



**Sres.
Superintendencia de Industria y Comercio Dirección
de Nuevas Creaciones
E. S. D**

Ref.

Expediente. No. NC2022/0008650

**Solicitud de patente de invención
titulada**

“VACUNA RECOMBINANTE PORCINA DE
SALMONELLA ENTERITIDIS QUE
COMPRENDE LA PROTEINA CAP DE
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)”

Solicitantes

FARMACOLÓGICOS VETERINARIOS SAC

Número de solicitud internacional

PCT/PE2020/000013

Fecha de presentación internacional

5 de noviembre de 2020

Prioridad

PE 002588-2019/din 19 de diciembre de 2019

RESPUESTA AL OFICIO No. 8810 de 9 de junio de 2025

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

FREDY SÁNCHEZ MERINO, mayor de edad y vecino de Barranquilla, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la institución solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

En atención al Oficio No. 8810, esta parte presenta una respuesta integral que subsana los señalamientos relacionados con la descripción, las reivindicaciones y el nivel inventivo de la solicitud NC2022/0008650. De conformidad con los literales c) y e) del artículo 28 de la Decisión 486, se adjuntan nueva descripción y pliego reivindicatorio, acompañados de un análisis técnico y jurídico que demuestra que los documentos D1 y D2 no anticipan ni hacen evidente la solución técnica reivindicada. Asimismo, y en ejercicio de la facultad prevista en el artículo 34 de la Decisión 486, que permite al solicitante modificar la solicitud en cualquier momento del trámite, se presentan con este escrito nuevas reivindicaciones. Dichas modificaciones se encuentran debidamente sustentadas en la solicitud inicial, no amplían el alcance de la invención



originalmente presentada y permiten subsanar las observaciones de claridad formuladas por el señor examinador. En virtud de lo anterior, se solicita la continuación del trámite y el reconocimiento de la patentabilidad de la invención.

1. Primeramente, nos acogemos al título amablemente sugerido por el señor examinador, el cual queda del siguiente tenor: “VACUNA RECOMBINANTE PORCINA DE SALMONELLA ENTERITIDIS QUE COMPRENDE LA PROTEÍNA CAP DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)”. Con el nuevo pliego reivindicatorio se superan las observaciones de claridad relacionadas con el juego de reivindicaciones originalmente presentado. Adicionalmente, en relación con el casete <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator>, se precisa que no posee una SEQ ID en la memoria, toda vez que, como se menciona en la reivindicación 1, dicha secuencia corresponde al resultado de la fusión de las SEQ ID 5 y SEQ ID 9. La descripción, por su parte, ha sido objeto de ajustes que garantizan su claridad y coherencia técnica, principalmente en lo relativo a la cepa transformada, unificándose las denominaciones empleadas para referir de manera consistente la cepa utilizada en la invención.
2. Siguiendo el orden del numeral anterior, se hace constar que se ha efectuado el pago correspondiente a la modificación, la cual se encuentra en trámite bajo el expediente NC2025/0014513, con el fin de que la misma pueda ser considerada válidamente durante el examen de patentabilidad, conforme a lo previsto en el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Esta modificación se ha presentado sin ampliar el contenido técnico originalmente divulgado, limitándose a reforzar la suficiencia descriptiva de la solicitud.
3. En atención a lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y frente al señalamiento de presunta falta de nivel inventivo respecto de la solicitud NC2022/0008650, manifestamos respetuosamente que la invención reivindicada sí cumple con este requisito, por cuanto no resulta evidente ni obvia para una persona versada en la materia a partir del estado de la técnica representado por los documentos D1 (WO2018231078) y D2 (“*Oral vaccination with attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium expressing Cap protein of PCV2 and its immunogenicity in mouse and models*”), considerados por esa Dirección.
4. En atención al párrafo anterior, y de manera general, nos permitimos señalar las siguientes diferencias técnicas que sustentan el nivel inventivo necesario para acceder al registro de la propiedad industrial:

4.1. Nivel inventivo del proceso

El señor examinador argumenta que: “La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el proceso divulgado en D1, consiste en que, la solicitud menciona un casete terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos: fragmento 1 de 1038 y fragmento 2 de 849 pares de bases (pb), en donde clyA se refiere a citolysina A, incluir un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento citolysina A (clyA) y el fragmento CAP, obtener un fragmento de 1929 pb mediante subclonado en un plásmido de expresión.”

“No hay evidencia de que el incluir los casetes de expresión mencionados proporcione un proceso con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un proceso para la obtención de una cepa mutante de Salmonella enteritidis 3934vac mediante la introducción de un casete para la expresión de genes heterólogos ya había sido previsto en dicho documento, en donde se menciona la introducción de un casete de expresión que comprende el



gen fibra del adenovirus aviar tipo 1 (fibraAVA1) fusionado a la secuencia de clyA (Pág. 19, Ej. 1). Además, los casetes de expresión no se encuentran definidos apropiadamente mediante sus características estructurales, por lo que no es posible asociar los datos de la descripción a la materia reivindicada.”

En relación con estos argumentos, es necesario dirigir la atención del señor examinador sobre el hecho que la presente invención desarrolla la vacuna contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) mediante la construcción de un casete <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos de 1038 y 849 pares de bases (pb) el documento, en tanto que el documento D2 utiliza la Salmonella entérica serovar Typhimurium como vehículo transgénico para el desarrollo de vacunas orales en donde el gen que codifica Cap de PCV2 se amplifica por PCR y se clona en un vector de expresión diferente como es el caso de pYA3341.

Adicionalmente, es importante hacer énfasis sobre el hecho de la estrategia de expresión utilizada, ya que, para el caso de la presente invención, la intención de fusionar el gen del antígeno cap al fragmento ClyA mediante un linker responde a la intención de dirigir la expresión del antígeno cap a la superficie bacteriana, característica que puede mejorar la inmunogenicidad de la vacuna respecto a aquellas que poseen una expresión intracelular del antígeno recombinante. Esta estrategia no se menciona ni se sugiere en el documento D2, donde el antígeno cap no ha sido fusionado a un fragmento que lo localice en la superficie bacteriana, lo cual puede evidenciarse por el tamaño de la proteína heteróloga expresada y detectada mediante western blot en dicho trabajo (23 KDa, ver imagen 2 en D2) el cual correspondería sólo al antígeno cap, difiriendo al tamaño del fragmento expresado en la presente invención (55 KDa) el cual es el resultado de la expresión del gen fusión ClyA+Cap. Otra diferencia a considerar se encuentra en el origen de la expresión, en D2 se establece la expresión heteróloga sólo a partir de un vector plasmídico. En contraste, la invención solicitada, además de utilizar un vector plasmídico, se realiza un proceso de recombinación que integra el gen heterólogo en el cromosoma de la cepa Salmonella enteritidis, lo que podría darle una mayor estabilidad de la expresión génica.

Por su parte, el documento D1, si bien enseña que una cepa de Salmonella se modifica para deleccionar el gen waaL para presentar un fenotipo rugoso, sin embargo, enseña que dicha cepa porta en su cromosoma los genes que codifican el antígeno fibra de AVA-1, pero no enseña ni sugiere que se pueda obtener una vacuna contra circovirus porcino tipo 2 a partir de una cepa de Salmonella enteritidis a la cual se le han deleccionado los doce genes que codifican enzimas diguanilatociclasas, el gen rpoS y el gen waaL y que porte un casete de expresión para el antígeno CAP del circovirus porcino tipo 2 la cual confiera inmunidad contra circovirus porcino tipo 2 a una población de cerdos, por lo que una persona medianamente versada en la materia no habría estado motivada para incluir un antígeno CAP de PCV2 de D2 en el proceso de D1 y llegar de manera evidente al objeto de la reivindicación 1.

En relación con la vacuna recombinante, contrario a lo afirmado por el señor examinador, el incluir el gen CAP de PCV2 le proporciona a la vacuna un efecto técnico sorprendente diferente al que se proporciona en el objeto de la anterioridad D1 toda vez que la vacuna que comprende la cepa mutante de salmonella enteritidis con el gen CAP no había sido prevista en el documento D1.

En la presente invención se ha realizado una mutación dirigida mediante técnicas de manipulación genética basadas en el conocimiento de la funcionalidad del gen a alterar. En efecto, como se indica claramente en la memoria descriptiva en las páginas 10 y 14: “a la cual, por técnicas de ingeniería genética, se le han deleccionado los doce genes que codifican enzimas



diguanylatociclasas, el gen rpoS y el gen waaL. Esta última mutación se realizó con el objetivo de obtener una cepa de inmunogenización de fenotipo rugoso (Salmonella enteritidis 3934vac Dwaal) que confiera protección en animales de crianza.

Específicamente, el proceso para delecionar el gen waaL del cromosoma de *Salmonella enteritidis* comprende criterios que deben ser considerados para lograr una efectiva mutación sin alterar alguna otra región cromosómica, donde el vector debe contener regiones adyacentes al gen waaL que no deben ser mayores a 500 nucleótidos ya que la recombinación es óptima con fragmentos de este tamaño, y tampoco debe ser menor a 250 nucleótidos ya que la eficiencia y especificidad de recombinación puede disminuir considerablemente.

En ese sentido, para la obtención de estos fragmentos es necesario diseñar cebadores específicos que además de hibridar en las regiones adyacentes del gen waaL deben agregar los nucleótidos necesarios para otorgar un sitio para cortes de restricción al fragmento amplificado, esto permitirá que en los procesos de clonaje posteriores se integren los fragmentos obtenidos con la orientación 5' y 3' correcta en el plásmido; de no conseguir la integración correcta de los fragmentos en el plásmido, no será posible la recombinación con la secuencia homóloga presente en el cromosoma bacteriano.

De hecho, el artículo (Anexo 1) titulado “Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators” de Summer R. et al 2016) pone de manifiesto que no siempre con la delección se logra una mayor atenuación y un aumento en la inmunogenicidad y que la combinación de delecciones de genes no aumente la potencia de una vacuna (por favor ver punto 3.3 y 3.5 del artículo 1, páginas 8 y 10) en donde se indica que la doble y triple delección de genes induce títulos de anticuerpos neutralizantes más bajos y por consiguiente una inmunogenicidad más pobre.

De igual forma, el artículo (Anexo 2) titulado “Enteric Pathogens as vaccine vectors for Foreign antigen delivery” de Kottom C et al, 2004 establece que debe haber un balance entre la inmunogenicidad y la atenuación en cepas de bacterias atenuadas, lo cual puede resultar difícil ya que una excesiva atenuación del vector bacteriano puede acarrear una pobre inmunogenicidad y también establece que la atenuación inadecuada puede resultar en una reactividad excesiva o una infección sintomática, especialmente en hospedadores inmunodeprimidos. (Por favor véase página 5, primero y tercer párrafo del artículo 2).

Por lo que para el caso de la cepa de *Salmonella* 3934vacR de acuerdo con la presente invención, resulta inesperado a la luz de lo divulgado en la técnica anterior, que al hacer delecciones adicionales (delección del gen waaL) a parte de las delecciones que ya tiene la cepa de *Salmonella* descrita en la invención, se logre ese balance entre inmunogenicidad y atenuación como se ilustra en los ejemplos de trabajo de acuerdo con la presente invención.

Sobre este particular, atentamente reiteramos que un experto en la materia no deduciría de manera evidente el procedimiento de obtención de la cepa mutante de *Salmonella enteritidis* de la presente invención toda vez que el documento D1 divulga un procedimiento diferente de obtención de una cepa mutante de *Salmonella enteritidis* que expresa el gen de fibra del virus AV AI y una persona versada en la materia técnica correspondiente sabe que los procedimientos pueden acarrear alteraciones en la inmunogenicidad de la cepa obtenida por dicho procedimiento, por ende, dicha persona no albergaría expectativas razonables de éxito en la obtención de la cepa mutante de la presente invención. Por lo tanto, el procedimiento y la cepa mutante de la presente invención son, a todas luces, inventivos frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2.



Consideramos importante hacer énfasis sobre el hecho que ninguno de los documentos citados por el examinador muestra o sugiere que se pueda realizar una modificación en la cual se obtenga una cepa de Salmonella enteritidis que pueda tener modificaciones que incluyan más de trece delecciones en sus genes y mucho menos una delección en el gen waaL.

En este orden de ideas, la persona que tuviera conocimiento del documento D1 y D2, tampoco habría estado motivada a obtener el proceso de la nueva reivindicación 1 de la presente invención, toda vez que el documento D2 solamente revela un proceso para la generación de una cepa mutante de *Salmonella Typhimurium* X4550 que se obtiene mediante la transformación con un plásmido recombinante que tiene el gen CAP de PCV2. Además, dicha persona no habría estado motivada a combinar lo enseñado en D2 dentro del proceso reportado en D1, toda vez que la cepa mutante de *Salmonella enteritidis* empleada con las delecciones, por ejemplo, en el gen WaaL podría no funcionar para incluir en ella un casete del gen que codifica CAP de PCV2, debido a las delecciones ya presentes en la cepa, y no sería fácilmente deducible a partir de D1 y D2, desarrollar un proceso para incorporar el gen que codifica CAP de PCV2, simplemente cambiando el gen que codifica fibra AVA1 en un vehículo transgénico de la *Salmonella enteritidis* 3934VacR ya que dicha persona comprende que la modificación y delecciones en la cepa de *Salmonella enteritidis* podrían afectar dichos cambios, por lo cual no estaría motivada a realizar dicho reemplazo a partir de lo enseñado en los documentos D1 y D2 ya que el documento D2 tan solo revela un proceso para generar una cepa mutante de una salmonella diferente. Así, al demostrar diferencias estructurales y funcionales sustanciales, un efecto técnico inesperado y la ausencia de sugerencia combinatoria en el estado de la técnica, la presente invención cumple con el requisito de nivel inventivo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

8. Formulación del problema técnico objetivo

Conforme a la metodología desarrollada por el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina para la evaluación del requisito de nivel inventivo —particularmente en los Procesos 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022— resulta necesario identificar de manera clara y estructurada el problema técnico objetivo que da origen a la invención, así como las limitaciones técnicas del estado del arte relevante. Esta formulación constituye una herramienta metodológica esencial para evitar juicios retrospectivos (*ex post facto*) y permite evaluar la actividad inventiva desde la perspectiva de una persona versada en la materia ante un desafío técnico concreto.

En el presente caso, la invención se enfrenta al siguiente problema técnico objetivo:

¿Cómo desarrollar una vacuna recombinante basada en *Salmonella enteritidis* que exprese el antígeno Cap del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), manteniendo un equilibrio óptimo entre inmunogenicidad y atenuación, garantizando la expresión superficial estable del antígeno y la seguridad del vector, sin comprometer la respuesta inmune protectora?

Este problema no ha sido ni planteado ni resuelto en el estado de la técnica citado por esa Dirección.

El documento D1 (WO2018231078A2) describe una cepa *Salmonella enteritidis* delecionada en el gen *waaL*, pero dirigida a la expresión del antígeno fibra AVA-1 del adenovirus aviar tipo 1, sin contemplar la inclusión del antígeno Cap de PCV2 ni el uso de delecciones múltiples ($\Delta XII \Delta rpoS \Delta waaL$) para equilibrar seguridad e inmunogenicidad. D1 no enseña ni sugiere la fusión del antígeno con *ClyA* ni su anclaje superficial mediante un *linker* definido, por lo que no aborda el



reto técnico de lograr una expresión estable y externamente expuesta del antígeno viral en una cepa bacteriana segura.

Por su parte, D2 ("*Oral vaccination with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing Cap protein of PCV2 and its immunogenicity in mouse models*") emplea *S. Typhimurium* X4550 transformada con un plásmido recombinante que codifica la proteína Cap, pero su expresión es exclusivamente intracelular y dependiente de un vector plasmídico, sin integración cromosómica ni control de estabilidad genética. Además, el documento no propone estrategias para la localización superficial del antígeno ni combina delecciones múltiples dirigidas que permitan balancear inmunogenicidad y atenuación.

