdos que se vacunaron con la cepa 34682 parental de tipo salvaje de *Salmonella choleraesuis* de murieron post-vacunación. Los otros tres cerdos en este grupo se mantuvieron vivos hasta el final del estudio.

Aislamiento de Salmonella/Valor de necropsia

30 La Figura 2 muestra los resultados del aislamiento de *S. c.* para cada órgano. Para todos los órganos, los grupos de cerdos vacunados con la vacuna KO no tenían aislamiento de ningún órgano comparados con los grupos parentales y no vacunados. El grupo no vacunado tenía *Salmonella choleraesuis* aislada en todos los 5 cerdos en el fleo y MLN mientras que el grupo parental no tenía aislamiento en ninguno de esos órganos. Asignando un punto a cada órgano a partir del cual se aisló *Salmonella Choleraesuis*, se calculó un valor de aislamiento para cada grupo. Los resultados demuestran que los cerdos vacunados con la vacuna KO tenían valores más bajos que los cerdos vacunados con la cepa parental, y eran significativamente más bajos que los no vacunados.

Valor de diarrea

40 El valor de diarrea diaria media se muestra en la figura 3. Esta figura muestra una diferencia significativa en los valores KO comparados con los otros tres grupos. El grupo KO mostró claramente la puntuación más baja.

Esporcimiento de Salmonella

45 El esparcimiento de Salmonella de los cerdos posteriormente a la vacunación y post-estimulación se muestra en las figuras 4 y 5. Posteriormente a la vacunación, el gráfico muestra el parental que tiene el nivel más bajo de esparcimiento. En el gráfico post-estimulación, los no vacunados esparcieron *Salmonella choleraesuis* durante la duración más larga, recibiendo de ese modo la puntuación más alta.

50 *Ganancia de peso*

La ganancia de peso de los cerdos se muestra en la figura 6. Estos datos muestran claramente diferencias entre los diferentes grupos. Reflejan también las diferencias de salud generales entre los animales. El grupo no vacunado perdió una media de 0,15 kilogramos por día, mientras que el grupo KO ganó una media de 0,6 kilogramos por día.

55 *Discusión*

60 La cepa 34682 de *Salmonella choleraesuis* knockout probó que era una cepa de vacuna eficaz y segura. El aislamiento de *Salmonella* en la necropsia fue completamente negativo para la cepa knockout. Los no vacunados puntuaron los más altos en el reaislamiento. Refiriéndose a la ganancia de peso diaria media post-estimulación, la cepa knockout tuvo la ganancia de peso más alta y los no vacunados tuvieron significativamente menos ganancia de peso.

Conclusión

65 La cepa de vacuna *Salmonella choleraesuis* KO-34682 viva es segura y eficaz.

ES 2 276 662 T3

Leyenda de las figuras

Figura 1: Ganancia de peso diaria media post-estimulación por cerdo y por día en kilogramos.

5 Figura 2: Porcentaje de cerdos a partir de los cuales pudo re-aislarse *Salmonella choleraesuis* a partir de diversos tejidos (MLN = nódulo linfático mesentérico).

Figura 3: Porcentaje medio del valor de diarrea post-estimulación.

10 Figura 4: Valor de esparcimiento de *Salmonella* diario medio post-vacunación.

Figura 5: Valor de esparcimiento bacteriano diario medio post-estimulación.

15 Figura 6: Ganancia de peso diaria media post-estimulación por cerdo y por día en kilogramos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Vacuna atenuada viva para la protección de animales contra la infección con una bacteria patogénica o los efectos patogénicos de la misma, estando dicha vacuna **caracterizada** porque comprende una bacteria atenuada viva seleccionada entre el grupo de *Escherichia*, *Salmonella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Streptococcus* y *Yersinia*, siendo incapaz dicha bacteria de expresar una proteína Cra funcional como resultado de una mutación en el gen *cra*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 2. Vacuna atenuada viva de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque la bacteria atenuada viva porta un gen heterólogo.

3. Vacuna atenuada viva de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque comprende un adyuvante.

15 4. Vacuna atenuada viva de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizada** porque está en forma seca por congelación.

5. Procedimiento para la preparación de una vacuna atenuada viva de acuerdo con la reivindicación 1-4, comprendiendo dicho procedimiento mezclar la bacteria atenuada viva con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 6. Bacteria atenuada viva como se ha descrito en la reivindicación 1, para usar en una vacuna.

