

(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
29 de Enero de 2009 (29.01.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/013379 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/21 (2006.01) *A61K 39/112* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/000518

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Julio de 2008 (24.07.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200702057 24 de Julio de 2007 (24.07.2007) ES

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

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
DOMINGUEZ BERNAL, Gustavo [ES/ES]; Facultad de
Veterinaria de la Universidad Complutense, Avenida Puerta
de Hierro, s/n, E-28040 Madrid (ES). **BARTOLOMÉ**
AVARZA, Almira [ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la
Universidad Complutense, Avenida Puerta de Hierro, s/n,
E-28040 Madrid (ES). **TIERREZ-MARTÍNEZ, Alberto**
[ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la Universidad Com-
plutense, Avenida Puerta de Hierro, s/n, E-28040 Madrid
(ES). **MARTÍNEZ PULGARÍN, Susana** [ES/ES]; Facul-
tad de Veterinaria de la Universidad Complutense, Avenida
Puerta de Hierro, s/n, E-28040 Madrid (ES). **ORDEN**

GUTIERREZ, José Antonio [ES/ES]; Facultad de Vet-
erinaria de la Universidad Complutense, Avenida Puerta
de Hierro, s/n, E-28040 Madrid (ES). **DE LA FUENTE**
LÓPEZ, Ricardo [ES/ES]; Facultad de Veterinaria de la
Universidad Complutense, Avenida Puerta de Hierro, s/n,
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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, 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
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publi-
cada separadamente en forma electrónica y disponible por
medio de la Oficina Internacional previa petición

(54) Title: ATTENUATED LIVE STRAIN OF SALMONELLA ENTERICA SEROVAR CHOLERAESUIS AS A VACCINE AND
VACCINAL VEHICLE FOR SWINE LIVESTOCK

(54) Título: CEPA VIVA ATENUADA DE SALMONELLA ENTÉRICA SEROVAR CHOLERAESUIS COMO VACUNA Y
VEHÍCULO VACUNAL PARA EL GANADO PORCINO

(57) Abstract: Attenuated live strain of *Salmonella Enterica* Serovar Choleraesuis as a vaccine and vaccinal vehicle for swine livestock. The present invention provides a novel live and attenuated vaccinal strain, incapable of producing the alternative sigma factor (RpoS) and which, functions as a vaccinal vehicle for heterologous antigens. The strain is constructed by means of phase deletion of the totality of the gene which codifies the alternative sigma factor, *rpoS*, by means of homologous recombination. The strain is avirulent, genetically stable, lacks antibiotic resistance markers and is easily differentiated from wild strains.

(57) Resumen: Cepa viva atenuada de *Salmonella entérica* serovar Choleraesuis como vacuna y vehículo vacunal para el ganado porcino. La presente invención proporciona una nueva cepa vacunal viva y atenuada, incapaz de producir el factor alternativo sigma (RpoS) y que, además, funciona como vehículo vacunal de antígenos heterólogos. La construcción de la cepa se ha realizado mediante la delección en fase de la totalidad del gen que codifica el factor alternativo sigma, *rpoS*, mediante doble recombinación homóloga. La cepa es avirulenta, genéticamente estable, sin marcadores de resistencia antibiótica y se diferencia fácilmente de las cepas silvestres.

WO 2009/013379 A1

TÍTULO

Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* como vacuna y vehículo vacunal para el ganado porcino.

5 CAMPO TÉCNICO

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 *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* (*S. choleraesuis*) atenuada mediante la delección de un gen, genéticamente estable y sin marcadores de resistencia a antibióticos. Constituye
10 una nueva cepa vacunal frente a salmonelosis en porcino y un nuevo vehículo vacunal frente a enfermedades del cerdo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Salmonella es un patógeno intracelular que puede ocasionar gastroenteritis, fiebre entérica o bacteriemia tanto en animales como en el hombre. Las bacterias del género
15 *Salmonella* son bacilos móviles, Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentran filogenéticamente próximas a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*.

En cuanto a su taxonomía, es importante destacar la falta de unanimidad a la hora de denominar a las especies de *Salmonella* y la notable confusión existente con los
20 nombres *S. choleraesuis* y *S. enterica*.

En 1980 se aprobó el nombre de *S. choleraesuis* como único nombre de especie y con varias subespecies; por otro lado, en 1987, se propuso que la única especie del género
25 se llamara *S. enterica* por ser *S. choleraesuis* un término confuso al pertenecer también a uno de los numerosos serovares que integran el género *Salmonella*; al mismo tiempo, otros autores reconocían varias especies, y entre ellas *S. choleraesuis*, mientras que, en 2000, la única especie de *Salmonella* reconocida por el Código Bacteriológico era *S. choleraesuis*. En resumen, ha habido durante mucho tiempo una
30 propuesta acorde al Código Bacteriológico que iba cayendo en desuso

(*S. choleraesuis*); y una propuesta ilegítima que se iba utilizando cada vez más (*S. enterica*).

Por fin, en 2005, la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas decidió que el género *Salmonella* está formado por tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*, y entre los numerosos serovares de la especie *S. enterica*, se encuentra *S. enterica* serovar Choleraesuis (Tindall, *et al.*, 2005, *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 521-4; Shelobolina, *et al.*, 2004, *Appl Environ Microbiol*, **70**: 2959-65; Euzéby, 2005, *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 547-9).

10

Debido a esta confusión, muchos de los documentos anteriores a 2005 en los que se cita a *S. choleraesuis* no se refieren a este serovar en concreto sino a la especie tipo tal y como se denominaba anteriormente y que ahora es *S. enterica*.

El tipo de enfermedad causada por *Salmonella* depende del serovar y del hospedador implicados, por lo que una clasificación práctica de serovares se basa en su espectro de hospedador. Siguiendo este criterio, los serovares de *Salmonella* se dividen en tres grupos: de hospedador restringido, se asocian casi exclusivamente con un hospedador concreto (como Typhi –humanos-, Abortusequi –caballos-, o Abortusovis –ovejas-); adaptados a un hospedador, se asocian principalmente con una especie aunque también pueden causar enfermedades en otras (como Dublin –ganado vacuno- y Choleraesuis –cerdos-); de hospedador no restringido, son ubicuos (como Typhimurium y Enteritidis) y pueden causar enfermedades en una amplia gama de hospedadores no relacionados.