Ambos documentos, por tanto, fallan en identificar el problema técnico real que enfrenta la presente invención: la necesidad de obtener una vacuna bacteriana recombinante con expresión superficial estable del antígeno Cap, capaz de inducir una respuesta inmunitaria eficaz y segura mediante una cepa multideleccionada genéticamente estable.

La formulación de este problema técnico objetivo excede las enseñanzas del estado del arte y exige una solución innovadora que articule de forma sinérgica:

- a) una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934VacR Δ XII Δ rpoS Δ waaL, genéticamente atenuada pero inmunológicamente competente;
- b) un casete de expresión <terminator-Pr-RBS-ClyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> que dirija la expresión del antígeno Cap a la superficie bacteriana mediante un *linker* estructural (GGSGGGGS); y
- c) una integración cromosómica controlada que garantice estabilidad genética y seguridad biológica del vector.

La solución técnica reivindicada responde precisamente a este desafío mediante la combinación funcional de estos tres componentes, logrando un resultado técnico inesperado: una vacuna bacteriana segura, estable y con alta inmunogenicidad frente al PCV2. Tal resultado no se deriva de manera evidente del estado del arte, lo que refuerza la presencia del nivel inventivo conforme al artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

- 8.1 En atención al señalamiento formulado por la Oficina respecto a la presunta falta de nivel inventivo de la invención reivindicada, procede aclarar que la solución técnica propuesta sí cumple con este requisito, conforme al artículo 18 de la Decisión 486, por cuanto no resulta evidente ni obvia para una persona versada en la materia a partir de los documentos D1 (WO2018231078A2) y D2 (Oral vaccination with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing Cap protein of PCV2), ya sea considerados de manera independiente o en una hipotética combinación.

A diferencia del análisis de novedad (que debe realizarse de forma individualizada para cada documento del estado del arte), en el examen de nivel inventivo es posible considerar una combinación razonada de documentos solo si existe una motivación técnica explícita, clara y funcional que justifique dicha combinación desde la perspectiva de una persona versada en la materia. Sin embargo, la simple posibilidad de agregar elementos conocidos no basta: la evaluación debe demostrar que la solución reivindicada se deriva de forma evidente y no creativa del estado del arte combinado.



El Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en sus decisiones 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022, ha establecido que el análisis del nivel inventivo debe partir de una valoración objetiva del estado de la técnica más cercano, identificando las diferencias técnicas relevantes y determinando si una persona del oficio, con los conocimientos disponibles al momento de la invención, habría estado motivada a combinar las enseñanzas de distintos documentos para resolver el mismo problema técnico. En ausencia de una motivación técnica razonable, toda combinación de documentos constituye un ejercicio retrospectivo (*ex post facto*) contrario al principio de objetividad que rige la evaluación del nivel inventivo.

Asimismo, el Tribunal ha precisado que el carácter no evidente de una invención radica en que la solución propuesta no puede ser deducida lógicamente por un técnico en la materia, aun cuando esté compuesta por elementos conocidos, y que el examen debe realizarse situando al experto en el contexto técnico existente al momento de la invención, evitando cualquier análisis apoyado en el conocimiento posterior de la solución.

En el caso presente, la invención propone una solución técnica específica al problema biotecnológico de obtener una vacuna recombinante segura, estable y altamente inmunogénica frente al circovirus porcino tipo 2 (PCV2), utilizando una cepa atenuada de *Salmonella enteritidis* como vector bacteriano. Esta solución se logra mediante una configuración genética particular que integra:

- a) una cepa *Salmonella enteritidis* 3934VacR Δ XII Δ rpoS Δ waaL, genéticamente atenuada pero inmunológicamente competente;
- b) un casete de expresión <terminator-Pr-RBS-ClyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator>, diseñado para dirigir la expresión superficial del antígeno Cap mediante un *linker* (GGGSGGGS) que asegura su correcta exposición en la membrana bacteriana; y
- c) un proceso de recombinación cromosómica estable que garantiza la permanencia y estabilidad genética del gen insertado, reduciendo el riesgo de pérdida de la expresión heteróloga.

Ninguno de los documentos citados, ni su eventual combinación, sugiere o motivaría técnica ni funcionalmente esta configuración:

D1 enseña la expresión de un antígeno heterólogo (fibra AVA-1) en *S. enteritidis* Δ waaL, pero no contempla la sustitución por el antígeno Cap de PCV2, ni la integración cromosómica de un casete fusionado con *ClyA* para expresión superficial.

D2, por su parte, emplea *S. Typhimurium* X4550 con expresión intracelular plasmídica del antígeno Cap, sin delecciones múltiples ni estrategias de atenuación genética controlada.

El experto en la materia no habría encontrado en ninguno de estos documentos una motivación técnica ni una expectativa razonable de éxito para combinar sus enseñanzas. La idea de integrar el antígeno Cap a un sistema de expresión superficial en una cepa multidelecionada de *S. enteritidis*, y adicionalmente fijarlo cromosómicamente para garantizar estabilidad y seguridad, no se deriva de forma evidente del estado del arte, sino que constituye una solución técnica innovadora y no sugerida.



8.2 Incompatibilidad funcional y de propósito entre D1 y D2

Uno de los elementos más determinantes para descartar la combinación de los documentos D1 y D2 como base para cuestionar el nivel inventivo de la presente invención es la divergencia técnica y funcional profunda entre los fines específicos que cada uno persigue, pese a que, de forma superficial, ambos se relacionen con vacunas recombinantes basadas en *Salmonella*.

En efecto, D1 (WO2018231078A2) se orienta al desarrollo de una cepa *Salmonella enteritidis* $\Delta waaL$ utilizada como vector bacteriano para la expresión del antígeno fibra AVA-1 del adenovirus aviar tipo 1. Su objetivo principal es conferir inmunidad frente a infecciones aviares mediante la exposición de una proteína estructural distinta, sin relación con el circovirus porcino tipo 2 (PCV2). El documento se centra en la delección única del gen *waaL* para inducir un fenotipo rugoso y facilitar la exposición de antígenos en la membrana externa, pero no contempla delecciones múltiples, integración cromosómica, ni estrategias de balance inmunogénico, limitándose a describir una vacuna aviar basada en un antígeno diferente y un propósito inmunológico ajeno al porcino.

Por su parte, D2 (“*Oral vaccination with attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing Cap protein of PCV2 and its immunogenicity in mouse models*”) se inscribe en el ámbito de las vacunas recombinantes contra PCV2, pero emplea una cepa *S. Typhimurium* X4550 portadora del plásmido pYA3341-Cap, en la cual la expresión del antígeno es intracelular y plasmídica, sin localización superficial ni integración estable. Su finalidad es demostrar la capacidad del vector para inducir anticuerpos frente a PCV2 en modelos murinos, no optimizar la estabilidad genética ni la seguridad del vector bacteriano.

Aunque ambos documentos pertenecen al campo general de las vacunas recombinantes basadas en *Salmonella*, las necesidades técnicas que cada uno aborda son esencialmente distintas. D1 busca exponer una proteína heteróloga aviar en *S. enteritidis* mediante una delección única; D2 pretende inducir respuesta inmunitaria frente a PCV2 usando *S. Typhimurium* con expresión plasmídica interna. La combinación de sus enseñanzas exigiría integrar dos sistemas con propósitos, especies bacterianas, genes objetivo y mecanismos de expresión completamente diferentes.

Desde la perspectiva de una persona versada en biotecnología vacunal, no existiría motivación técnica ni funcional razonable para incorporar los mecanismos de expresión plasmídica intracelular de D2 dentro de la arquitectura cromosómica y delecionada de D1, o viceversa. Hacerlo implicaría:

- Rediseñar completamente el vector bacteriano, sustituyendo la especie y el sistema genético base (*Typhimurium* → *Enteritidis*);
- Modificar el casete de expresión y su control regulatorio para adaptarlo a un entorno cromosómico estable;
- Reestructurar el propósito inmunológico, pasando de un antígeno aviar (fibra AVA-1) a uno porcino (Cap de PCV2); y
- Alterar el equilibrio de atenuación e inmunogenicidad mediante delecciones múltiples no sugeridas por ninguno de los documentos.

Esta incompatibilidad no se limita a una diferencia de componentes moleculares, sino que revela una inconmensurabilidad funcional entre ambas soluciones. Mientras D1 aborda la exposición de un antígeno aviar en un vector con delección única, D2 analiza la inmunogenicidad de un antígeno porcino en una cepa distinta, con un sistema plasmídico temporal. Su combinación exigiría una



reconstrucción técnica artificial, incompatible con el razonamiento lógico de un experto medio en biotecnología y contraria al principio de objetividad que orienta la evaluación del nivel inventivo.

El Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en las interpretaciones 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022, ha sido consistente al señalar que no puede considerarse evidente una invención que combine documentos cuyos contenidos técnicos pertenecen a ámbitos diferentes y persiguen finalidades no coincidentes, dado que tal combinación carece de una motivación técnica razonable y constituye un ejercicio retrospectivo incompatible con el análisis objetivo exigido por el artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, no resulta jurídicamente válido suponer que un técnico en la materia, enfrentado al problema técnico resuelto por la presente invención —esto es, desarrollar una vacuna recombinante segura, estable y altamente inmunogénica frente al PCV2 mediante una cepa multideleccionada de *Salmonella enteritidis* con expresión superficial del antígeno Cap—, encontraría sugerencias útiles o compatibles en los documentos D1 o D2.

8.3. Ausencia de motivación técnica para introducir una solución modular y desmontable

Más allá de la evidente incompatibilidad funcional entre los documentos D1 y D2, también debe destacarse la ausencia total de motivación técnica que pudiera llevar a una persona versada en la materia a combinar sus enseñanzas.

El análisis del nivel inventivo, conforme a los criterios jurisprudenciales del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina (Procesos 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022), exige identificar si un técnico medio habría tenido una razón técnica objetiva para integrar características de diferentes documentos con el fin de resolver un mismo problema. Esta motivación debe surgir de una relación lógica y directa entre los objetivos, los mecanismos y los resultados esperados de las enseñanzas previas.

En el caso que nos ocupa, ninguno de los documentos D1 o D2 sugiere o insinúa la necesidad de mejorar el equilibrio entre inmunogenicidad y atenuación, ni plantea problema alguno relacionado con la estabilidad genética o la expresión superficial de antígenos heterólogos. D1 se limita a describir una cepa de *S. enteritidis* modificada para expresar un antígeno aviar, mientras que D2 explora una formulación vacunal experimental basada en *S. Typhimurium* con expresión plasmídica transitoria del antígeno Cap.

Por tanto, no existe motivación técnica previa que lleve al experto a transferir el gen Cap del PCV2 del sistema plasmídico de D2 al entorno cromosómico y delecionado de D1. Una decisión así implicaría asumir que la fusión de contextos biológicos y genéticos tan distintos podría conservar funcionalidad inmunogénica, sin fundamento alguno en la literatura citada.

Además, la técnica conocida no proporciona indicios de que la expresión superficial mediada por ClyA sea aplicable a antígenos virales del tipo Cap, ni que una deleción adicional en *waaL* mejore la inmunogenicidad de una cepa multideleccionada. La motivación para realizar tales cambios proviene únicamente del conocimiento aportado por la presente invención, lo cual confirma que cualquier combinación hipotética entre D1 y D2 sería el resultado de un razonamiento retrospectivo y no de una expectativa técnica razonable.



8.4 Ausencia de características triviales o evidentes en la configuración técnica reivindicada

Con relación al requisito de nivel inventivo previsto en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, debe precisarse que la invención reivindicada no incorpora elementos técnicos triviales, obvios ni derivados de manera directa del estado del arte, ya sea por separado o en combinación.

La memoria descriptiva demuestra una solución biotecnológica compleja y articulada, donde cada componente cumple una función técnica específica dentro del sistema vacunal. La delección combinada de los genes *XII*, *rpoS* y *waaL* en la cepa *Salmonella enteritidis* 3934VacR no constituye una simple repetición de técnicas de atenuación conocidas: se trata de una estrategia de equilibrio inmunológico diseñada para mantener viabilidad bacteriana, reducir reactogenicidad y conservar la capacidad de inducción de respuesta inmune.

De igual forma, el casete de expresión <terminator-Pr-RBS-ClyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator>, fusionado mediante el *linker* GGGSGGGS, no responde a una agregación arbitraria de secuencias conocidas, sino a una configuración estructural que orienta la expresión del antígeno Cap hacia la superficie bacteriana, optimizando su exposición inmunológica y aumentando la respuesta humoral frente al PCV2.

La integración cromosómica estable del casete, además, elimina los riesgos de pérdida de plásmidos o inestabilidad genética propios de los sistemas plasmídicos descritos en D2, garantizando la persistencia del antígeno sin comprometer la seguridad del vector. Este diseño integral refleja una interacción sinérgica de los elementos genéticos, donde cada componente —delecciones, fusión, *linker* e integración— contribuye de manera complementaria a resolver el problema técnico planteado.

El Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en los procesos mencionados, ha reiterado que no pueden considerarse obvias las configuraciones técnicas que integran elementos conocidos de manera funcionalmente nueva o con interacción distinta a la prevista en el estado del arte. La invención aquí analizada cumple precisamente con este criterio: no hay yuxtaposición de medios conocidos, sino una reorganización innovadora de componentes genéticos que genera un efecto técnico no anticipable.

Por tanto, la configuración técnica reivindicada se aparta de toda trivialidad, representa una construcción biotecnológica coherente y no deriva de manera evidente del conocimiento previo, satisfaciendo así el requisito de nivel inventivo previsto en el artículo 18 de la Decisión 486.

8.5. Efecto técnico distinto y no previsible

Finalmente, la combinación de características técnicas que conforman la presente invención produce un efecto técnico distinto y no previsible para una persona versada en la materia. La invención no consiste en la mera suma de delecciones o de elementos de expresión génica, sino en una arquitectura biotecnológica funcionalmente integrada que equilibra seguridad, estabilidad genética e inmunogenicidad, objetivos que históricamente han resultado antagónicos en el desarrollo de vacunas bacterianas recombinantes.

En particular, la invención logra:



- a) Una atenuación controlada y reproducible, gracias a la delección simultánea de *XII*, *rpoS* y *waaL*, que reduce virulencia sin eliminar la capacidad de colonización y estimulación inmune;
- b) Una expresión superficial dirigida del antígeno Cap mediante la fusión *ClyA-Cap*, que favorece su reconocimiento por el sistema inmunitario y mejora la presentación antigénica;
- c) Una estabilidad genética prolongada, derivada de la integración cromosómica del casete, que evita la pérdida de expresión observada en sistemas plasmídicos transitorios; y
- d) Una respuesta inmunológica más efectiva y segura, validada experimentalmente en los ejemplos de la memoria descriptiva, donde se demuestra la obtención de títulos de anticuerpos superiores y una reactividad mínima.

Estos efectos no pueden deducirse directamente de los resultados individuales descritos en D1 o D2, ni siquiera en una lectura combinada. D1 se limita a una cepa aviar con delección única y antígeno heterólogo no relacionado; D2 describe una expresión intracelular dependiente de plásmido sin control de estabilidad ni balance inmunogénico. Ninguno de los dos documentos sugiere que una cepa *S. enteritidis* multideleccionada, portadora de un casete fusionado *ClyA-Cap* e integrado cromosómicamente, pudiera generar simultáneamente estabilidad, seguridad y elevada inmunogenicidad.

Los resultados alcanzados constituyen, por tanto, un efecto técnico sinérgico e inesperado, derivado de la interacción entre las modificaciones genéticas y la estrategia de expresión superficial. Conforme a la interpretación reiterada del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina en los procesos 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022, existe nivel inventivo cuando la combinación de elementos conocidos produce un efecto técnico distinto al previsible, y no puede considerarse una simple variación o agregación del estado del arte.