7. Uso de una bacteria atenuada viva como se ha descrito en la reivindicación 1 para la fabricación de una vacuna para la protección de animales contra la infección con una bacteria patogénica o los efectos patogénicos de la infección.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

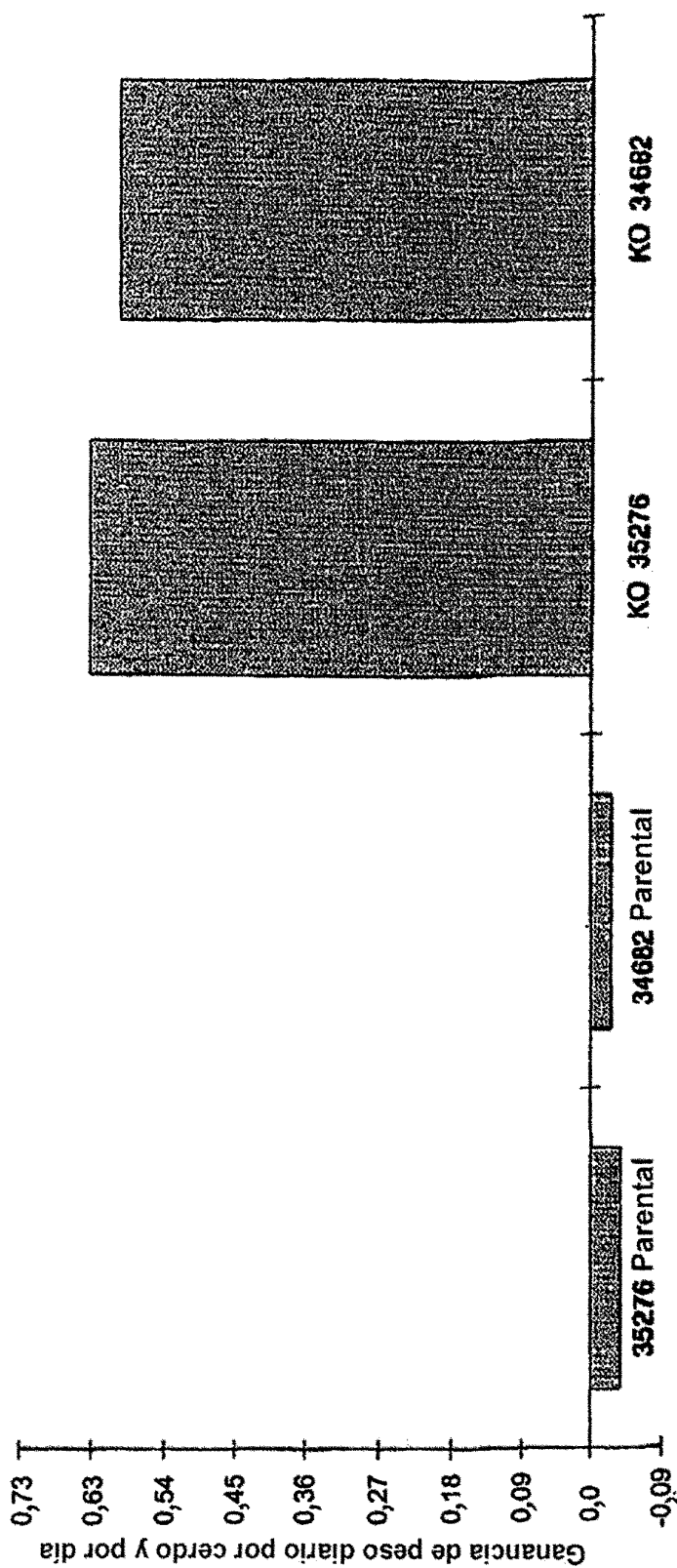


Figura 1

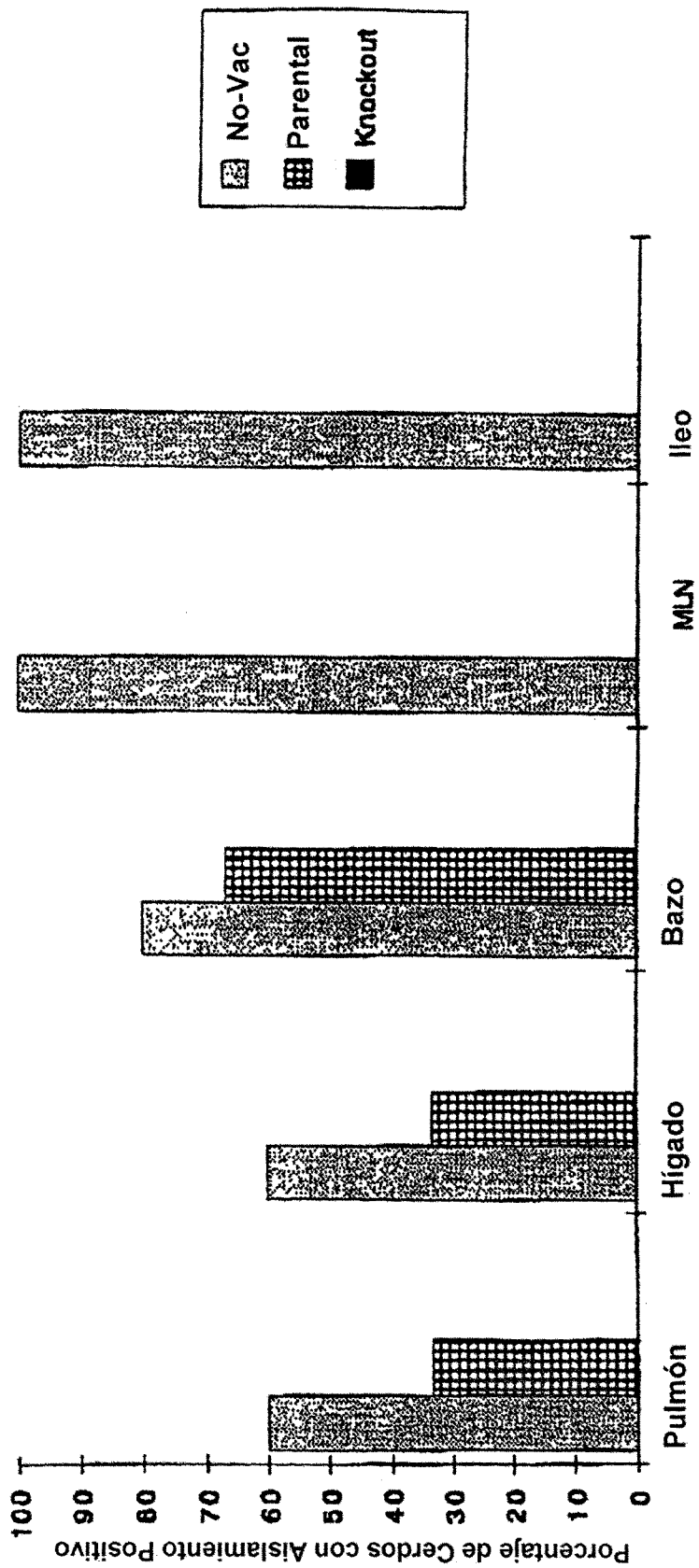


Figura 2