25

La salmonelosis es una de las enfermedades entéricas y septicémicas con mayor importancia económica para la industria porcina y el serovar más frecuentemente aislado a partir de los animales afectados es Choleraesuis. La preocupación generalizada de las diversas administraciones por la elevada prevalencia de *Salmonella* en el sector porcino ha originado el establecimiento de una directiva europea (2003/99/CE) que obliga a este sector a aplicar medidas de vigilancia

30

epidemiológica para controlar las infecciones por *Salmonella* a partir de enero de 2007.

Actualmente, existe una cepa vacunal frente a esta enfermedad, carente del plásmido de virulencia, (Enterisol SC-54) comercializada por Boehringer Ingelheim (patente US5436001) cuya utilización ha sido aprobada en EEUU y Alemania, pero no en otros países, como Taiwán, donde la incidencia de *S. choleraesuis* es enorme y no se ha aprobado el uso de la vacuna por problemas de seguridad (Ku, *et al.*, 2005, *Infect Immun*, **73**: 8194-203).

Debido, fundamentalmente, a la posibilidad de trabajar con el ratón como modelo experimental sencillo y económico, gran parte de los trabajos realizados en cuanto a la atenuación de las cepas de *Salmonella* se han basado en el serovar Typhimurium. Sin embargo, los expertos están de acuerdo en que los factores de virulencia no se pueden extrapolar de un serovar a otro y, mucho menos, de un hospedador a otro. Por eso, recientemente, se han abierto líneas de investigación que han dado lugar a cepas vacunales contra *Salmonella* para cerdos basadas en genes metabólicos (Kelly, *et al.*, 1992, *Infect Immun*, **60**: 4881-90) o a mutantes atenuados afectados en genes esenciales para la persistencia de *Choleraesuis* en cerdo (Ku, *et al.*, 2005, *Infect Immun*, **73**: 8194-203).

Por otro lado, se han utilizado bacterias invasivas vivas como vehículos vacunales de expresión de antígenos heterólogos (es decir, de antígenos procedentes de otros organismos) y entre las bacterias utilizadas se encuentran algunos casos del género *Salmonella* (Daudel, *et al.*, 2007, *Expert Rev Vaccines*, **6**: 97-110). Así, en la solicitud de patente US20030170211-A1, entre otras bacterias, se utiliza una cepa de *S. typhi* como sistema de liberación de ADN de alphavirus en células animales; la patente US5877159-A1 presenta bacterias invasivas vivas para expresar genes heterólogos en células animales mediante un casete de expresión eucariota y, entre las posibles bacterias invasivas, nombra a *Salmonella*; la patente US6764687-B1 se refiere a bacterias vivas atenuadas como vacunas que también pueden ser portadoras de genes heterólogos, construidas mediante la mutación del gen *cra* y, por lo tanto, por

interferencia en el metabolismo de los carbohidratos, tanto de *Escherichia* como de *Salmonella*; en CN1730650 se describe una vacuna viva recombinante contra el virus de la fiebre aftosa construida en *S. choleraesuis*; US6905691-B1 hace referencia a bacterias atenuadas mediante la mutación del gen *surA*, acompañada o no de la
5 mutación en otro gen, utilizadas como vacunas o como vehículos de expresión de antígenos heterólogos y, especialmente, de un fragmento de la toxina tetánica; WO9011687 se refiere a mutantes de *Salmonella* en el gen *phoP* o en el gen *phoP* y, simultáneamente, en los genes *cya* y *crp* que se emplean como vacunas o bien como portadores de antígenos de otros microorganismos patógenos.

10

Tanto la vacuna como el vehículo vacunal ideal deberían ser seguros, fuertemente inmunogénicos, bien caracterizados genéticamente y estables. Existe una necesidad urgente de desarrollar cepas que funcionen como vehículos vacunales, que ofrezcan un excelente perfil de seguridad y que sean capaces de estimular una respuesta celular
15 efectiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un aspecto de esta invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis construida mediante la mutación del regulador RpoS. Se
20 considera cepa viva atenuada aquella estirpe que mantiene su capacidad de invadir y multiplicarse en el interior de su hospedador, pero sin desarrollar el cuadro patológico. La nueva cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia) donde le ha sido asignado el número de
25 depósito 7268. Se ha utilizado *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (según la nomenclatura vigente desde 2005) por ser un serovar que está especialmente adaptado al ganado porcino. Por comodidad, a partir de aquí la nombraremos como *S. choleraesuis*.

30 Si bien los mutantes en *rpoS* de *S. typhimurium* y de *S. typhi* son menos virulentos para el ratón y el hombre, respectivamente (Rychlik and Barrow, 2005, *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 1021-40; Robbe-Saule, et al., 1995, *FEMS Microbiol Lett*, **126**:

171-6), también se ha descrito, en ensayos de inhibición competitiva, cómo la delección del gen *rpoS* en *S. typhimurium* y *S. enteritidis* no modifica la virulencia de las cepas en pollos (Rychlik and Barrow, 2005, *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 1021-40). Por otro lado, se ha demostrado que cepas atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Typhi por modificación de uno o más genes, con fenotipo RpoS+ son prometedoras como vacunas y vehículos vacunales porque el fenotipo RpoS+ incrementa su poder inmunogénico (US7083794-B2). Queda claro, por lo tanto, que el comportamiento de los mutantes en *rpoS* de *Salmonella* depende del serovar y del hospedador estudiados. En el área que nos ocupa, es fundamental trabajar con cepas específicas para el cerdo.

10

La estrategia elegida para la construcción del mutante se basa en la delección en fase de la totalidad del gen que codifica el regulador RpoS, *rpoS*, mediante doble recombinación homóloga.

- 15 Con el mutante CECT 7268 se aprovechan las especiales propiedades de adaptación al hospedador natural (cerdo) de *S. choleraesuis* para ser utilizada como vehículo de antígenos heterólogos dirigidos a esta especie animal y como vacuna frente a la salmonelosis del cerdo. Esta cepa prolifera en fibroblastos y sobrevive en macrófagos viables, células obtenidas a partir de la lámina propia del intestino delgado del cerdo y
- 20 que constituyen la vía normal de entrada en el hospedador natural de *S. choleraesuis*.