9. Conclusiones

En virtud de los argumentos técnicos, normativos y jurisprudenciales previamente expuestos, y conforme a lo establecido en los artículos 18, 28 y 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, esta parte considera que la solicitud de patente identificada bajo el expediente NC2022/0008650 cumple con todos los requisitos sustantivos de patentabilidad exigidos por la normativa andina vigente, particularmente en lo que respecta al nivel inventivo y a la suficiencia en la divulgación de la invención.

En relación con el nivel inventivo, se ha demostrado que la solución técnica reivindicada —una vacuna recombinante basada en *Salmonella enteritidis* 3934VacR Δ XII Δ rpoS Δ waaL, que expresa el antígeno Cap del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) mediante un casete de expresión <terminator-Pr-RBS-ClyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> integrado cromosómicamente— no resulta evidente para una persona versada en la materia a partir de los documentos D1 (WO2018231078A2) y D2 (Oral vaccination with attenuated *S. Typhimurium* expressing Cap protein of PCV2), considerados individualmente o en combinación.

Como se ha sustentado en los apartados anteriores, D1 describe una cepa *S. enteritidis* Δ waaL dirigida a expresar un antígeno aviar (fibra AVA-1) y no contempla ni la integración cromosómica de un casete heterólogo ni el equilibrio inmunogénico derivado de múltiples delecciones. D2, por su parte, se limita a la expresión intracelular plasmídica del antígeno Cap en *S. Typhimurium*, sin considerar estrategias de expresión superficial ni estabilidad genética. Ninguno de los documentos, ni su lectura conjunta, sugiere, anticipa o motiva una solución que combine de forma sinérgica:



- a) una cepa bacteriana multideleccionada ($\Delta XII \Delta rpoS \Delta waaL$) que mantenga inmunogenicidad y seguridad;
- b) un casete de expresión fusionado *ClyA-Cap* con *linker* estructural (GGGSGGGS) para expresión superficial; y
- c) una integración cromosómica estable que preserve la expresión del antígeno y reduzca la pérdida de plásmidos.

La jurisprudencia reiterada del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en los procesos 141-IP-2014, 589-IP-2016, 371-IP-2021 y 475-IP-2022, ha sido enfática al establecer que no puede negarse el carácter inventivo a una invención cuya solución técnica no se deriva de manera lógica, funcional ni motivada del estado del arte, aun cuando este contenga elementos parciales similares. En el presente caso, la invención no se limita a emplear elementos conocidos, sino que propone una integración genética y funcional novedosa que da lugar a un efecto técnico distinto y no previsible, consistente en una vacuna segura, estable y de alta inmunogenicidad frente al PCV2.

Por todo lo anterior, se solicita respetuosamente a esa Dirección que, una vez valoradas las modificaciones introducidas y los fundamentos aquí desarrollados, proceda a continuar con el trámite de la solicitud, reconociendo que la invención cumple con los requisitos de novedad, nivel inventivo y suficiencia en la divulgación, conforme a lo dispuesto en la Decisión 486 de la Comunidad Andina.

Atentamente,

Fredy S. Merino

C.C. 1043177293

T.P. 268742 del C.S. de la J.

Anexos:

1. Copia del artículo titulado "Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators" de Summer R. et al 2016.
2. Copia del artículo titulado "Enteric Pathogens as vaccine vectors for Foreign antigen delivery" de Kottom C et al, 2004.
3. Nuevo pliego al pliego reivindicatorio y enmiendas a la memoria descriptiva.

**VACUNA RECOMBINANTE PORCINA DE SALMONELLA ENTERITIDIS QUE
COMPRENDE LA PROTEINA CAP DE CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)**

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se refiere al sector de la sanidad animal, más en concreto, la invención se refiere al desarrollo de una cepa de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis (Salmonella Enteritidis o SE) atenuada y rugosa la cual ha sido modificada y aislada para expresar una proteína de un virus porcino. Es decir, esta cepa mutante recombinante aislada de *Salmonella entérica* es capaz de expresar el xeno-antígeno de
10 la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 (Porcine Circovirus type 2 (PCV2)).

Se incluye además la utilización de esta cepa mutante recombinante aislada como vector vacunal es decir como un vector de inmunogenización frente a circovirus porcino tipo 2, vía un proceso de inserción e integración de los genes que codifican el antígeno
15 de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2. El vector de SE que se emplea ha sido genéticamente modificado para funcionar como vehículo de expresión de los genes inmunodominantes del antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2, con el fin último de estimular una respuesta inmune eficaz y duradera contra circovirus porcino tipo 2. La cepa mutante recombinante aislada
20 generada es totalmente segura debido a que está exenta de los doce genes que codifican las proteínas de la ruta de señalización del mensajero secundario GMP-di-cíclico, el factor sigma RpoS y la proteína WaaL. Por lo anteriormente expuesto, esta cepa mutante recombinante aislada se propone como una nueva composición inmunogénica recombinante eficaz e inocua contra circovirus porcino, idónea para
25 inmunogenizar poblaciones porcinas.

Todos los componentes de esta composición inmunogénica recombinante han sido específicamente diseñados y desarrollados con los tres factores prioritarios sucesivos de eficacia, seguridad y costos.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (PMWS) esta asociado a la infección por circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Los principales signos clínicos se manifiestan a través de un retraso en el crecimiento, la cual viene acompañada de una
10 palidez frecuente, dificultad para respirar y en menor medida de diarrea y/o ictericia, principalmente en cerdos de entre 2 y 4 meses de edad, etapa tardía del destete y temprana de engorda (Harding 1998, Segalés y Domingo 2002, Harding 2004). Afecta principalmente a 4-30% de los animales, de los cuales la mortalidad puede alcanzar el 70%-80% causando importantes pérdidas económicas a la industria porcina (Segalés y
15 Domingo 2002). Otra manifestación clínica de los cerdos infectados con PCV2 son las fallas en la capacidad reproductiva, lo cual ocasiona abortos durante la mitad y final de la gestación o lechones nacidos muertos, los cuales muestran miocarditis necrotizante y presencia de PCV2 en tejido cardíaco (West y col 1999, Mikami y col 2005).

Recientemente, las técnicas de manipulación genética, sumadas a la disponibilidad de
20 genomas bacterianos, el mejor conocimiento de los mecanismos de patogénesis y la respuesta inmune han permitido nuevas aproximaciones para el desarrollo de cepas bacterianas atenuadas, es decir, cepas mutadas aisladas como vectores de genes heterólogos. Así, bacterias enteropatógenicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* o *Bordetella*
25 *pertrusis* han sido empleadas como vectores efectivos como composiciones

inmunogénicas (Da Silva, et al, 2014). De todas ellas, la que ha dado lugar a resultados más prometedores es *Salmonella* spp (Li Y, et al, 2008); Así, vectores de inmunogenización son basados en cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas han sido empleados para generar una respuesta inmune protectora contra patógenos virales, bacterianos y protozoarios y vehiculizar tratamientos anti-cancerígenos. (Zhang XL, Jeza VT y Pan Q, 2008)

Las composiciones inmunogénicas comerciales contra PCV2 que se encuentran disponibles en el mercado difieren principalmente en el tipo de antígeno y adyuvante, animales (cerdas y/o lechones) y dosis (una o dos) (Chae 2012). Circovac® la composición inmunogénica comercial de Merial fue introducida en 2006, dicha composición inmunogénica está compuesta por virus inactivado y contiene aceite de parafina ligero que actúa como adyuvante; inicialmente se utilizó sólo en cerdas (2 ml) y posteriormente fue aplicada a lechones (0,5 ml) (Fraile y col 2012). El principio de la inmunogenización de cerdas es conferir inmunidad pasiva para proteger a los lechones recién nacidos contra la exposición a PCV2, mientras estos son altamente susceptibles; en contraste, la inmunogenización de lechones induce inmunidad activa contra enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVD) (Opriessnig y col 2010, Beach y Meng 2012, Chae 2012).

Considerando los aspectos mencionados anteriormente, existe un gran sustento en el éxito que ofrecería a la industria porcina el desarrollo de una composición inmunogénica recombinante contra circovirus porcino tipo 2 empleando como vector una cepa de SE atenuada. Estas ventajas se pueden resumir en: (1) atenuación severa gracias a varios procesos de mutagénesis dirigida mediante un mecanismo de intercambio alélico que evita la reversión y convierten a la cepa resultante en un vector inmunogenizante totalmente seguro; (2) la cantidad de expresión del antígeno CAP2 puede ser regulada mediante manipulación genética; (3) puede administrarse por rutas de inoculación

intradermal y oral; (4) estimula fuertemente el sistema inmune innato y adaptativo; y, (5) brindaría a su vez protección contra SE. Si bien el desarrollo de composiciones inmunogénicas empleando vectores bacterianos ha sido y es actualmente objeto de numerosas investigaciones, hasta la fecha no existen composiciones inmunogénicas comerciales con licencia basados en SE. Por todo ello, el desarrollo de esta composición
5 inmunogénica recombinante marcaría un buen precedente en este ámbito de investigación y desarrollo en la industria porcina y no tendría competencia en mercado nacional e internacional.

10 El estado del arte más relacionado con la presente invención se ha realizado teniendo en cuenta la equivalencia entre el término vacuna y el término composición inmunogénica y así mismo entendiéndose que una cepa atenuada corresponde a una cepa mutante recombinante aislada, obteniendo los siguientes documentos:

**Documento de Patente CN101838627A “RECOMBINATION SALMONELLA
15 CHOLERAESUIS AND BIVALENT GENETIC ENGINEERING VACCINE AND PREPARATION METHOD”**

Se refiere a una *Salmonella choleraesuis* recombinante, una vacuna de ingeniería genética bivalente y un método de preparación y aplicación de la recombinación *Salmonella choleraesuis*, en donde dicha *Salmonella choleraesuis* no comprende un
20 marcador de resistencia y expresa una de las principales proteínas antigénicas del circovirus porcino 2, la proteína de la cápside (CAP). El número de depósito de microorganismo para dicha *Salmonella choleraesuis* C501 (pYA-delta 410RF2), la cual no comprende el marcador de resistencia y que expresa los principales sitios de antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 es CCTCC
25 M209314. Dicha *Salmonella choleraesuis* elimina los genes *asd* que son necesarios

para el crecimiento de la *Salmonella choleraesuis* y comprende un plásmido que puede expresar los genes *asd* de los sitios de antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 en dicha *Salmonella choleraesuis*. La invención describe el método y la aplicación para preparar *Salmonella choleraesuis* y la vacuna de ingeniería genética bivalente de circovirus porcino tipo 2 utilizando dicha *Salmonella choleraesuis* recombinante. La vacuna bivalente de ingeniería genética de la invención puede estimular a un cerdo para generar una respuesta inmune protectora que genera inmunidad a *Salmonella choleraesuis* y al circovirus porcino tipo 2 y prevenir eficazmente la infección de *Salmonella choleraesuis* y de circovirus porcino 2. La cepa recombinante de *S. choleraesuis* C501 / pYA-Δ41ORF2 que expresa el sitio antigénico principal del circovirus porcino tipo 2 sin marcador de resistencia, la cepa genéticamente modificada C501 / pYAΔ41ORF2 se deriva de una cepa que tiene más de 50 años en China. *Salmonella choleraesuis* comercializada anteriormente es la cepa de vacuna atenuada C500. La cepa recombinante de *S. choleraesuis* C501 / pYA-Δ41ORF2 carece del gen *asd* en el genoma de la cepa C500, y se añade el plásmido pYA-Δ41ORF2 que contiene el gen del sitio antigénico de la proteína Cap de circovirus tipo 2 porcino. La estabilidad del plásmido pYA-Δ41 ORF2. La expresión estable del gen del sitio antigénico de la proteína Cap en la cepa recombinante tiene un buen efecto inmunoprotector contra el circovirus porcino tipo 2. Sin embargo, dicho documento no revela el uso de una cepa de *Salmonella entérica* serovar enteritidis de tipo rugosa que expresa el gen de CAP.

**Documento de patente CN101954074A “RECOMBINANT ATTENUATED
SALMONELLA TYPHIMURIUM VECTOR VACCINE EXPRESSING PCV-2
IMMUNOGENIC GENE AND PREPARATION METHOD THEREOF”**

Describe una vacuna de vector vivo de *Salmonella typhimurium* atenuada recombinante oral, así como un método de preparación y aplicación de la misma, particularmente en relación con una *Salmonella typhimurium* atenuada oral. *Salmonella typhimurium* atenuada recombinante tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:1, de
5 dicho documento de patente y puede expresar la proteína de la cápside PCV-2 ORF2. La *Salmonella typhimurium* atenuada se inocula en un medio de cultivo LB para cultivo durante 18 horas; y la concentración de la *Salmonella typhimurium* atenuada se regula a 10¹⁰CFU / ml para preparar una vacuna de vector vivo de *Salmonella typhimurium* atenuada oral segura y eficaz utilizada para prevenir enfermedades por circovirus
10 porcino.

Publicación en Revista Científica de Latasa et. al, 2016: realizaron el siguiente estudio con el objetivo de construir una nueva vacuna viva atenuada de *Salmonella*: en primer lugar, se analizó el impacto de la ausencia de di-GMP cíclico (c-di-GMP) en la
15 virulencia de *Salmonella*. Como ya se ha mencionado previamente, el C-di-GMP es un mensajero secundario intracelular que controla una amplia gama de procesos bacterianos, incluyendo la formación de biocapa (biofilm) y la síntesis de factores de virulencia, además de modular la respuesta inmune innata del huésped a través de los receptores STING. Los resultados descritos en este artículo mostraron que un mutante
20 múltiple de *Salmonella*, de cuyo genoma se ha eliminado los doce genes que codifican proteínas diguanilato ciclasa y que, como consecuencia, no puede sintetizar c-di-GMP, presenta una atenuación moderada en un modelo de infección murino sistémico. Una mutación adicional controlada (a diferencia de la cepa *S. Enteritidis* 3934ΔXII* en la que la pérdida de este factor sigma había sido resultado de una contraselección natural) del
25 gen *rpoS* dio como resultado un efecto atenuante sinérgico, que condujo a una cepa altamente atenuada, denominada ΔXIII. Esta cepa es lo suficientemente inmunogénica

para proteger a los ratones contra un ataque letal oral de una cepa virulenta de *S. typhimurium*. La inmunogenicidad de Δ XIII depende tanto de la activación de la respuesta humoral como celular y se caracteriza por la producción de anticuerpos opsonizantes y la inducción de niveles significativos de IFN- γ , TNF-A, IL-2, IL-17 e IL-10. Δ XIII es capaz de formar biocapas y no sobrevive bajo condiciones de desecación, lo que indica que podría eliminarse fácilmente del medio ambiente. Además, Δ XIII tiene propiedades DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), que permiten la diferenciación de animales infectados y vacunados. Con el fin de facilitar la terminología, la cepa Δ XII se conoce también como 3934vac.

10

Documento de Patente US2010/0136060A1 “METHODS OF REDUCING PORCINE CIRCOVIRUS-ASSOCIATED DISEASE OUTBREAKS” se refiere al uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno de salmonella para el tratamiento de varias manifestaciones clínicas (enfermedades). Preferiblemente, las manifestaciones clínicas están asociadas con una infección por PCV2, incluso más preferiblemente por PCVAD. El uso se refiere a un método que comprende los pasos de administrar la composición a un animal que lo necesita, preferiblemente antes de la exposición a la enfermedad. La administración del antígeno de salmonella, preferiblemente una vacuna de salmonella disminuye la incidencia y reduce la gravedad de PCVAD. Sin embargo, no revela el uso de una cepa de Salmonella entérica serovar enteritidis de tipo rugosa que expresa el gen de CAP.

Documento de Patente WO/2018/231078 “OBTENCIÓN DE UNA SALMONELA ENTERITIDIS TIPO RUGOSA Y SUS MODIFICACIONES GENÉTICAS PARA USO COMO VACUNA AVIAR”.

La presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac a la cual se le ha delecionado el gen waaL para obtener un fenotipo rugoso (3934vac DwaaL), el procedimiento de obtención y los oligos utilizados; con el objetivo de reducir la toxicidad y mantener la inmunogenicidad para su aplicación como vacuna. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac DwaaL, es decir de tipo rugosa, la cual ha sido modificada para expresar el gen de la fibra del adenovirus aviar tipo-I, además el procedimiento para la obtención de una cepa de *Salmonella enteritidis* 3034 vac DwaaL que expresa un gen de fibra de Ava-I, la invención comprende también el desarrollo de una nueva vacuna aviar, viva, recombinante, eficaz e inocua contra el virus AvA-I desarrollada vía un proceso de inserción e integración de genes de fibra Ava-I en el cromosoma de una cepa atenuada y no patogénica de la bacteria *Salmonella enteritidis*.

Publicación en Revista Científica Veterinary Microbiology, 2012 “ORAL VACCINATION WITH ATTENUATED SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM EXPRESSING CAP PROTEIN OF PCV2 AND ITS IMMUNOGENICITY IN MOUSE AND SWINE MODELS”

se refiere a una *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) atenuada como vehículo transgénico para el desarrollo de vacunas orales contra el circovirus porcino tipo 2 (PCV2). El gen que codifica Cap de PCV2 se amplificó por PCR y se clonó en el vector de expresión pYA3341. El plásmido recombinante pYA3341-Cap se transformó en *S. typhimurium* X4550 atenuado. Los ratones BALB / c se inocularon por vía oral con varias dosis de *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuado. La bacteria era segura para los ratones a una dosis de 2×10^9 ufc y finalmente se eliminó en el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos a las 4 semanas después de la inmunización. El análisis de citometría de flujo mostró que el porcentaje de células T CD4 + y la relación

CD4 + / CD8 + aumentaron significativamente en ratones inmunizados con *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuado. Las pruebas de vacuna en cerdos mostraron que la inmunización oral con *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuada podría provocar títulos de anticuerpos Cap significativamente más altos en los cerdos

5 tratados que en los grupos de control. La prueba de neutralización del virus mostró que el suero de los cerdos tratados con *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuado tenía niveles significativos de actividades de neutralización. Las respuestas proliferativas de linfocitos porcinos indicaron que *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuada podría inducir una respuesta inmune celular obvia. Un estudio de desafío in

10 vivo mostró que los cerdos tratados con *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuado tenían significativamente menos lesiones y viremia asociadas a PCV2 que los grupos de control. Los resultados indicaron que *S. typhimurium* X4550 / pYA3341-Cap atenuado puede ser una vacuna potencial contra las infecciones por PCV2. Además, *S. typhimurium* x4550 carece de un gen de aspartato β -semialdehído deshidrogenasa

15 funcional y, por lo tanto, no puede sintetizar una pared celular a menos que el ácido diaminopimélico, el producto de la reacción catalizada por el aspartato β -semialdehído deshidrogenasa, se proporcione en el medio. Sin embargo, *S. typhimurium* x4550 puede crecer en ausencia de ácido diaminopimélico si se complementa con el plásmido pYA3149, que contiene un gen de aspartato β -semialdehído deshidrogenasa funcional.

20 Y le faltan dos genes de virulencia: mutaciones que afectan la transcripción y la regulación cíclica de AMP-CRP del gen adenilato ciclasa (*cya*) de *Salmonella typhimurium*.

No existe registros de que alguna cepa de *Salmonella typhi* haya sido convertida en fenotipo rugoso y por tanto una cepa vacunal de la misma no se podría discriminar

25 fenotípicamente entre cepas virulentas y no virulentas, más que por PCR, a diferencia

de la *Salmonella* Enteritidis generada en la presente invención que si permite emplear técnicas microbiológicas estándares para su discriminación.

Por tanto, el problema que pretende resolver la presente invención es obtener una composición inmunogénica recombinante a partir de una cepa de *Salmonella entérica*
5 serovar enteritidis, la cual tiene un fenotipo rugoso y que expresa el xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 (Porcine Circovirus type 2). Dicha cepa puede ser usada para producir una composición inmunogénica recombinante porcina.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere una cepa mutante recombinante aislada de *Salmonella enteritidis* que expresa la proteína de circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en donde la mejor expresión se ha logrado cuando la inserción se encuentra en el plásmido en vez del cromosoma. Asimismo, se refiere a una composición inmunogénica recombinante que precisa de dicha cepa mutante recombinante aislada .

15 Un primer aspecto de la presente invención se refiere al desarrollo de una composición inmunogénica recombinante contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) para lo cual se construyó el *casete* <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos de 1038 y 849 pares de bases (pb). Se incluyó un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento cytolysis A (clyA) y el fragmento CAP.
20 Finalmente, el fragmento obtenido de 1929 pb fue subclonado en un plásmido de expresión, el cual se usó para transformar la cepa rugosa de *Salmonella enteritidis* 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waal (3934VacR) mediante electroporación. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en presencia de ampicilina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa mutante recombinante
25 aislada de *Salmonella enteritidis* 3934vac DwaaL, es decir de tipo rugosa, con número

de depósito CET 9332 o la cual ha sido mutada, mediante una modificación dirigida para expresar el gen que codifica CAP de PCV2 (circovirus porcino tipo 2) el cual ha sido optimizado para su correcta expresión, además el procedimiento para la obtención de una cepa mutante, recombinante y aislada de *Salmonella enteritidis* 3034 vac Dwaal

5 que expresa un gen que codifica CAP de PCV2, la invención comprende también el desarrollo de una nueva composición inmunogénica, recombinante, eficaz e inocua contra circovirus porcino tipo 2 desarrollada vía un proceso de inserción e integración de gen que codifica CAP de PCV2 en el plásmido de una cepa atenuada y no patogénica de la bacteria *Salmonella enteritidis*. La etapa de construcción del *casete* utiliza la PCR

10 solapante de los fragmentos de 1038 y 849 pb, además de uso de un linker entre el fragmento CAP y el fragmento ClyA. El fragmento solapante final de 1929 bp fue subclonado mediante recombinación de extremos homólogos en un plásmido específicamente diseñado para la inserción de secuencias en el locus attTn7.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la secuencia codificante optimizada de CAP de la cual se muestra tanto la secuencia de nucleótidos como la secuencia de aminoácidos. Para la expresión del antígeno PCV2 del circovirus porcino se ha diseñado y construido un “*casete*” de expresión que incluye:

15

- Región promotora (PR)
- Secuencia para la exportación a membrana del antígeno CAP del PCV2 virus (SEM)
- 20 • Linker
- Región de 6 residuos de histidina para la detección de la expresión (6XHis)
- Fragmento de la proteína CAP de 233 aminoácidos (virus PCV2). (SEQ ID NO:1)
- Región de 6 residuos de histidina para la detección de la expresión (6XHis)
- Terminador (TER)

En la siguiente tabla se muestran las secuencias utilizadas en el desarrollo de la cepa mutante, recombinante y aislada de *Salmonella enteritidis* que expresa el gen que codifica CAP de PCV2 (circovirus porcino tipo 2).

La secuencia de nucleótidos de CAP de circovirus porcino tipo 2 es SEQ ID NO: 1

5 La secuencia de aminoácidos de CAP de circovirus porcino tipo 2 es SEQ ID NO:2

Con el fin de integrar en el cromosoma y plásmido, un *casete* de expresión que permitiese la producción del antígeno CAP del circovirus porcino tipo 2 en la cepa de SE se realizó un abordaje por recombinación homóloga. En este caso, el plásmido contiene, a parte de las regiones flanqueantes de recombinación, un *casete* de expresión que queda integrado en el cromosoma. Este *casete* de expresión fue clonado en un plásmido integrativo que porta las regiones AB y CD de aproximadamente 500bp del gen Sb13 del profago ST64B. El clonaje se diseñó para que el *casete* de expresión del antígeno CAP del circovirus porcino tipo 2 quede entre ambos fragmentos del gen del profago defectivo. (La cepa de *Salmonella* que porta este plásmido se crece a 28°C en presencia de cloranfenicol 20 µg/ml). Una vez transformado el plásmido mediante electroporación, varios clones fueron sometidos a varios pases de crecimiento a 42°C (temperatura no permisiva de replicación del plásmido- se produce la integración del plásmido gracias a las regiones homólogas AB y CD adyacentes a waaL). Tras comprobar mediante PCR que el plásmido se había integrado en el cromosoma, se llevó a cabo la escisión o segunda recombinación a 28°C en ausencia de antibiótico y presencia de sacarosa. Tal y como se ha descrito anteriormente, este sistema de contraselección permite identificar los clones que han perdido en el plásmido. De forma alternativa se lograron aislar los clones que poseían el plásmido no integrado al genoma bacteriano. El último paso consiste en nuevo en seleccionar mediante PCR los clones en los que se ha producido la inserción del *casete* de expresión de la fibra en el gen sb13 del profago ST64B.

La cepa resultante, a la que se refiere esta invención, es una cepa mutante recombinante aislada de *Salmonella* Enteritidis modificada mediante una delección del gen *waal*, y presenta por tanto un fenotipo rugoso, y expresa un gen que codifican la proteína CAP del circovirus porcino tipo 2.

- 5 Para efectos de la presente invención, *Salmonella* enteritidis es abreviatura de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Para efectos de la presente invención la cepa SE3934-Cap ha sido depositada con el nombre SALVAC CIRCO en el depositario internacional de acuerdo con los lineamientos del tratado de BUDAPEST. Por tanto, a lo largo del documento técnico, dichas
10 denominaciones pueden ser intercambiables.

Asimismo, para la presente invención se debe considerar que PCR es la reacción en cadena de la polimerasa; y oligo es el cebador que se utiliza en la PCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

OBTENCION DE SALMONELLA ENTERITIDIS ATENUADA (SEA)

- 15 **Diseño y construcción de un sistema que permite la introducción de cualquier xenoantígeno de interés en el cromosoma de *Salmonella Enteritidis* (SE).**

Una composición inmunogénica viva o vector de inmunogenización debe ser seguro y eficaz, con un genotipo y fenotipo totalmente controlados, que eviten el riesgo de reversión a virulencia. Además, la cepa debe mantener un equilibrio entre el grado de
20 atenuación e inmunogenicidad, permaneciendo en el organismo del hospedador el tiempo suficiente para dar lugar a una respuesta inmune protectora frente a antígenos homólogos y/o heterólogos. En este caso, la cepa de *Salmonella enteritidis* porcina (SEA) generada presenta como características primordiales una drástica atenuación en cerdos. Además, la cepa SEA es incapaz de formar biocapas y tiene una supervivencia

muy reducida en el ambiente, evitando cualquier riesgo asociado al período en el que los animales inmunogenizados pudiesen excretar esta cepa. A diferencia de la mayoría de las composiciones inmunogénicas comerciales, su genotipo y fenotipo están totalmente controlados y no posee genes de resistencia a antibióticos. La inocuidad de bacterias vivas atenuadas ha sido verificada en otros modelos como la vacuna 9R, cuyos reportes descartan científicamente una potencial reversión a la forma virulenta original (Okamoto., et al 2010 Revista Brasileira de Ciencia Avícola).

Por tanto, la presente invención utiliza una cepa mutante recombinante aislada de *Salmonella enteritidis* 3934 (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT9332, a la cual, por técnicas de ingeniería genética, se le han delecionado los doce genes que codifican enzimas diguanilatociclasas, el gen *rpoS* y el gen *waaL*. Esta última mutación se realizó con el objetivo de obtener una cepa de inmunogenización de fenotipo rugoso (*Salmonella enteritidis* 3934vac DwaaL) que confiera protección en animales de crianza. Asimismo, otro aspecto de la presente invención comprende una cepa de inmunogenización de fenotipo rugoso que porta un casete de expresión para el antígeno CAP del circovirus porcino tipo 2 la cual confiera inmunidad contra circovirus porcino tipo 2 a una población de cerdos. Es decir, la cepa CECT-9932 ha sido modificada mediante la mutación, recombinación y aislamiento para expresar una proteína de un virus porcino por lo que es capaz de expresar el xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 (Porcine Circovirus type 2 (PCV2)).

GENERACIÓN DE MUTANTES RUGOSOS

Con el objetivo de reducir la toxicidad y mantener la inmunogenicidad de las cepas basadas en el fondo genético 3934vac, se procedió a un doble proceso de atenuación, es decir se le retiro 13 genes (Δ XIII) (*S. Enteritidis* strain, called Δ XII, carrying mutations

in the twelve genes encoding GGDEF domain proteins, and rpoS gene, Latasa 2016) y luego FARVET la hizo rugosa (más propensa al ataque inmune), con esto nos aseguramos que la reversión sea nula en cerdos.

La metodología empleada para la generación de los mutantes rugosos utiliza de manera
5 general los siguientes pasos:

- a) Construcción del vector integrativo pKO:waaL
- b) Integración del vector suicida pKO::waaL (primera recombinación)
- c) Excisión del vector integrativo pKO::waaL (segunda recombinación)
- d) Verificación de los mutantes por PCR

10 **GENERACION DE SALMONELLA ENTERITIDIS 3934VAC RUGOSA–PCV2**

1. Construcción del casete de expresión <PR-SEM-6XHis-PCV2-TT>:

Se ha utilizado la cepa rugosa mutante, recombinante y aislada y de Salmonella
15 Enteritidis 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waaL (3934vacR) como vehículo para la expresión del antígeno heterólogo CAP de la cápside del circovirus PCV2 (Porcine Circovirus Type 2).

Las cepas que se han obtenido finalmente han sido:

• S. Enteritidis 3934VacR pATT::clyA-CAP/PCV2-6His (Construcción en plásmido: “alto número de copias”). Dicha cepa mutada, recombinante y aislada ha sido nombrada
20 como SALVAC CIRCO y fue depositada en el Depositario internacional de acuerdo con los lineamientos del Tratado de Budapest con número de depósito CECT 30007.

• S. Enteritidis 3934VacR attTN7::clyA-CAP/PCV2-6His (Construcción en cromosoma: “bajo número de copias”).

Para la expresión del antígeno PCV2 del circovirus porcino se ha diseñado y construido
25 un casete de expresión que incluye:

- Región promotora (PR)
 - Secuencia para la exportación a membrana del antígeno CAP del PCV2 virus (SEM)
 - Linker
 - Región de 6 residuos de histidina para la detección de la expresión (6XHis)
- 5 • Fragmento de la proteína CAP de 233 aminoácidos (virus PCV2).
- Región de 6 residuos de histidina para la detección de la expresión (6XHis) • Terminador (TER).

La secuencia codificante (CDS) del antígeno CAP (699 bp) del circovirus porcino PCV2 se obtuvieron mediante “gene synthesis”. El “codon usage” de dicha secuencia fue optimizado para su expresión en Salmonella. Además, con el objetivo de facilitar la detección de la expresión mediante western blot, las secuencias del antígeno se incluyeron 6 residuos histidina en el extremo carboxi-terminal.

La secuencia optimizada del antígeno CAP es la SEQ ID NO: 3

Una vez sintetizada la secuencia, el casete <terminador-Pr-RBS-clyACAP/PCV2-6XHis-terminador> se construyó mediante PCR solapante de dos fragmentos de 1038 y 849 bp. En este proyecto se ha incluido un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento ClyA y el fragmento proteico CAP. El fragmento solapante final de 1929 bp fue subclonado mediante recombinación de extremos homólogos en un plásmido específicamente diseñado para la inserción de secuencias en el locus attTn7.

20 Luego se procedió a amplificar los fragmentos solapantes P Pr-ClyA y Linker-CAP/PCV2-6His-Tr y se observó el resultado de los mismos en un gel de agarosa (Ver Figura 1).