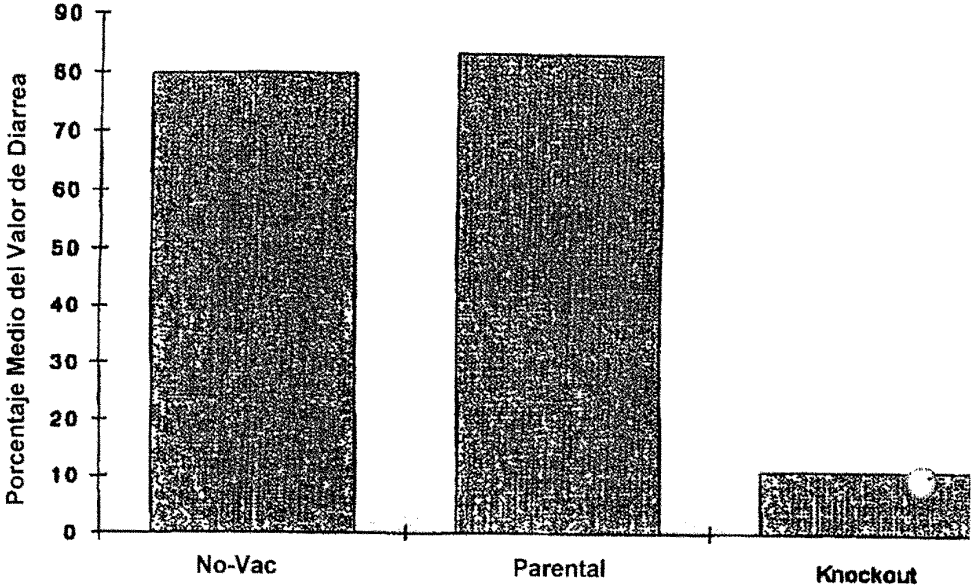


Figura 3

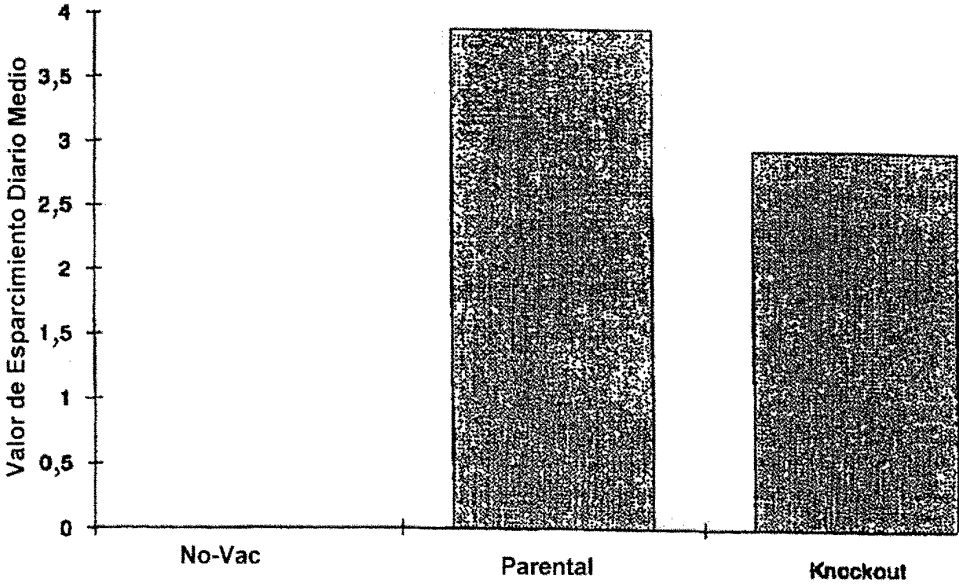


Figura 4

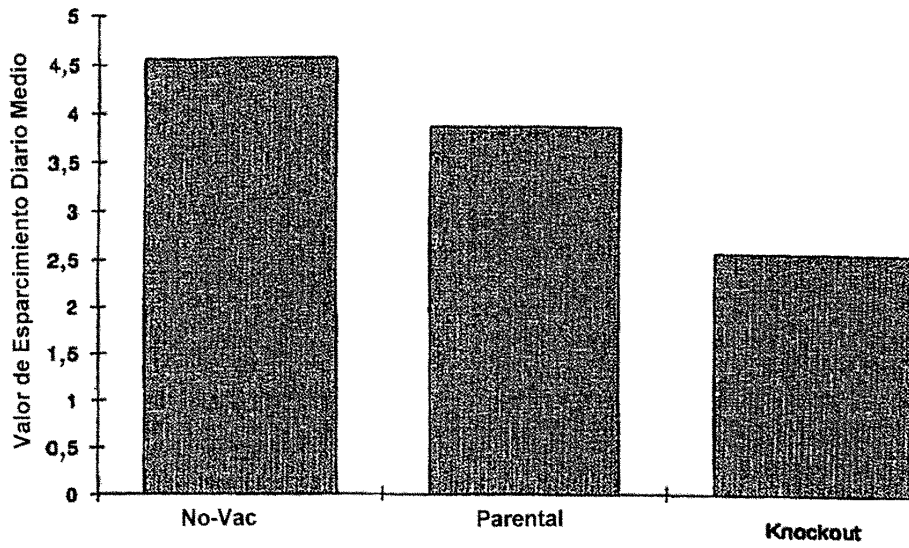


Figura 5

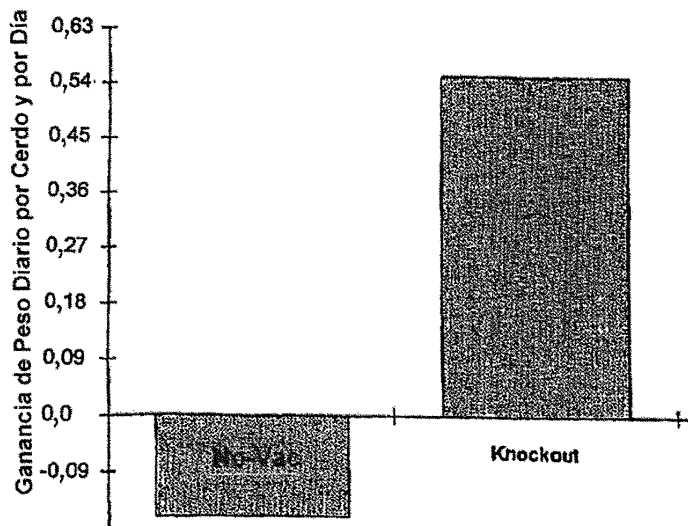


Figura 6