- La construcción del mutante CECT 7268 nos ha permitido desarrollar un nuevo concepto de atenuación de la virulencia de *Salmonella*. Así, empleando cultivos celulares primarios de cerdo normalmente no permisivos para el crecimiento de
- 25 *S. choleraesuis* (fibroblastos de la lámina propia intestinal) la cepa construida presenta un fenotipo de proliferación elevado en células viables, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre e incluso con una vacuna viva atenuada comercial (SC-54). Además, sobrevive en cultivos de macrófagos primarios obtenidos de la lámina propia de la mucosa intestinal, a diferencia de lo que ocurre con la cepa viva atenuada
- 30 comercial que es eliminada. Ambos resultados aseguran una mayor y más prolongada estimulación de la respuesta inmune.

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 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.

La avirulencia de esta cepa evidencia su empleo como cepa vacunal. Por lo tanto, un aspecto de esta invención incluye un kit de vacunación para cerdos contra las enfermedades infecciosas producidas por *S. choleraesuis*, que comprende los elementos y adyuvantes necesarios para contener y vehicular la cepa vacunal. Además, para el control veterinario de la salmonelosis, es importante poder diferenciar la cepa vacunal de las cepas silvestres. Por ello, otro aspecto de esta invención se refiere a la identificación de la cepa mutante mediante una sencilla reacción de PCR utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias adyacentes al gen *rpoS*, como pueden ser los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4.

Otra aplicación de esta invención consiste en la utilización de la cepa atenuada como vector vacunal de expresión o transporte de antígenos heterólogos favorecido por su mayor persistencia en células del sistema inmune junto a su mayor persistencia en el interior de fibroblastos con respecto a las cepas silvestres de *S. choleraesuis*. Tal y como ocurre en el caso del uso de la cepa CECT 7268 como cepa vacunal, en su aplicación como vehículo vacunal puede diferenciarse de las cepas silvestres de *S. choleraesuis* mediante la técnica de la PCR utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias adyacentes al gen *rpoS*; en este caso también pueden utilizarse los oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 como cebadores de la reacción.

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:

5

Figura 1. Muestra el esquema de la construcción de la cepa mutante CECT 7268 según se describe en el ejemplo 1.

10

Figura 2. Supervivencia intracelular de *S. choleraesuis* CECT 7268 en cultivos primarios de macrófagos obtenidos a partir de la lámina propia del intestino delgado porcino, tal y como se describe en el ejemplo 4.

15

Figura 3. Proliferación intracelular de la cepa silvestre parental de *S. choleraesuis* (en barras negras), y *S. choleraesuis* CECT 7268 (en barras blancas) en cultivos primarios de fibroblastos obtenidos a partir de la lámina propia del intestino delgado porcino (SIF). Se representa el número de bacterias intracelulares en el interior de SIFs a las 2 horas (panel A) y a las 24 horas (panel B) postinfección. Se describe en el ejemplo 5.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

20

Las cepas de *S. choleraesuis* empleadas se cultivaron rutinariamente a 37°C con agitación en medio LB (Luria-Bertani). Las cepas transformadas con plásmidos termosensibles se incubaron a 30°C para evitar la pérdida del plásmido. Los medios se complementaron con kanamicina (30µg/ml) o ampicilina (50µg/ml) cuando fue necesario. Para obtener medio sólido se añadió agar (15g/l).

25

Se utilizó *S. choleraesuis* CECT 915 (en adelante, WT) como cepa silvestre para construir la cepa mutante.

30

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

Ejemplo 1: Construcción de un mutante por delección del gen *rpoS* de *S. choleraesuis*. Para la construcción de las cepas vacunales, se optimizó para *Salmonella choleraesuis* (CECT 915) el método previamente descrito para *Escherichia coli* y *S. typhimurium* (Datsenko and Wanner, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 6640-5). En la figura 1 se representa el esquema de la construcción de la cepa mutante. Las secuencias empleadas como moldes en el diseño de los oligonucleótidos utilizados para deleccionar *rpoS* se obtuvieron a partir de la secuencia completa del genoma de *S. choleraesuis*. En la figura 1, los números 1, 2, 3, y 4 se corresponden con la nomenclatura de los oligonucleótidos utilizados en esta invención y descritos en SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4, respectivamente, que se representan con flechas en la figura 1.

Cada uno de los cebadores de la pareja de oligonucleótidos descritos en SEQ ID NO: 1 y 2 se encuentra integrado por un tándem formado por: (i) secuencias (destacadas en gris) homólogas a la región que flanquea en el extremo 5' (oligonucleótido 1) y en el extremo 3' (oligonucleótido 2) a *rpoS* (flecha gris marcada con *rpoS* en la figura 1); (ii) junto a secuencias (destacadas en negro) que hibridan con el plásmido pKD4 en la región que flanquea el extremo 5' (oligonucleótido 1) y el extremo 3' (oligonucleótido 3) del gen de resistencia a kanamicina. Este plásmido codifica un casete de resistencia a kanamicina (rectángulo negro marcado con *km* en la figura 1) flanqueado por secuencias repetidas denominadas FRT (marcadas en blanco en los extremos del casete de kanamicina en la figura 1). pKD4 se utilizó como DNA molde de una PCR en la que se utilizaron los oligonucleótidos 1 y 2 como cebadores y en la que se amplificó un fragmento de 1,6 kb, en cuyos extremos se encontraban las secuencias homólogas a las regiones flanqueantes al gen *rpoS* que portaban los propios cebadores 1 y 2 en uno de sus extremos. Este fragmento de PCR fue introducido mediante electroporación en la cepa WT de *S. choleraesuis* en la que previamente se había introducido, también por electroporación, el plásmido termosensible pKD46, que porta el sistema λ Red que permite la recombinación homóloga del fragmento de PCR con el DNA cromosómico. A continuación se seleccionaron las colonias en las que se había producido el fenómeno de recombinación y que, por lo tanto, habían incorporado el marcador de resistencia a antibiótico y habían sido capaces de crecer en un medio con kanamicina 30 μ g/ml. Posteriormente, fueron analizadas con los

cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 para determinar si se había producido la recombinación en el lugar adecuado. Estos cebadores se diseñaron basándose en la secuencia de las regiones flanqueantes a *rpoS* (el gen *nlpD* para el diseño de SEQ ID NO: 3 y el gen *SC2853* para el diseño de SEQ ID NO: 4).