La secuencia del de Clya sec “forward” es SEQ ID NO: 4.

La secuencia del fragmento 1 (T1 Rb Terminator - Pr Promoter – Clya) es SEQ ID NO: 5.

La secuencia Clya Interno “reverse” es SEQ ID NO: 6.

La secuencia Clya PCV2-Solapante “forward” es SEQ ID NO: 7.

5 La secuencia Clya PCV2-Solapante “reverse” es SEQ ID NO: 8.

La secuencia del fragmento 2 (Clya-Linker-PCV2 CAP1-6HIS-T7 Terminator) es SEQ ID NO: 9

La secuencia de attTn7 “forward” II es SEQ ID NO: 10.

La secuencia de attTn7 “reverse” II es SEQ ID NO: 11.

10 Posteriormente mediante un gel de agarosa se pudo comprobar a través de un ensayo con enzimas de restricción XhoI/SmaI el correcto clonaje del casete de expresión (Ver Figura 2)

2.Transformación del casete de expresión <PR-RBS-ClyA-CAP/PCV2-6his-TT> en la cepa 3934VacR:

15 El plásmido final conteniendo el casete de expresión se introdujo mediante electroporación en la cepa mutante recombinante aislada y rugosa de Salmonella Enteritidis 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waal (3934vacR). Las colonias transformantes que contenían el plásmido fueron seleccionados en presencia de ampicilina.

Luego se procedió a preparar un gel de agarosa para verificar la amplificación del casete de expresión en transformantes 3934VacR con el plásmido conteniendo el casete de expresión (Ver Figura 3).

20

Posteriormente las colonias positivas se cultivaron en presencia de arabinosa a 32°C (este paso induce la integración del plásmido en el sitio attTn7 del cromosoma) y después se cultivaron a 42°C, provocando así la pérdida de este. Las colonias que mantienen el casete de expresión integrado en el cromosoma y que han perdido el resto de la secuencia plasmídica fueron chequeadas mediante PCR con los oligos attTn7-FW-II (*“forward”*) y attTn7-RVII (*“reverse”*). Con estos oligos, la cepa 3934VacR *“wild type”* da lugar a una banda de 250 bp, mientras que las cepas mutantes recombinantes y aisladas que portan la inserción del casete de expresión en el locus attTn7 dan lugar a una banda de 1929 bp.

10 Luego se procedió a la amplificación y verificación en geles de agarosa de los clones para evidenciar la región cromosómica donde se ha producido la inserción del casete (locus attn7) (Ver Figura 4). Los clones 3934VacR con casete integrado en cromosoma tiene un tamaño aproximado de 2kb, los clones en transición contienen tanto el plásmido como el casete integrado en el cromosoma y los clones 3934VacR negativos (*“wild type”*) poseen un tamaño de 250 pb

15

3. Verificación de la expresión mediante Western Blot:

Para corroborar la expresión de la fusión ClyA.CAP.His en las cepas 3934 attTn7::clyA.CAP.6His se prepararon extractos proteicos a partir de cultivos planctónicos crecidos en medio LB a 32°C. Dichos extractos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE). Una vez separadas, las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-histidinas conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). El revelado de las membranas demostró la presencia de una banda específica de aproximadamente 62 KDa, más intensa en las cepas en las que la expresión provenía desde plásmido (carriles 4, 5 y 6) y menos intensa en las cepas con el casete de expresión integrado en

20

25

el cromosoma (carriles 7, 8 y 9). Como control también se han utilizado las cepas de *E. coli* portadoras del plásmido (carriles 2 y 3) en las cuales también se puede observar la expresión. La utilización de un buffer de extracción con urea 6M resultó vital para la desnaturalización de la quimera ClyA.CAP.6His y permitió el reconocimiento del tag de 6 histidinas por el anticuerpo comercial. Dichos resultados se pueden evidenciar en la figura 5.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Amplificación de los fragmentos solapantes Pr-ClyA y Linker-CAP/PCV2-6His-Tr .

Figura 2: comprobación del clonaje del casete de expresión mediante digestión con las enzimas de restricción XhoI/SmaI.

Figura 3: Amplificación del casete de expresión en transformantes 3934VacR con el plásmido conteniendo el casete de expresión

Figura 4: Amplificación de la región cromosómica donde se ha producido la inserción del casete (locus attTn7)

Figura 5: Tinción comassie del SDS-PAGE y Western Blot de los extractos proteicos obtenidos tras crecimiento en medio LB a 32 °C.

Figura 6: Detección del antígeno CAP de PCV2 en SE9394-CAP. La inmunodetección se llevó a cabo mediante el uso de un anticuerpo anti 6xHis. Carril 1: Cepa SE9394 parental; Carril 2: Cepa SE9394-Cap.

Figura 7: Producción de anticuerpos específicos contra PCV2 en lechones inmunizados con la cepa SE3934-CAP Los resultados representan el promedio de absorbancias $\pm$

DS. El asterisco (*) muestra la diferencia significativa entre los grupos indicados ($p < 0.001$). SE3934-Vac debe entenderse como SE3934-CAP.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION: EJEMPLOS

- 5 Los siguientes ejemplos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

Ejemplo 1: Generación de la cepa mutante recombinante y aislada SE3934

- Mediante procedimientos de recombinación estándar se insertó el gen de CAP, el cual
10 llevaba una cola de histidina (6x-His), fusionada a Cya en la cepa de *Salmonella enteritidis*. A esta cepa se le denominó SE3934-CAP.

Ejemplo 2: Confirmación de la expresión del antígeno cap por SE3934-CAP.

- Se tomó 80 μ L de extracto proteico de la cepa SE3934-Cap y se le añadió 20 μ L de buffer de carga Laemmli 5x. La mezcla fue calentada a 100 °C por 5 minutos.
15 Posteriormente, la muestra fue corrida por SDS-PAGE en geles de 4-20% y transferidas a membranas de nitrocelulosa usando un dispositivo e-blot (GenScript Laboratories, Piscataway, NJ, USA). Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% (p/v) durante toda la noche. Posteriormente, fueron lavadas con buffer Tris salino más Tween 20 al 0.1% (v/v) (TBS-T 0.1%) 3 veces
20 por 10 minutos cada una. Se agregó a la membrana un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (1 μ g/mL) conjugado a peroxidasa (Cat. No. A00612; GenScript Laboratories, Piscataway, NJ, USA) diluido en BSA al 1% (v/v) y se incubó por 3 horas en agitación. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T 0.1% e incubadas con

el sustrato luminol (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). Las membranas fueron reveladas en una cámara CCD (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA).

Ejemplo 3: Ensayos de inmunización en lechones

El ensayo se realizó en una granja con antecedentes de diagnóstico para PCV2, donde
5 se utilizaron un total de 10 lechones recién destetados de 28 días de edad, los cuales
fueron separados en dos grupos. Un grupo fue inmunizado vía oral con 1 mL de la cepa
SE3934-Cap (6×10^7 ufc/mL) mientras que el grupo restante fue establecido como grupo
control sin inmunizar y sólo recibieron 1 mL de PBS estéril. Los lechones fueron
10 identificados individualmente y se les tomó muestras de sangre antes de la inmunización
y a los 10, 27 y 51 días post-inmunización para la determinación de la producción de
anticuerpos mediante ELISA.

Todos los cerdos fueron pesados individualmente antes de la inmunización (28 días) y
a los 70 días de edad. La ganancia de peso diaria (GDP) se calculó restando el peso
ganado al inicio de cada etapa al peso final de la misma, dividido por el número de días
15 que permanecieron en la etapa experimental.

Ejemplo 4: Detección de anticuerpos contra PCV2

La detección de anticuerpos específicos contra PCV2 se llevó a cabo mediante el uso
de un ELISA indirecto comercial (Bionote Inc, Gyeonggi, República de Corea) siguiendo
las instrucciones del fabricante. Brevemente, 10 µL del control positivo, control negativo
20 y de cada muestra de suero sanguíneo fue diluida en 390 µL de buffer de dilución.
Luego, 100 µL de la dilución fue agregada a los pocillos correspondientes y se incubó
por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente la placa fue lavada con
350 µL de buffer de lavado y se agregó 100 µL de la solución de conjugado se incubó
por 30 minutos (TA). Las placas fueron lavadas nuevamente, se agregó 100 µL del

sustrato y se incubó por 15 minutos a TA en oscuridad. La reacción fue detenida con 100 µL de solución stop y las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro a 450 nm (Biotek, Winooski, VT, USA).

Ejemplo 5: Expresión del antígeno CAP por SE3934-CAP

- 5 La correcta expresión del antígeno CAP de PCV2 fue confirmada mediante ensayos de Western blot al extracto proteico total de la cepa SE3934-CAP (Ver Figura 6). Se observó una banda reactiva de aproximadamente 55 KDa al usar el anticuerpo anti 6x-His, mientras que en la cepa parental SE3934 no se observó reactividad alguna.

10 *Ejemplo 6: Inmunogenicidad de la cepa mutante recombinante aislada SE3934-CAP*

- Para determinar la capacidad inmunogénica de la cepa SE3934-CAP en lechones recién destetados, se evaluó la producción de anticuerpos antes de la inmunización y a los 10, 27 y 51 días post-inmunización (p.i.). Como se muestra en la figura 02, previo a la inmunización (día 0) se detectaron anticuerpos maternos específicos contra PCV2
- 15 transmitidos por lactancia en ambos grupos de lechones. Sin embargo, a partir de los 10 días p.i. ya no se detectaron dichos anticuerpos en el grupo control. Además, se detectaron anticuerpos contra PCV2 en el grupo inmunizado con SE3934-CAP, observándose una diferencia significativa respecto al grupo control en los días 10 y 27 p.i., aunque los niveles de anticuerpos en suero fueron disminuyendo progresivamente
- 20 hasta el día 51, donde a pesar de que se detectaron ciertos niveles de anticuerpos, no hubo diferencia significativa con los resultados obtenidos en ambos grupos. (Ver Figura 7).

Como se observa en la siguiente tabla 1, la diferencia en el promedio del peso inicial de lechones (28 días) no fue significativa entre el grupo inmunizado y el grupo control ($P <$

0,05). Sin embargo, el peso a los 70 días de edad en los lechones inmunizados mostró un aumento respecto al grupo control. Obteniéndose una diferencia significativa ($P < 0,05$) sobre la GDP (Control=0,3540 g/d y SE3934-CAP =0,5200 g/d) para el periodo comprendido entre los 28 y 70 días de edad.

- 5 *Tabla 01. Variables productivas de los lechones por la inmunogenización contra PCV2, usando SE3934-CAP (Oral).*

Variables Productivos	N°	Tipo de composiciones inmunogénicas	
		Control	SE3934-CAP (Oral)
Peso inicial 28 días (kg)	5	7.526 ^a	7.550 ^a
Peso 70 días de edad (kg)	5	22.392 ^c	29.3020 ^a
Ganancia de peso diaria (GDP)(kg.)	5	0.3540 ^c	0.5200 ^a

Letras iguales agrupan tratamientos sin diferencias significativas según Tukey al 5%

Evaluación de la seguridad de la composición inmunogénica en cerdos

- 15 Se utilizaron grupos de 10 cerdos (aprox. 20 kg). Antes del experimento se tomó la temperatura rectal dos veces (esta será la temperatura “base-line” y se obtendrán muestras fecales para evidenciar que son animales libres de Salmonella. (Se podrá realizar por recuento o utilizando el SALMOTYPE pigscreen®). Los animales se analizaron en grupos de 5 cerdos. Al grupo A (Vaccine test Group) se le administrará la
- 20 composición inmunogénica (dosis: 10^9 ufc/s aprox), mientras que al grupo B (Grupo control) se le administró una dosis igual de una cepa salvaje de *Salmonella typhimurium*.

A lo largo de 14 días se evaluará el estado clínico de los cerdos. En los días 2, 4, 5, 6, 7, 11 y 13 se tomará la temperatura rectal y se medirá la pérdida/ganancia de peso.

- El día 14 post-infección se procederá a la eutanasia y necropsia de los 10 cerdos para
- 25 llevar a cabo el recuento de Salmonella en íleo, ciego y nódulos linfáticos ileocecales mediante el procedimiento microbiológico estandarizado de recuento en medio selectivo

para este enteropatógeno previo preenriquecimiento y enriquecimiento en medios líquidos de cultivo líquidos.

Las enfermedades producidas por PCV2 pueden generar casos sub-clínicos de infección que pueden no ser observadas pero que afectan en la camada, manifestándose con un retraso de crecimiento y pérdida de peso por la presencia del síndrome de Desmedro Posdestete (PMWS). En esta invención, el grupo de lechones inmunizados mostró un aumento significativo en la ganancia de peso después de la aplicación de la composición inmunogénica SE3934-CAP. Observándose al término de la prueba (70 días de edad) un aumento significativo en la ganancia de peso diaria (GDP) en los lechones inmunizados con SE3934-CAP (0.520 Kg) respecto al grupo control (0.3540 kg). Este resultado demostraría que la composición inmunogénica vectorizada logró proteger a los lechones de una infección sub-clínica del PCV2 circulante en esta granja.

Depósito de microorganismos

La cepa mutante recombinante y aislada SE3934-CAP fue denominada SALVAC CIRCO y ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (Paterna, Valencia, España), siguiendo las normas del Tratado de Budapest. Se procedió con el depósito de acuerdo con los datos consignados en la siguiente tabla:

Material	Fecha de Depósito	Número de Acceso
SALVAC CIRCO	8 de noviembre del 2019	CECT30007

La presente invención no está limitada al ámbito de los microorganismos depositados en la patente dado que estos representan una ilustración puntual de un aspecto de la

invención. Cualquier microorganismo o plásmido que sea funcionalmente equivalente a los descritos en la invención se incluyen dentro de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para generar una cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritidis 3934vacR que presenta un número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo, **caracterizada porque** comprende:
- 5
- a) Construir el casete <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos: fragmento 1 de 1038 pares de bases (pb) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 5 y el fragmento 2 de 849 pares de bases (pb) que tiene la
- 10
- secuencia SEQ ID NO: 9, en donde clyA se refiere a citolisina A;
- b) Incluir un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento citolysina A (clyA) y el fragmento CAP.
- c) Subclonar el fragmento solapante de 1929 pb obtenido entre los pasos
- 15
- a) y b), en un plásmido diseñado para inserción.
- d) Introducir el plásmido obtenido en el paso c) en la cepa rugosa de Salmonella enteritidis 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waal (3934VacR) mediante electroporación; y
- e) Seleccionar las colonias transformantes en presencia de ampicilina.
- 20
2. Una composición inmunogénica recombinante porcina de Salmonella enteritidis **caracterizada porque** comprende una cepa mutante recombinante-aislada modificada de Salmonella enteritidis 3934 vac DwaaL con número de depósito CECT 30007 de la Colección Española
- 25
- de Cultivos Tipo, en donde dicha cepa de Salmonella enteritidis comprende un fragmento del gen que codifica CAP de PCV2 (circovirus porcino tipo 2).
3. Una cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritidis 3934 vacR **caracterizada porque** tiene el número de depósito CECT 30007 de
- 30
- la Colección Española de Cultivos Tipo.