5

Finalmente, el gen de resistencia antibiótica fue eliminado del cromosoma mediante la flipasa codificada en el plásmido termosensible pCP20. Este plásmido recombinante se introdujo en *S. choleraesuis* mediante electroporación. Las bacterias transformadas, seleccionadas en medio con Ampicilina 50µg/ml, se incubaron a 30°C en presencia de
10 ampicilina hasta la fase estacionaria de crecimiento. A continuación se elevó la temperatura a 43°C durante 24 horas para evitar la multiplicación del plásmido y permitir su curación, es decir, su eliminación de las bacterias. Por último se confirmó la desaparición del casete de resistencia a kanamicina y la delección del gen *rpoS* mediante PCR utilizando los cebadores flanqueantes, descritos en SEQ ID NO 3 y 4
15 (señalados como 3 y 4 en la figura 1), obteniendo así la cepa CECT 7268 de *S. choleraesuis*.

Ejemplo 2: Valoración de la atenuación en el modelo murino de infección experimental. Con el fin de evaluar el efecto en la virulencia del mutante construido y
20 compararlo con la cepa silvestre parental WT y la cepa atenuada comercial SC-54, se estimó el denominado índice de competición (CI) tras inocular ratones BALB/c por vía intraperitoneal (ip) con una mezcla bacteriana de la cepa cuya virulencia queríamos analizar y de la cepa silvestre o control. El CI es la relación entre el número de bacterias de cada una de las dos cepas obtenidos tras la infección (*output*), previa
25 normalización con el número de bacterias del inóculo (*input*): $(M_o/W_o)/(M_i/W_i)$, donde *M* es el número de bacterias de la cepa mutante, *W* es el número de bacterias de la cepa parental, *o* es el recuento del número de bacterias del *output* e *i* es el recuento de las bacterias del *input*. Un mutante se considera atenuado empleando este índice si el valor de CI es < 0,4.

30

CECT 7268, la cepa silvestre y SC-54 se cultivaron durante 18-20 horas en medio LB a 37°C sin agitación. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS

estéril y se resuspendieron en 5 ml de PBS estéril para obtener las dosis de inoculación que se ajustaron mediante diluciones seriadas siguiendo la relación 1 DO₆₀₀ equivale a 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Las dosis utilizadas oscilaron entre 1x10⁶ ufc para WT y SC-54 y 1x10⁷ ufc en el caso de CECT 7268. La

5 cantidad de ufc de los inóculos se confirmó mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LB y reacciones de PCR a partir de las colonias obtenidas, utilizando los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 de manera que en el caso de las cepas WT y SC-54 se obtenía una banda de 2610 pares de bases y en la cepa mutante CECT 7268, que tiene delecionado el gen *rpoS*, la banda era de 1618 pares de bases. Para el ensayo

10 se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, que se dispusieron en grupos de 3 animales cada uno y a los que se suministró agua y comida *ad libitum* bajo condiciones normales de luz y temperatura. Se comparó el mutante CECT 7268 por un lado con la cepa silvestre (WT) y por otro con la cepa comercial SC-54. Los animales se inocularon intraperitonealmente con 0,2 ml de las suspensiones

15 bacterianas con las dosis ajustadas según se acaba de describir. Los ratones fueron sacrificados y necropsiados a las 72 horas o en estado moribundo. Se extrajeron asépticamente muestras de bazo e hígado para determinar el contenido exacto de las 2 cepas en cada animal. Para ello se realizaron PCRs, a partir de las colonias obtenidas, utilizando los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 tal y como se acaba de

20 describir para los inóculos. Se calculó el CI en la colonización de los órganos siguiendo la fórmula descrita anteriormente. Los datos obtenidos indicaron que CECT 7268 presentaba un alto grado de atenuación con respecto a su cepa parental silvestre (véase tabla 1). Además, CECT 7268 presentó una significativa reducción de la virulencia con respecto a la cepa viva atenuada comercial SC-54.

25

Tabla 1 Índice de competición en ratones BALB/c

Cepas comparadas	CI ¹	
	Medias (± ES) ²	Atenuación
<i>rpoS</i> versus WT	0.0028 (± 0.0016)	Sí
<i>rpoS</i> versus SC-54	0.018 (± 0.010)	Sí

¹únicamente se tuvieron en cuenta los animales que se encontraban en estado moribundo. Los datos de CI < 0,4 indican atenuación

²ES: error estándar

Ejemplo 3: Valoración de la atenuación de CECT 7268 en el hospedador natural, el cerdo. Una vez comprobada la drástica atenuación en el modelo murino, profundizamos en el análisis de la virulencia realizando ensayos en el modelo porcino mediante infecciones mixtas por vía oral entre la cepa silvestre, CECT 7268 y la vacuna viva atenuada comercial (SC-54), calculando los niveles de competición en la colonización de los nódulos linfáticos mesentéricos mediante el cálculo del índice de competición (CI) tal y como se ha detallado en el ejemplo 2 para el ratón. Para ello, se inocularon oralmente 3 cerdos cruces de *Landrace* con *Large White* de entre 5 y 6 semanas de edad. Los animales se agruparon aleatoriamente en cuatro lotes de 3 animales cada uno. Los cerdos se inocularon por vía oral; dos lotes con una mezcla de CECT 7268/WT y otros dos lotes con CECT 7268/SC-54 con dosis de 10^8 ufc (WT y SC-54) y 10^9 ufc (CECT 7268). Los animales fueron eutanasiados a los 3 días post-inoculación. Tras la necropsia, se extrajeron asépticamente muestras de nódulos linfáticos mesentéricos para hacer recuento de la cantidad de bacterias recuperadas en cada ensayo para cada cepa utilizando, como en el ejemplo 2, los cebadores descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 en reacciones de PCR. Los datos de CI obtenidos, mostrados en la Tabla 2, confirman una extraordinaria atenuación en la virulencia de CECT 7268 con respecto a su cepa silvestre parental en el hospedador al que *S. choleraesuis* está adaptado, el cerdo.

Tabla 2. Índice de competición en nódulos mesentéricos de lechones

Cepas comparadas	CI ¹	
	Medias ($\pm$ ES ²)	Atenuación
CECT 7268 <i>versus</i> WT	0,022 ($\pm$ 0,006)	Sí
CECT 7268 <i>versus</i> SC-54	1,31($\pm$ 1,5)	No

¹Los datos de CI < 0,4 indican atenuación

²ES: error estándar

- Ejemplo 4:** Ensayos de supervivencia intracelular en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM). Para determinar si la delección del gen *rpos* afecta a la supervivencia intracelular de *S. choleraesuis*, se realizaron estudios de supervivencia intracelular en cultivos primarios de macrófagos extraídos a partir de la lámina propia del intestino delgado de lechones. Los macrófagos constituyen una de las piezas esenciales de la inmunidad innata, y participan activamente en la presentación de antígenos para inducir una inmunidad adquirida satisfactoria.
- 10 Las líneas celulares de macrófagos estables resultan más permisivas a la proliferación intracelular de *Salmonella* que los cultivos primarios, no obstante, con el fin de reproducir de una forma más fiable lo que puede ocurrir *in vivo*, decidimos obtener cultivos primarios de la lámina propia del intestino delgado de lechones que se expandieron hasta conseguir un cultivo primario.
- 15 Para examinar el comportamiento de las cepas atenuadas en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM) de la lámina propia se realizó un ensayo de protección a gentamicina, en el que los macrófagos se mantuvieron con *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) al que se añadió un 10% de suero fetal bovino, 2% de L-Glutamina, 2,5% HEPES y 1% de Penicilina/Estreptomicina/Fungizona Mix (Biowhittaker), realizando las incubaciones a 37°C con un 5% de CO₂. La cepa silvestre WT, el mutante CECT 7268, así como la cepa vacunal comercial SC-54, se cultivaron durante 18-20 horas en medio LB a 37°C sin agitación. Se determinó la concentración de los inóculos bacterianos sembrando diluciones seriadas en placas de
- 20 LB. Los ensayos de invasión, proliferación y supervivencia intracelular se realizaron en placas de 24 pocillos. Se inocularon los pocillos con una M.O.I. (multiplicidad de infección bacterias: células eucariotas) de 10:1. A continuación, las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Tras esta incubación, se retiró el medio, se lavaron las células tres veces con PBS estéril y se añadió medio de cultivo de macrófagos suplementado con 100 µg/ml de gentamicina a cada pocillo para destruir las bacterias extracelulares. Después de la incubación con gentamicina durante 1 hora y media, (2 horas después de la infección), se retiró el medio y se sustituyó por medio con 10 µg de gentamicina/ml y se mantuvieron incubándose 24 horas más. En aquellos tiempos en los que se necesitaba realizar un recuento del
- 25 número de bacterias intracelulares (al cabo de las 2 ó 24 horas posinfección), se
- 30
- 35

realizaron tres lavados con PBS estéril y se lisaron las células añadiendo Tritón x-100 al 1% en PBS estéril. Se hicieron diluciones seriadas de los lisados y se sembraron en placas de LB para hacer el recuento de ufc.

- 5 La tasa de crecimiento o supervivencia de la bacteria en el interior de estas células se expresó como “índice de proliferación” (Ipro), que se calculó como el cociente del número de bacterias intracelulares a las 24 y 2 horas postinfección. En la figura 2 se representa el Ipro de la cepa silvestre (WT), su mutante en *rpoS*, CECT 7268, y la cepa vacunal SC-54 en el interior de cultivos primarios de macrófagos intestinales de lechón (SIM). En el eje de ordenadas se representa el valor de Ipro que resulta de
10 calcular el cociente entre el número de bacterias viables a las 24 y a las 2 horas postinfección más-menos su error estándar ($\pm$ ES). Los valores mostrados son la media y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independiente. En el eje de abscisas se representan los valores de la cepa silvestre WT ($2,1 \pm 1,3$), el mutante
15 CECT 7268 ($3,8 \pm 1,5$) y SC-54 ($0,2 \pm 0,4$). La comparación de los valores de Ipro de las tres estirpes, mostró que la tasa de crecimiento intracelular del mutante CECT 7268 era ligeramente superior a la de la estirpe silvestre WT (figura 2) y, especialmente destacable, que las dos cepas lograron sobrevivir e incluso proliferar en macrófagos extraídos de la lámina propia intestinal mientras que la cepa vacunal
20 comercial SC-54 es prácticamente eliminada al cabo de las 24 horas postinfección (figura 2).

Ejemplo 5: Ensayos de proliferación intracelular en cultivos primarios de fibroblastos intestinales porcinos (SIF).

25

- Hasta hace poco tiempo, los fibroblastos eran considerados una población homogénea de células con las únicas funciones de prestar un soporte estructural a los tejidos y de reparación de lesiones tisulares. Sin embargo, en la actualidad se sabe que los fibroblastos constituyen una población heterogénea formada por distintas
30 subpoblaciones que intervienen en procesos tan variados como la organogénesis, el control de la motilidad intestinal o la respuesta inmune. Los fibroblastos participan activamente en la generación de la respuesta inflamatoria aguda y en su transición hacia la respuesta inmune adquirida. La abundancia de fibroblastos en la zona de

entrada de *Salmonella* y su función moduladora de la respuesta inmune, sumado a la capacidad de *Salmonella* para infectar fibroblastos *in vitro*, muestran la importancia de estas células en la infección natural por *Salmonella*.