4. La cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritis de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** dicha cepa comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

5

10

FIGURA 1

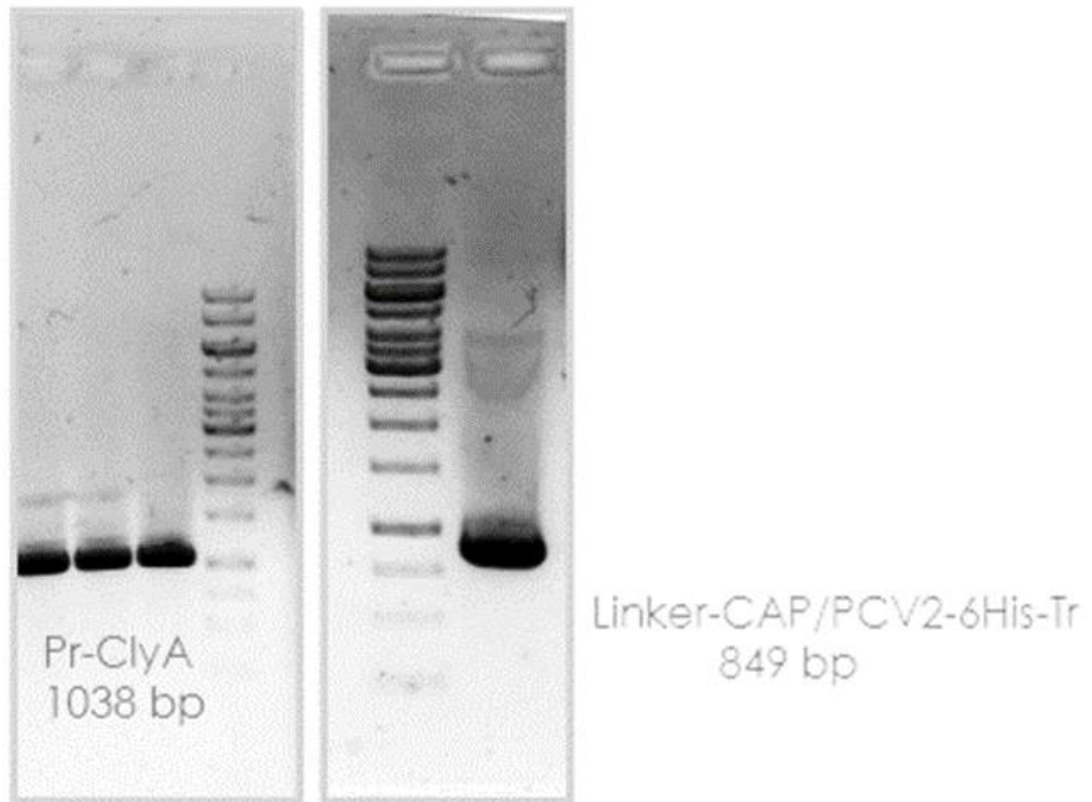


FIGURA 2

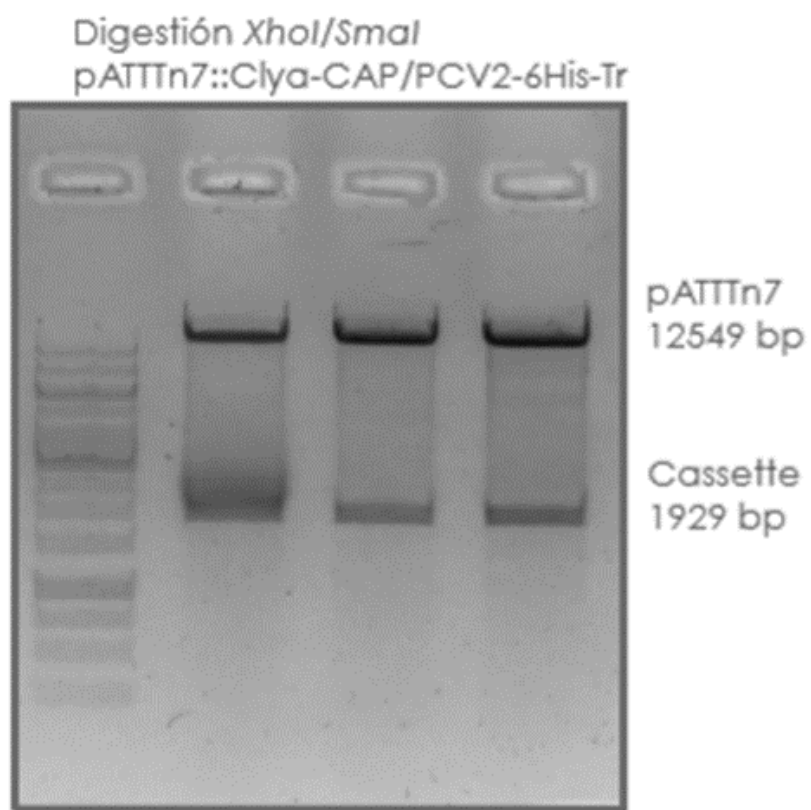
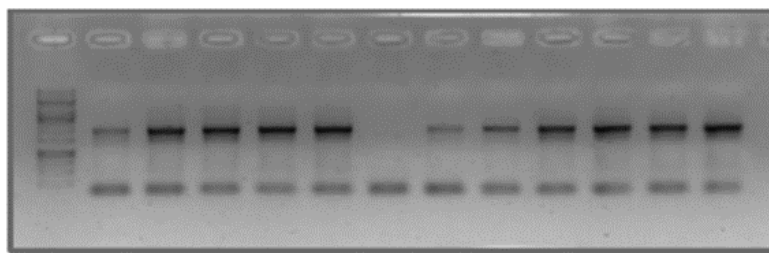
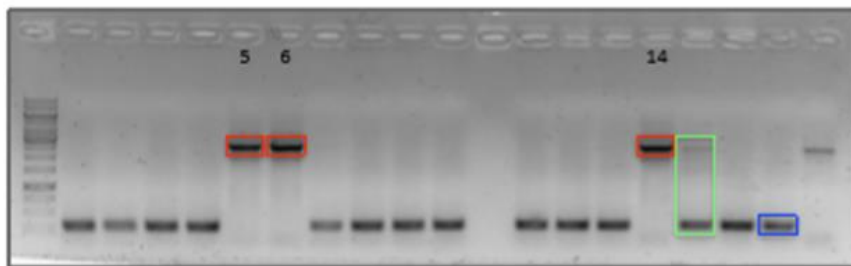


FIGURA 3



Clones 3934VacR ampicilina
resistentes
(≈2000 bp)

FIGURA 4



Clones 3934VacR con cassette
integrada en cromosoma (≈2000 bp)

Clones en transición
(contienen tanto el plásmido como el
cassette integrado en cromosoma)

Clones 3934VacR negativos
(Wild Type) 250 bp

FIGURA 5

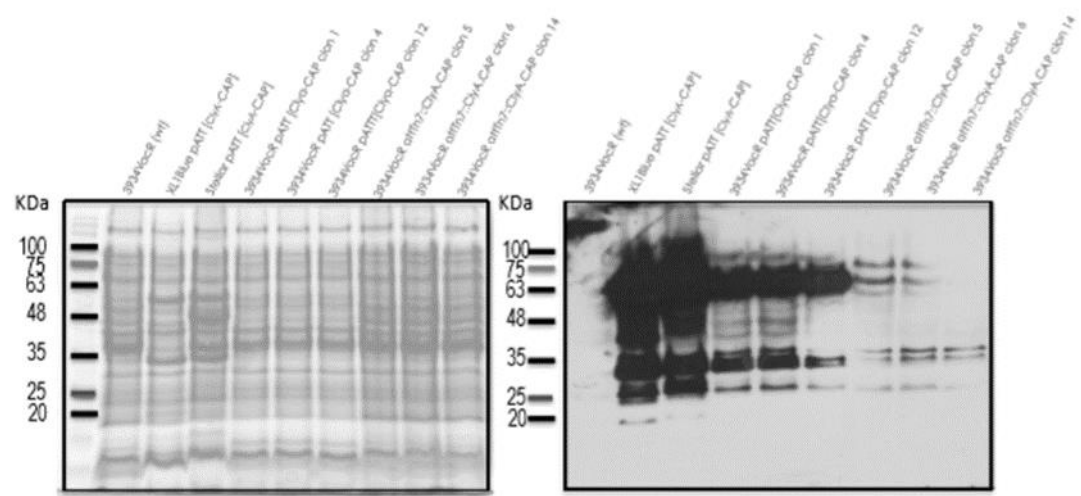


FIGURA 6

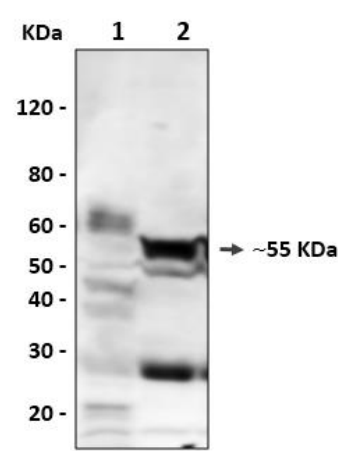
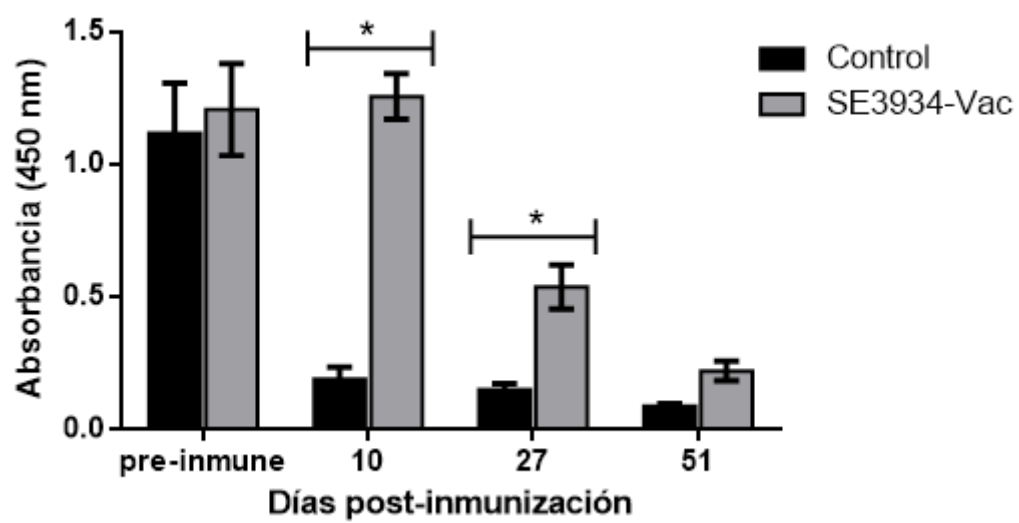


FIGURA 7



RESUMEN

La presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac a la cual se le ha delecionado el gen waaL para obtener un fenotipo rugoso (3934vac DwaaL), el procedimiento de obtención y los oligos utilizados; con el objetivo de reducir la toxicidad y mantener la inmunogenicidad para su aplicación como vacuna. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac DwaaL, es decir de tipo rugosa, la cual ha sido modificada para expresar el xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 además el procedimiento para la obtención de una cepa de *Salmonella enteritidis* 3034 vac DwaaL que expresa un xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2.

La invención comprende también el desarrollo de una nueva vacuna porcina, viva, recombinante, eficaz e inocua contra circovirus porcino tipo 2 desarrollada vía un proceso de inserción e integración de xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 en el cromosoma y plásmido de una cepa atenuada y no patogénica de la bacteria *Salmonella enteritidis*.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para generar una cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritidis 3934vacR que presenta un número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo, **caracterizada porque** comprende:
 - a) Construir el casete <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos: fragmento 1 de 1038 pares de bases (pb) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 5 y el fragmento 2 de 849 pares de bases (pb) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 9, en donde clyA se refiere a citolisina A;
 - b) Incluir un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento citolysina A (clyA) y el fragmento CAP.
 - c) Subclonar el fragmento solapante de 1929 pb obtenido entre los pasos a) y b), en un plásmido diseñado para inserción.
 - d) Introducir el plásmido obtenido en el paso c) en la cepa rugosa de Salmonella enteritidis 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waal (3934VacR) mediante electroporación; y
 - e) Seleccionar las colonias transformantes en presencia de ampicilina.
2. Una composición inmunogénica recombinante porcina de Salmonella enteritidis **caracterizada porque** comprende una cepa mutante recombinante-aislada modificada de Salmonella enteritidis 3934 vac DwaaL con número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo, en donde dicha cepa de Salmonella enteritidis comprende un fragmento del gen que codifica CAP de PCV2 (circovirus porcino tipo 2).
3. Una cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritidis 3934 vacR **caracterizada porque** tiene el número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo.

4. La cepa mutante recombinante-aislada de Salmonella enteritis de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** dicha cepa comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