- 5 La capacidad de las estirpes para proliferar en el interior de estos fibroblastos en cultivo primario se examinó mediante un ensayo de protección a gentamicina tal y como se describe en el ejemplo 4. La tasa de crecimiento de la bacteria en el interior de estas células no se pudo expresar como “índice de proliferación” (Ipro) calculado como se describe anteriormente en el caso de los macrófagos (recuento bacteriológico
- 10 en medios de cultivo) porque comprobamos que existía un porcentaje de células muertas en las que las bacterias crecían considerablemente y que enmascaraba el comportamiento de lo que ocurría en las células vivas que son las que interesan como dianas de los vehículos vacunales. Con estos precedentes se decidió determinar de forma más precisa el número de bacterias en el interior de células vivas individuales a
- 15 las 2 y 24 horas postinfección (p.i.) mediante observación microscópica de 100 células infectadas de tres experimentos independientes. Las bacterias se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se realizaron los cultivos celulares sobre lentillas de 11 mm antes de las infecciones, posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% y permeabilizadas con saponina al 0,2% según protocolos
- 20 estándares. Para detectar *Salmonella* se utilizaron anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-LPS (Lipopolisacárido) (Difco) y anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma, Chemicon, Alexa 488 – verde- y alexa 594 –rojo-; Molecular Probes). Finalmente se usó DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; 1 µg/ml) para teñir los núcleos celulares. En la figura 3 se
- 25 muestra el porcentaje de células infectadas que contenían un número bajo ≤ 5 , medio 6-20, ó elevado >20 , de bacterias (en negro se representa WT; y en blanco, CECT 7268) a las 2 horas postinfección (p.i.) (panel A) y a las 24 horas p.i (panel B) en tres experimentos independientes. Las gráficas reflejan en ordenadas la media $\pm$ el error estándar (ES) del porcentaje de células que estaban infectadas con diversos intervalos
- 30 de número de bacterias (1-5, 6-20, >20).

En la infección con la cepa silvestre WT, casi la totalidad de las células infectadas (95,1%) contenían 1-5 bacterias a las 2 horas p.i, y un pequeño porcentaje (4,9%) 6-20 bacterias (figura 3A). A las 24 horas p.i., la proporción de células infectadas con bajo número de bacterias (1-5) disminuyó hasta el 63,1%, aumentando el número de células que presentaban un número medio de bacterias intracelulares (6-20) (24,2%) y apareciendo un pequeño porcentaje de células con un elevado número de bacterias (12,7%) (figura 3B). Cuando se analizó la población de células infectadas con el mutante CECT 7268 a las 2 horas p.i., la mayoría (71,9%) presentaron 1-5 bacterias en su interior. Sin embargo, a las 24 horas p.i., un gran número de estas células (79,9%) presentaban más de 20 bacterias intracelulares (figura 3B). Estas bacterias se alojaban en grandes vacuolas.

Finalmente, en cuanto a la cepa vacunal comercial SC-54, no se pudieron encontrar células vivas infectadas tras 24 horas p.i, incluso a las 2 horas p.i. el número de células infectadas era muy reducido y todas ellas presentaban un número entre 1-5 de bacterias.

REIVINDICACIONES

- 1.- Cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis caracterizada porque carece de la actividad del regulador RpoS.
- 5 2.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 1, caracterizada por la delección del gen *rpoS* que codifica el regulador RpoS.
- 3.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 2,
10 caracterizada porque la delección del gen *rpoS* es una delección en fase.
- 4.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según la reivindicación 3, caracterizada porque la delección en fase del gen *rpoS* se realiza mediante una estrategia que evita la reversión de la cepa mutada al fenotipo silvestre.
- 15 5.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, 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 *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizada porque la delección de *rpoS* no deja en la bacteria marcadores de selección por resistencia a antibióticos.
- 7.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las
25 reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presenta mayor supervivencia en cultivos primarios de macrófagos de cerdo que la cepa parental.
- 8.- Cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presenta mayor capacidad de
30 proliferación en fibroblastos de lámina propia intestinal de cerdo que la cepa parental.
- 9.- Cultivo biológicamente puro de *S. enterica* serovar Choleraesuis cepa CECT 7268.

10.- Uso de una cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 9, como vacuna frente a enfermedades infecciosas producidas por *S. enterica* serovar Choleraesuis en el cerdo.

5

11.- Kit de vacunación para cerdos contra las enfermedades infecciosas producidas por *S. enterica* serovar Choleraesuis que comprenda un contenedor que incluya una cepa viva atenuada como la descrita en las reivindicaciones 1 a 9.

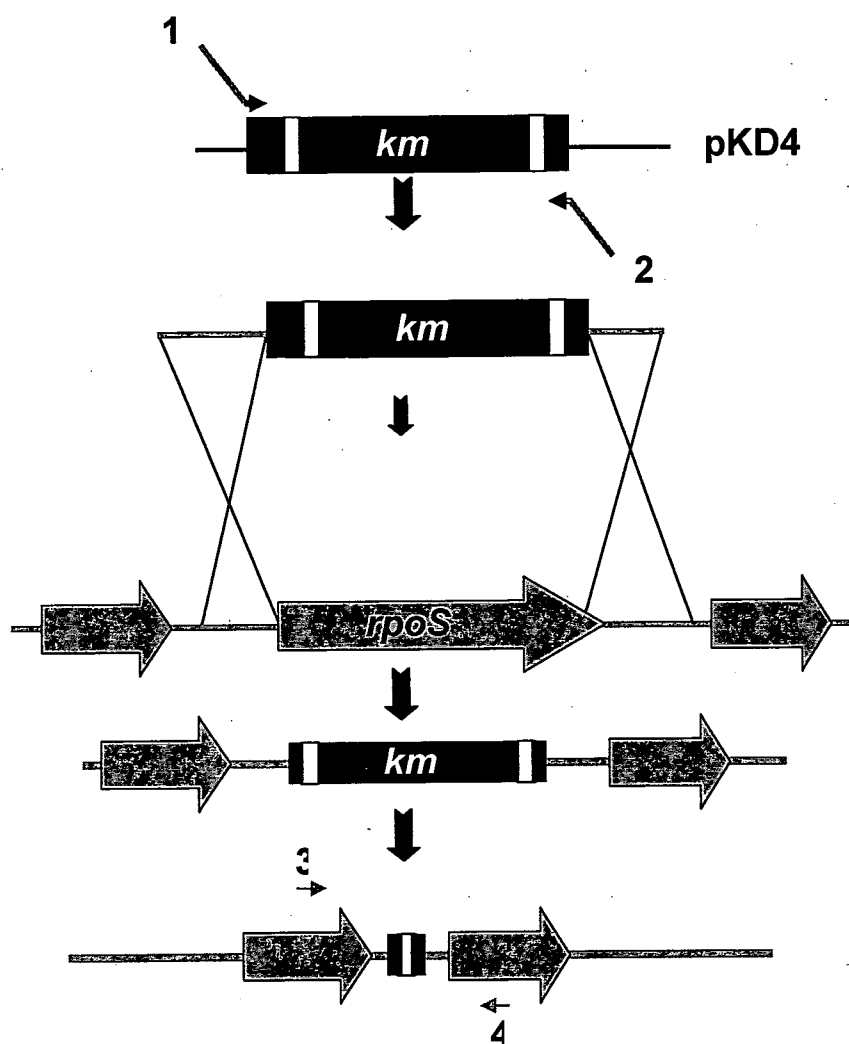
10 12.- Uso de una cepa viva atenuada de *S. enterica* serovar Choleraesuis como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 9, como vehículo vacunal de antígenos heterólogos.