5

10

FIGURA 1

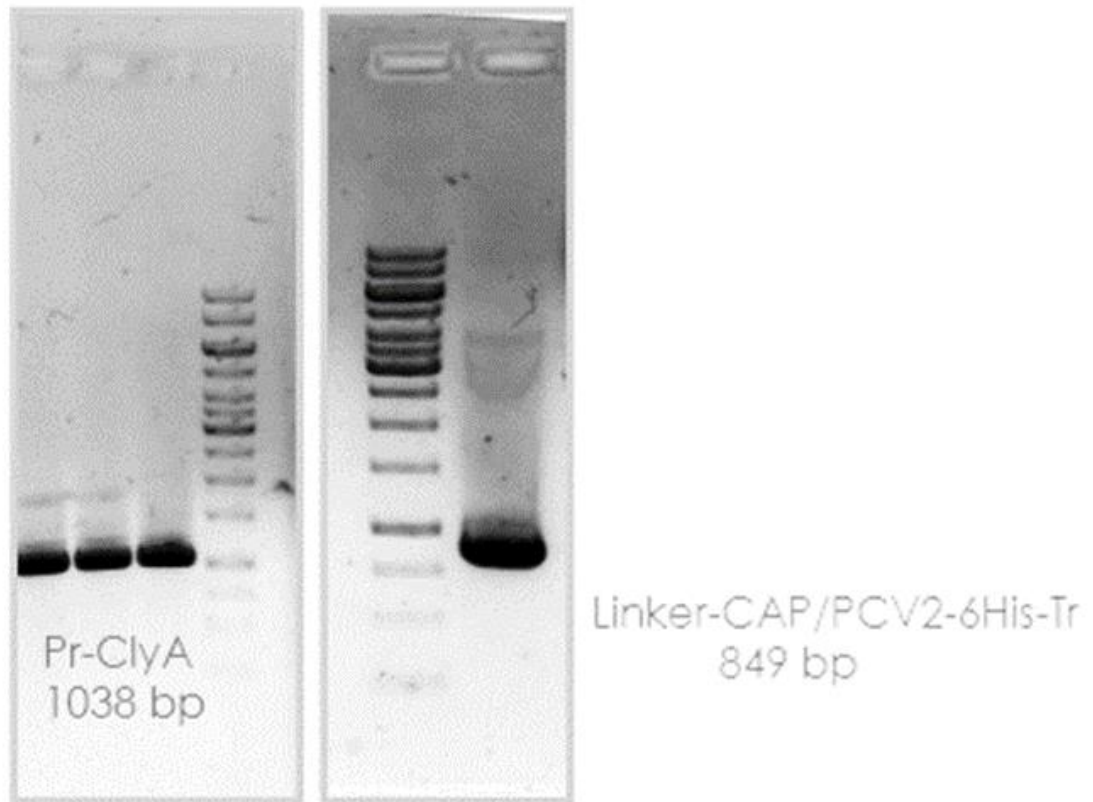


FIGURA 2

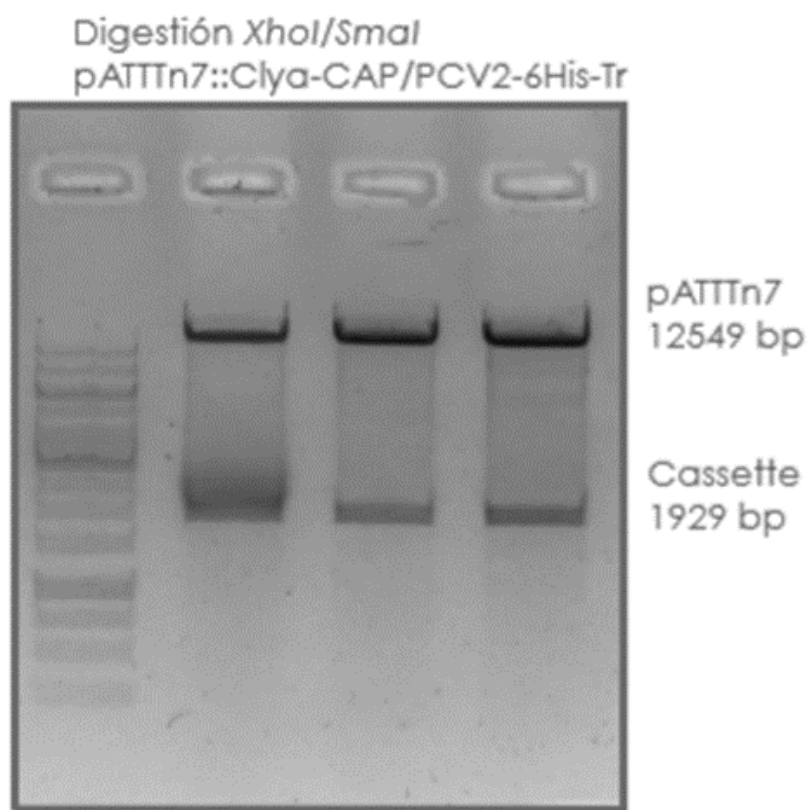
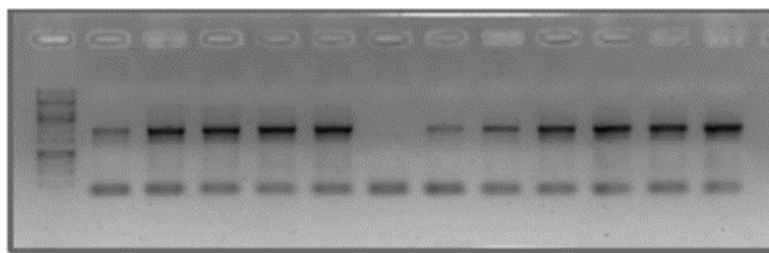
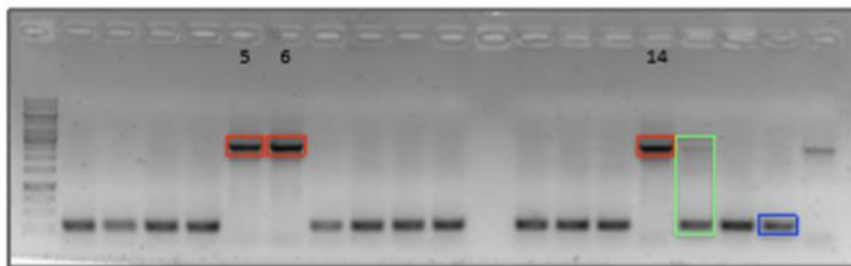


FIGURA 3



Clones 3934VacR ampicilina
resistentes
(≈2000 bp)

FIGURA 4



Clones 3934VacR con cassette
integrada en cromosoma (≈200b)

Clones en transición
(contienen tanto el plásmido como el
cassette integrado en cromosoma)

Clones 3934VacR negativos
(Wild Type) 250 bp

FIGURA 5

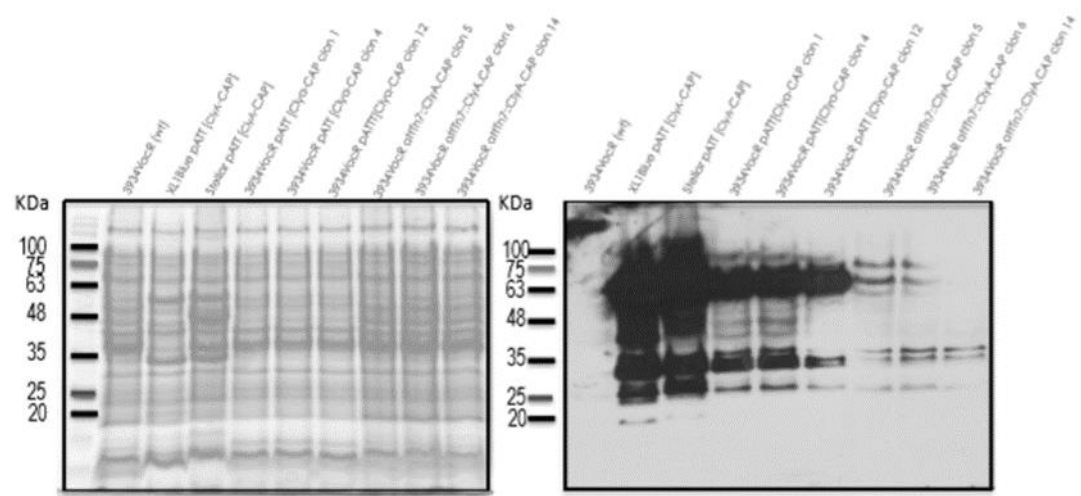


FIGURA 6

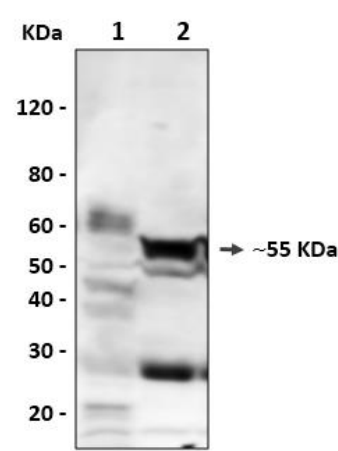
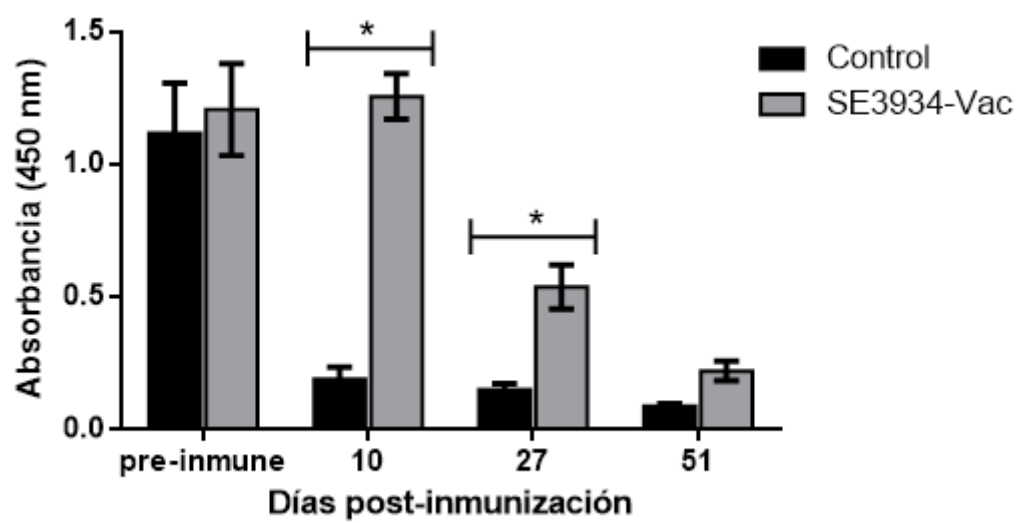


FIGURA 7



RESUMEN

La presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac a la cual se le ha delecionado el gen waaL para obtener un fenotipo rugoso (3934vac DwaaL), el procedimiento de obtención y los oligos utilizados; con el objetivo de reducir la toxicidad y mantener la inmunogenicidad para su aplicación como vacuna. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Salmonella enteritidis* 3934vac DwaaL, es decir de tipo rugosa, la cual ha sido modificada para expresar el xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 además el procedimiento para la obtención de una cepa de *Salmonella enteritidis* 3034 vac DwaaL que expresa un xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2.

La invención comprende también el desarrollo de una nueva vacuna porcina, viva, recombinante, eficaz e inocua contra circovirus porcino tipo 2 desarrollada vía un proceso de inserción e integración de xeno-antígeno de la proteína de la cápside (CAP) del circovirus porcino tipo 2 en el cromosoma y plásmido de una cepa atenuada y no patogénica de la bacteria *Salmonella enteritidis*.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para generar una cepa mutante recombinante-aislada de *Salmonella enteritidis* 3934vacR que presenta un número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo, **caracterizada porque** comprende:
 - a) Construir el casete <terminator-Pr-RBS-clyA-CAP/PCV2-6xHis-terminator> mediante PCR sobrelapante de dos fragmentos: fragmento 1 de 1038 pares de bases (pb) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 5 y el fragmento 2 de 849 pares de bases (pb) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 9, en donde clyA se refiere a citolisina A;
 - b) Incluir un linker (GGGSGGGS) entre el fragmento citolisina A (clyA) y el fragmento CAP.
 - c) Subclonar el fragmento solapante de 1929 pb obtenido entre los pasos a) y b), en un plásmido diseñado para inserción.
 - d) Introducir el plásmido obtenido en el paso c) en la cepa rugosa de *Salmonella enteritidis* 3934 Δ XII Δ rpoS Δ waal (3934VacR) mediante electroporación; y
 - e) Seleccionar las colonias transformantes en presencia de ampicilina.
2. Una composición inmunogénica recombinante porcina de *Salmonella enteritidis* **caracterizada porque** comprende una cepa mutante recombinante-aislada modificada de *Salmonella enteritidis* 3934 vac DwaaL con número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo, en donde dicha cepa de *Salmonella enteritidis* comprende un fragmento del gen que codifica CAP de PCV2 (circovirus porcino tipo 2).
3. Una cepa mutante recombinante-aislada de *Salmonella enteritidis* 3934 vacR **caracterizada porque** tiene el número de depósito CECT 30007 de la Colección Española de Cultivos Tipo.
4. La cepa mutante recombinante-aislada de *Salmonella enteritis* de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** dicha cepa comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

[Vaccine](#). 2016 Sep 14; 34(40): 4827–4834.

doi: [10.1016/j.vaccine.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.002)

PMCID: PMC5022402

PMID: [27544585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544585/)

Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators

[Rebecca P. Sumner](#),¹ [Hongwei Ren](#), [Brian J. Ferguson](#), and [Geoffrey L. Smith](#)*

[Author information](#) [Article notes](#) [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Associated Data

[Supplementary Materials](#)

Abstract

[Go to:](#)

1. Introduction

The poxvirus family is a diverse group of dsDNA viruses that replicate in the cytoplasm of infected cells. The potential use of this family, particularly the well-characterised vaccinia virus (VACV) strains, as vaccine vectors has been under investigation since the 1980s [1]. VACV has many features that make it attractive for this use; a large capacity for foreign gene expression, relative ease of manipulation, and, importantly, induction of strong innate and memory immune responses, including both cellular and humoral arms [2]. Much research has focused on modified virus Ankara (MVA) and NY-VAC because of their severe attenuation, and, at least for MVA, the inability to replicate in most mammalian cells. These vectors are safe even in immunocompromised hosts [3], [4], which is of particular importance for vaccination against diseases such as HIV-1, malaria and tuberculosis [2]. There is still a need to improve the immunogenicity of these vectors, particularly because large viral doses, repeated vaccination or prime-boost regimes are required to achieve adequate correlates of protection [5].

The host antiviral innate immune response provides a strong selective pressure and, consequently, viruses have evolved a plethora of mechanisms to counteract its effects. Engagement of viral components with innate immune receptors activates transcription factors including nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and interferon (IFN) regulated factors (IRF)-3/7 that coordinate the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and type I IFNs (reviewed in [6], [7]). Importantly this pro-inflammatory milieu attracts professional antigen presenting cells to the site of infection, providing an important link to the adaptive immune response and the subsequent establishment of immune memory.

VACV dedicates between one third and one half of its genome to dampening host innate responses (reviewed in [6]). For example, nine intracellular NF- κ B inhibitors have been identified and there is evidence that more remain to be discovered [8]. In addition, VACV encodes numerous IRF-3/7 inhibitors and multiple mechanisms to counteract the actions of IFNs [6]. The mechanisms by which innate immunity impacts successful vaccine design remain incompletely understood. Importantly, recent data have demonstrated that the deletion of several VACV immunomodulatory genes individually enhances the immunogenicity of these vectors (reviewed in [6], [9]). Examples of such genes include the NF- κ B inhibitor N1 [10], the IRF-3/7 inhibitor C6 [11], [12] and the dual NF- κ B and IRF-3/7 inhibitor K7 ([13] and Ren et al., unpublished data). Proteins N1 and K7 have Bcl-2 folds [14], [15] and C6 is predicted to do so [16] and all are virulence factors [17], [18], [19].

Some studies have investigated the effect of deleting multiple immunomodulatory genes from VACV vectors but so far have not included an in-depth comparison of single gene deletions in isolation versus deletion of genes in combination [13], [20], [21]. These comparisons have also not always included challenge experiments, instead measuring aspects of immunological memory that may correlate with immune protection. This study therefore tested whether the immunogenicity of VACV could be improved further by deleting three intracellular innate immunomodulators in combination (encoded by genes *NIL*, *C6L* and *K7R*) from VACV strain Western Reserve (WR). These immunomodulators were selected because their function in innate immunity was known, and because deletion of each of these genes in isolation from VACV WR increased immunogenicity, but decreased virulence. This study shows that deletion of these three genes did not affect VACV growth *in vitro*, but led to sequential attenuation of the virus in two *in vivo* models. In challenge models, despite each individual gene deletion enhancing immunogenicity, a virus lacking all three genes was a poorer vaccine, accompanied by inferior memory T cell responses and lower neutralising antibody titres. This illustrates how the design of vaccines for optimal immunogenicity must consider how the degree of attenuation impacts on the induction of immunological memory.

[Go to:](#)

2. Materials and methods

2.1. Cells, viruses and mice

BSC-1 and CV-1 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and penicillin/streptomycin (P/S, 50 μ g/ml, Gibco, NY, USA). EL-4 cells were grown in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, GIBCO, Paisley, UK) supplemented with 10% (v/v) FBS and 50 μ g/ml P/S. The deletion and revertant VACVs for *NIL* [17], *C6L* [18] and *K7R* [19] were described previously. Female mice Balb/c and C57/B6 (6–8 weeks old) were purchased from Harlan (Blackthorn, United Kingdom).

2.2. Construction of Western Reserve recombinant viruses

Viruses were constructed using the transient dominant selection method [22] as described [18], using $\nu\Delta N1$ [17] as a starting point and plasmids Z11 $\Delta C6$ [18] and pSJH7- $\Delta K7$ [19] to delete *C6L* and *K7R* respectively. Z11 is a pCI-derived plasmid containing the *Escherichia coli* *guanylylphosphoribosyl transferase* (*Ecogpt*) gene fused in-frame with the *enhanced green fluorescent protein* (*EGFP*) gene under the control of the VACV 7.5 K promoter. Revertant viruses were constructed by replacing the deleted genes in their natural loci using plasmids Z11C6Rev [18] and pSJH7-K7 [19]. The genotype of resolved viruses was analysed by PCR following proteinase K-treatment of infected BSC-1 cells using primers that anneal to the flanking regions of *N1L*, *C6L* and *K7R* [17], [18], [19]. Infectious virus titres were determined by plaque assay on BSC-1 cells.

2.3. SDS-PAGE and immunoblotting

Infected BSC-1 cells were lysed in a cell lysis buffer containing 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X100, 0.05% (v/v) NP40 supplemented with protease inhibitors (Roche). Samples were boiled for 5 min and then subjected to SDS-PAGE. Primary antibodies were from the following sources: mouse anti- α -tubulin (Upstate Biotech), mouse anti-D8 mAb AB1.1 [23], rabbit-anti-N1 polyclonal antiserum [17], rabbit-anti-C6 polyclonal antiserum [18] and rabbit-anti-K7 polyclonal antiserum [24]. Primary antibodies were detected with goat-anti-mouse/rabbit IRdye 800CW infrared dye secondary antibodies and membranes were imaged using an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences).