15 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12, caracterizado porque la diferenciación entre la cepa viva atenuada y las cepas silvestres de *S. enterica* serovar Choleraesuis se realiza mediante cebadores diseñados en las regiones adyacentes a la secuencia del gen *rpoS* de *S. enterica* serovar Choleraesuis.

20 14. Uso según la reivindicación 13, caracterizado porque los cebadores utilizados son los descritos en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado porque la técnica utilizada para la diferenciación entre la cepa viva atenuada y las cepas silvestres de *S. enterica* serovar Choleraesuis es la técnica de la PCR.

1 / 3

**Fig. 1**

2 / 3

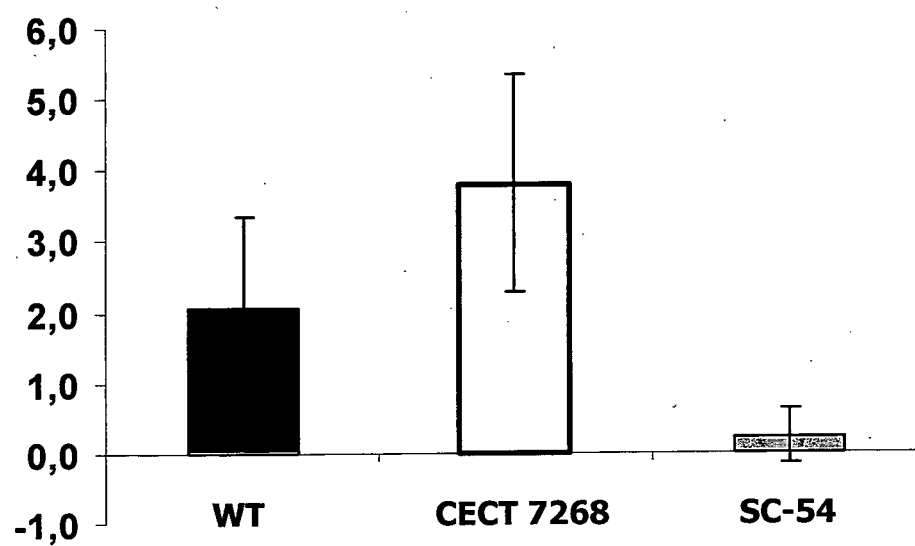
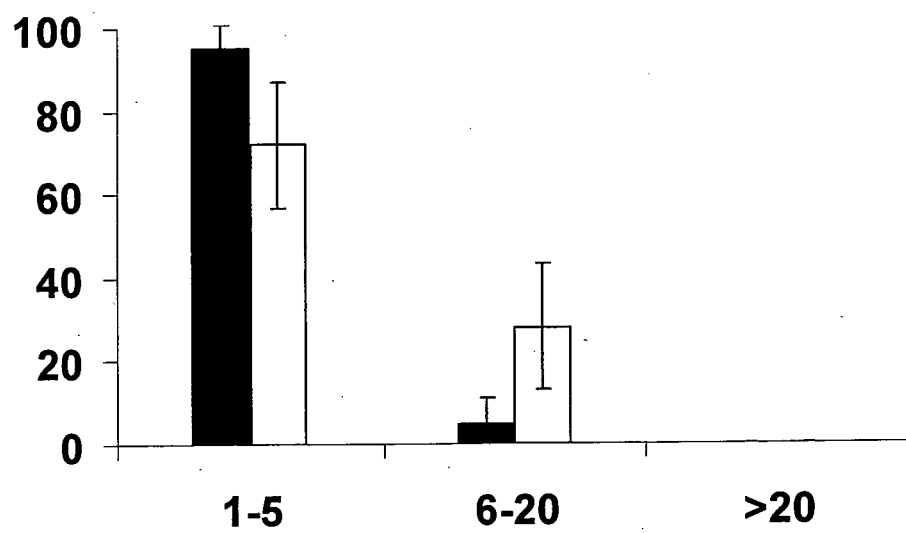


Fig. 2

3 / 3

A



B

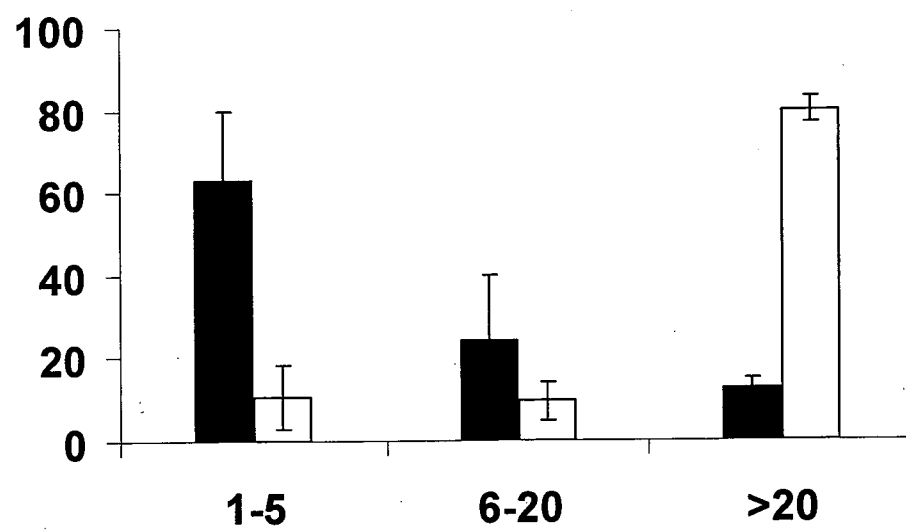


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2008/000518

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)

C12N, A61K

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)

INVENES, EPODOC, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KU Y-W. et al. Novel Attenuated Salmonella enterica Serovar Choleraesuis Strains as Live Vaccine Candidates Generated by Signature-Tagged Mutagenesis. Infection and Immunity. 2005, Vol 73(12), pages 8194-8203. Specially, page 8194, abstract, column 1, paragraph 1-column 2, paragraph 3; page 8195, column 1 paragraphs 1-2; page 8198, column 2 - page 8199, column 1; page 8201, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1.	1-8
A		9-12, 14, 15
Y	METHNER. et al. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of Salmonella phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. Veterinary Microbiology. 2004, Vol 98, pages 37-43. Specially, page 37, abstract; page 38, column 1, paragraphs 1-3; page 41, column 1, paragraph 2.	1-8

☒ 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

25.November.2008 (25.11.2008)

Date of mailing of the international search report

(28/11/2008)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 913493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2008/000518

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NICKERSON Ch A. & CURTISS III R. Role of Sigma Factor RpoS in Initial Stages of Salmonella typhimurium Infection. Infection and Immunity. 1997, Vol 65(5), pages 1814-1823. Specially, page 1814, abstract.	1-12, 14, 15
A	US 7083794 B2 (CURTISS III R et al). 01.08.2006, page 3, column 3, line 10 - column 4, line 43.	1-12, 14, 15
A	WO 2007/053489 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, [US/US]). 10.05.2007, page 1, paragraph 03 - page 2, paragraph 08; page 4, paragraphs 20-23.	1-12, 14, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 13
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The subject matter of claim 13 fails to meet the clarity and conciseness requirements of PCT Article 6 to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search of this claim. Since the primers used to differentiate the mutant strain obtained from the native *Salmonella enterica* serovar *Cholerasuis* strain are not specified, any known or unknown sequence that corresponds to the sequences adjacent to the sequence of the *rpoS* gene could be valid.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/000518

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7083794 B	01.08.2006	WO 9925387 A	27.05.1999
		CA 2309925 A	27.05.1999
		AU 1459599 A	07.06.1999
		US 6024961 A	15.02.2000
		EP 1030690 AB	30.08.2000
		AU 736242 B	26.07.2001
		JP 2001523649 T	27.11.2001
		US 6383496 B	07.05.2002
		AT 219948 T	15.07.2002
		DK 1030690 T	21.10.2002
		ES 2181306 T	16.02.2003
		DE 69806408 T	27.02.2003
WO 2007053489 A	10.05.2007	CA 2626114 A	10.05.2007
		AU 2006308966 A	10.05.2007
		EP 1941024	09.07.2008
		US 2008233094 A	25.09.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/000518

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2008/000518

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)

C12N, A61K

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)

INVENES, EPODOC, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	KU Y-W. et al. Novel Attenuated Salmonella enterica Serovar Choleraesuis Strains as Live Vaccine Candidates Generated by Signature-Tagged Mutagenesis. Infection and Immunity. 2005, Vol 73(12), páginas 8194-8203. Especialmente, página 8194, resumen, columna 1, párrafo 1- columna 2, párrafo 3; página 8195, columna 1 párrafos 1-2; página 8198, columna 2 - página 8199, columna 1; página 8201, columna 1, párrafo 2 - columna 2, párrafo 1.	1-8
A		9-12, 14, 15
Y	METHNER. et al. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of Salmonella phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. Veterinary Microbiology. 2004, Vol 98, páginas 37-43. Especialmente, página 37, resumen; página 38, columna 1, párrafos 1-3; página 41, columna 1, párrafo 2.	1-8

☒ 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.

25.Noviembre.2008 (25.11.2008)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

28 de Noviembre de 2008 (28/11/2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

Mª D. García Grávalos

N° de teléfono +34 913493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/000518

C (continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	NICKERSON Ch A. & CURTISS III R. Role of Sigma Factor RpoS in Initial Stages of Salmonella typhimurium Infection. Infection and Immunity. 1997, Vol 65(5), páginas 1814-1823. Especialmente, página 1814, resumen.	1-12, 14, 15
A	US 7083794 B2 (CURTISS III R et al). 01.08.2006, página 3, columna 3, línea 10 - columna 4, línea 43.	1-12, 14, 15
A	WO 2007/053489 A2 (UNIVERSITY OF MARYLAND, [US/US]). 10.05.2007, página 1, párrafo 03 - página 2, párrafo 08; página 4, párrafos 20-23.	1-12, 14, 15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2008/000518

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 13
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de esta reivindicación no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT, hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esta reivindicación, no resulta posible debido a que al no especificar los cebadores utilizados para diferenciar la cepa mutante obtenida de la silvestre de *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*, cualquier secuencia que se corresponda con las adyacentes a la del gen *rpoS*, conocida o no, podría ser válida.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/000518

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 7083794 B	01.08.2006	WO 9925387 A CA 2309925 A AU 1459599 A US 6024961 A EP 1030690 AB AU 736242 B JP 2001523649 T US 6383496 B AT 219948 T DK 1030690 T ES 2181306 T DE 69806408 T	27.05.1999 27.05.1999 07.06.1999 15.02.2000 30.08.2000 26.07.2001 27.11.2001 07.05.2002 15.07.2002 21.10.2002 16.02.2003 27.02.2003
WO 2007053489 A	10.05.2007	CA 2626114 A AU 2006308966 A EP 1941024 US 2008233094 A	10.05.2007 10.05.2007 09.07.2008 25.09.2008

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)