2.4. Plaque size analysis

BSC-1 cells were inoculated at approximately 50 plaque forming units (p.f.u.) per well of a 6-well plate and stained with crystal violet 3 days later [18]. The sizes of 20 plaques per well were measured using Axiovision acquisition software and a Zeiss AxioVert.A1 inverted microscope as described [25].

2.5. Murine intranasal and intradermal models of infection

Female BALB/c mice ($n = 5$, 6–8 weeks old) were infected intranasally (i.n.) with 5×10^3 p.f.u. of purified VACV strains. VACV was purified from cytoplasmic extracts of infected cells by two rounds of sedimentation through 36% (w/v) sucrose at 32,900g for 80 min. Virus was resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 9. Virus used for infections was diluted in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and the titre of the diluted virus that was used to infect mice was determined by plaque assay on the day of infection. Mice were monitored daily to record body weight and signs of illness as described [26], [27]. Female C57BL/6 mice ($n = 5$, 6–8 weeks old) were inoculated intradermally (i.d.) in both ear pinnae with 10^4 p.f.u. and the resulting lesions were measured daily as described [28], [29]. For the challenge experiments, mice that had been inoculated i.n. were challenged 6 weeks later and mice that had been inoculated i.d. were challenged 4 weeks later, i.n., with 5×10^6 p.f.u. of wild-type VACV WR.

2.6. Intracellular cytokine staining

Splenocytes were prepared as described [10] and incubated for 4 h with a C57BL/6-specific CD8⁺ VACV peptide B8_{20–27} [30] or a negative control CD8⁺ VACV peptide specific for BALB/c mice, E3_{140–148} [31] at a final concentration of 0.1 µg/ml. After 1 h Golgi stop (BD Biosciences) was added and the cells were incubated for a further 3 h. Cells were then stained for CD8 and either IFN γ or TNF α and analysed by flow cytometry [10].

2.7. ⁵¹Cr release cytotoxic assay

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity was assayed with a standard ⁵¹Cr-release assay using VACV-infected EL-4 cells as targets, as described [32]. The percentage of specific ⁵¹Cr-release was calculated as specific lysis = [(experimental release – spontaneous release)/(total detergent release – spontaneous release)] × 100. The spontaneous release values were always <5% of total lysis.

2.8. IMV plaque reduction neutralisation assay

The neutralising titre of anti-VACV antibodies was calculated by plaque assay on BSC-1 cells as described [10]. Neutralisation dose 50 (ND₅₀) values represent the reciprocal of the serum dilution giving 50% reduction in plaque number compared with virus incubated without serum.

2.9. Serum antibody titration by ELISA

The binding of serum antibodies to VACV-specific epitopes was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using plates coated with lysates of VACV strain WR-infected cells that had been treated with ultraviolet light and psoralen to inactivate VACV infectivity as described [33], [34]. Plates coated with bovine serum albumin were used as a negative control. IgG end-point titres were defined as the reciprocal serum dilutions giving twice the average optical density values obtained with bovine serum albumin.

2.10. Statistical analysis

Data were analysed using an un-paired Student's *t*-test, with Welch's correction where appropriate, or a Mann–Whitney test as indicated. Statistical significance is expressed as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

2.11. Ethics statement

This work was carried out in accordance with regulations of The Animals (Scientific Procedures) Act 1986. All procedures were approved by the United Kingdom Home Office and carried out under the Home Office project licence PPL 70/7116.

[Go to:](#)

3. Results

3.1. Construction of a VACV strain WR lacking the innate immunomodulatory genes *N1L*, *C6L* and *K7R*

To construct a virus lacking *N1L*, *C6L* and *K7R*, *C6L* was deleted from a virus already lacking *N1L* ($v\Delta N1$, [17]) by transient dominant selection (see methods) yielding $v\Delta\Delta$, followed by the removal of *K7R* yielding $v\Delta\Delta\Delta$. As controls, a revertant virus where the deleted gene was re-inserted back into its natural locus was constructed at each stage (Fig. 1a). Deletion of *C6L* and *K7R* was confirmed by PCR analysis of proteinase K-treated lysates of infected BSC-1 cells using primers specific for these genes in addition to *N1L* and *A49R* as a control (Fig. 1b). The phenotype of the resulting recombinant viruses was confirmed at the protein level by immunoblotting of lysates from infected BSC-1 cells using antisera against N1, C6 and K7, as well as a monoclonal antibody against VACV protein D8 as an infection control (Fig. 1c). Proteins N1, K7 and C6 are each non-essential for virus replication or spread in cell culture [17], [18], [19] and measurement of the plaque size of mutants lacking 2 or 3 of these genes confirmed that deletion of these genes in combination did not affect viral spread in BSC-1 cells (Fig. 1d).

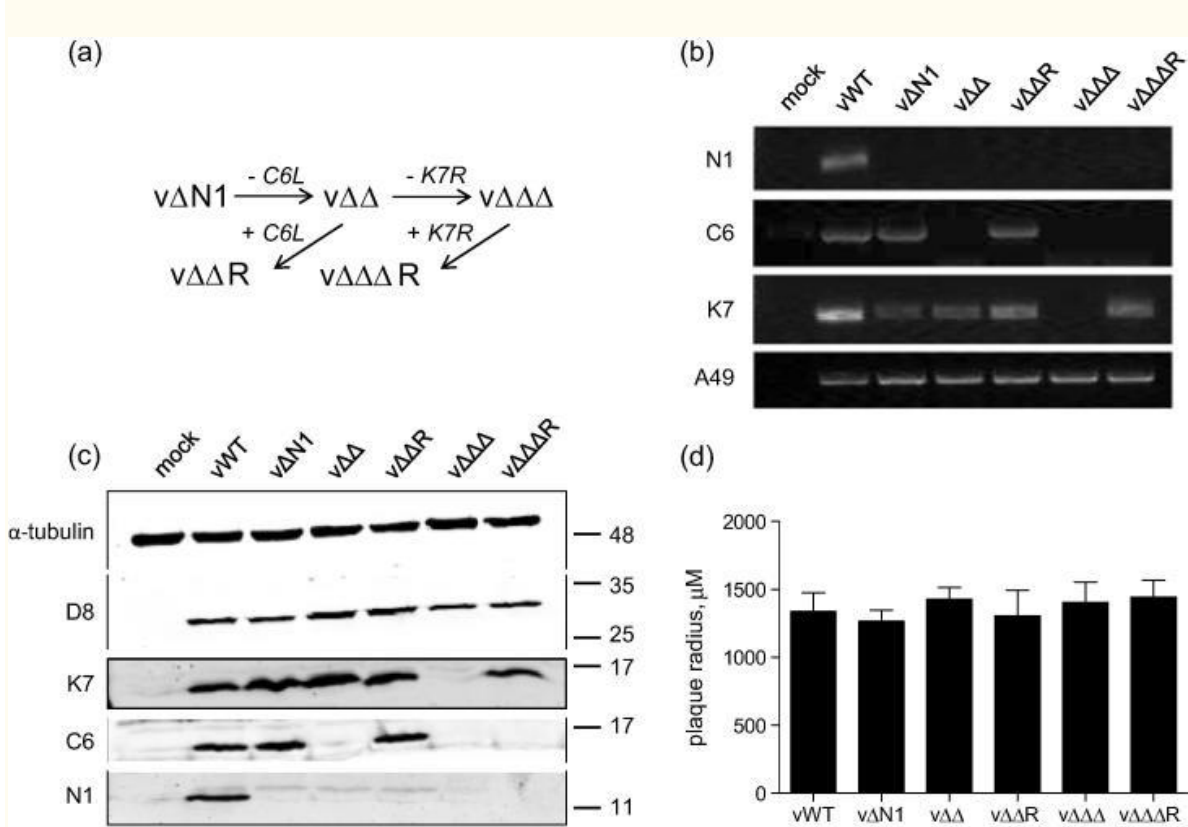


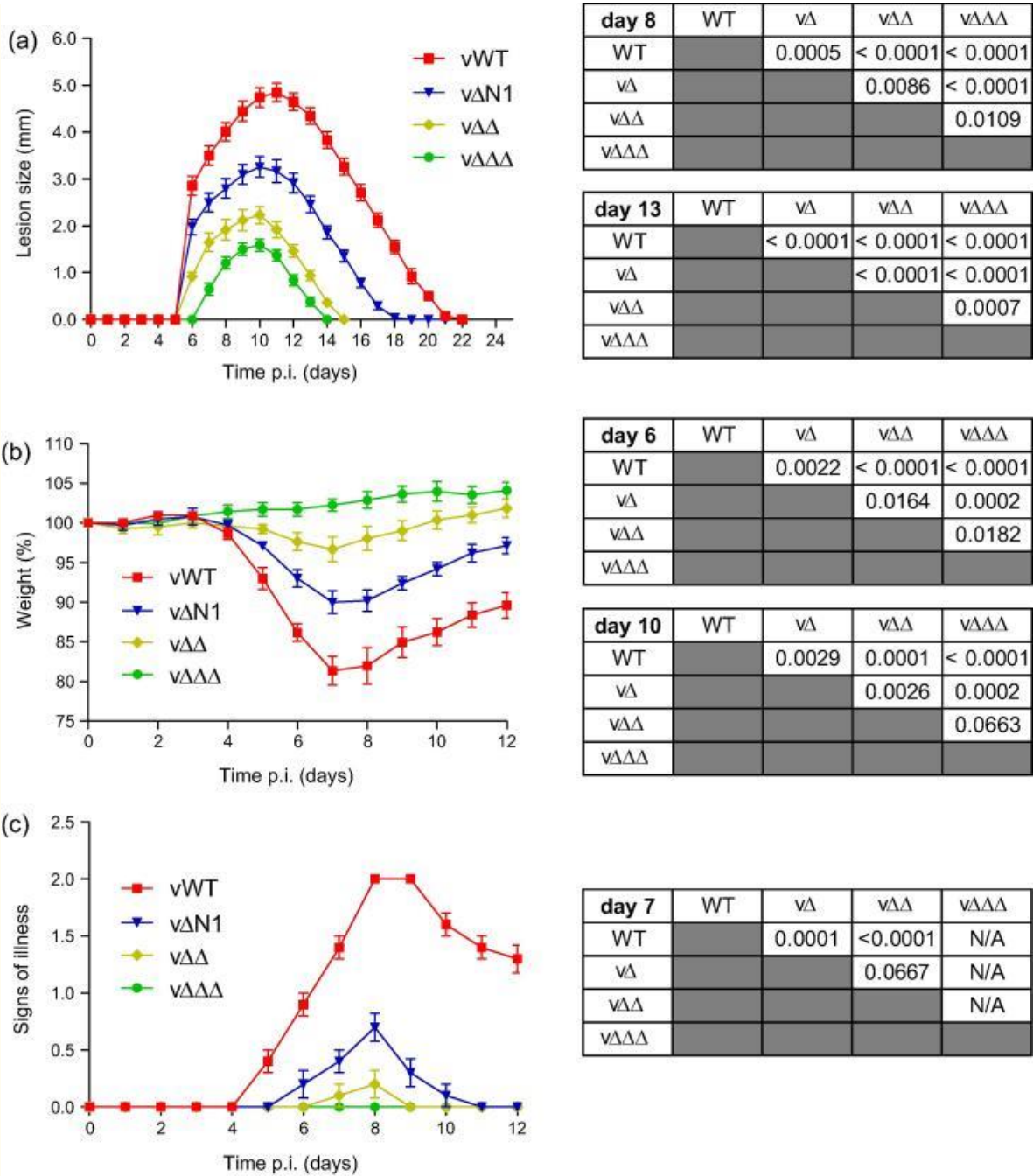
Fig. 1

Construction of a VACV strain WR lacking three innate immunomodulators. (a) Schematic representation of the order in which the *C6L* and *K7R* genes were removed from a virus already lacking *N1L* ($v\Delta N1$). Revertant viruses were constructed at each stage as controls. (b) PCR analysis of proteinase K-treated lysates of BSC-1 cells infected with the indicated viruses for 16 h at 2 p.f.u. per cell using primers specific for *N1L*, *C6L*, *K7R* and *A49R*. (c) Immunoblot analysis of BSC-1 cells infected for 16 h with the indicated viruses at 2 p.f.u. per cell. Lysates were analysed by SDS-

PAGE and immunoblotted using monoclonal antibodies against α -tubulin and D8 or with polyclonal antisera against N1, C6 and K7. Molecular mass markers are indicated on the right (kDa). (d) Monolayers of BSC-1 cells were infected with the indicated viruses for 72 h. Cells were stained with crystal violet and the size of 20 plaques was measured using Axiovision acquisition software and a Zeiss AxioVert.A1 inverted microscope. Results are expressed as the mean plaque radius $\pm$ SD. Data are representative of at least 2 independent experiments.

3.2. Deletion of *N1L*, *C6L* and *K7R* in combination attenuates the virus sequentially in murine intradermal and intranasal models of infection

The *N1L* [17], [35], *C6L* [18] and *K7R* [19] single deletion viruses are attenuated in both the i.d. and i.n. models of murine infection, highlighting their importance as virulence factors. When compared side-by-side in the i.d. model, the level of attenuation was found to be similar amongst the three single deletion viruses (Suppl. Fig. 1a). In contrast, a virus lacking both N1 and C6 ($v\Delta\Delta$) was significantly more attenuated than $v\Delta N1$, and a virus lacking all three immunomodulators ($v\Delta\Delta\Delta$) was attenuated further still (Fig. 2a), indicating that the roles of these innate inhibitors *in vivo* is non-redundant. The double deletion revertant ($v\Delta\Delta R$) and the triple gene deletion revertant ($v\Delta\Delta\Delta R$) control viruses behaved as expected, demonstrating that the observed attenuation phenotypes were due to specific genes deletions and not mutations elsewhere in the viral genome (Suppl. Fig. 1b). Similar results were obtained in the i.n. model of infection where deletion of C6 and K7 again led to sequential attenuation of the virus, as indicated by reduced weight loss (Fig. 2b) and fewer signs of illness (Fig. 2c).



[Open in a separate window](#)

Fig. 2

Sequential attenuation of recombinant viruses. (a) The lesions induced by i.d. inoculation of C57BL/6 mice ($n = 5$) with 10^4 p.f.u. of the indicated viruses in both ear pinnae were measured daily. Data are expressed as the mean lesion size (mm) $\pm$ SEM. (b and c) BALB/c mice ($n = 5$) were infected i.n. with 5×10^3 p.f.u. of the indicated viruses and their weights (b) and signs of illness (c) were monitored daily. Weight data (b) are expressed as the percentage $\pm$ SEM of the mean weight of the same group of animals on day 0. Signs of illness data (c) are expressed as the mean score $\pm$ SEM. Statistical analyses for data on the day p.i. indicated are in the tables on the right hand

side and were determined using the Student's *t*-test. N/A indicates that data for this comparison could not be determined. Data are representative of at least 2 independent experiments.

3.3. Deletion of *N1L*, *C6L* and *K7R* in combination does not enhance vaccine potency

To determine whether the double and triple gene deletion viruses have improved vaccine potency compared with the *N1* single deletion virus, mice were vaccinated i.d. and challenged i.n. one month later with a lethal dose of wild-type VACV WR. As reported [10], single deletion of *N1* provided the mice with better protection against challenge, indicated by significantly less weight loss over a period of 10 days (Fig. 3a). However, $v\Delta\Delta$ provided less protection than both $v\Delta N1$ and vWT (although this did not reach statistical significance when compared to the WT virus on any one day) and $v\Delta\Delta\Delta$ provided significantly less protection again (Fig. 3a). Similar results were observed following challenge of mice that were vaccinated i.n. (Fig. 3b). When compared head-to-head each of the single deletion viruses enhanced vaccine potency to a similar degree (Suppl. Fig. 2a) and the revertant control viruses behaved as expected in challenge experiments (Suppl. Fig. 2b).

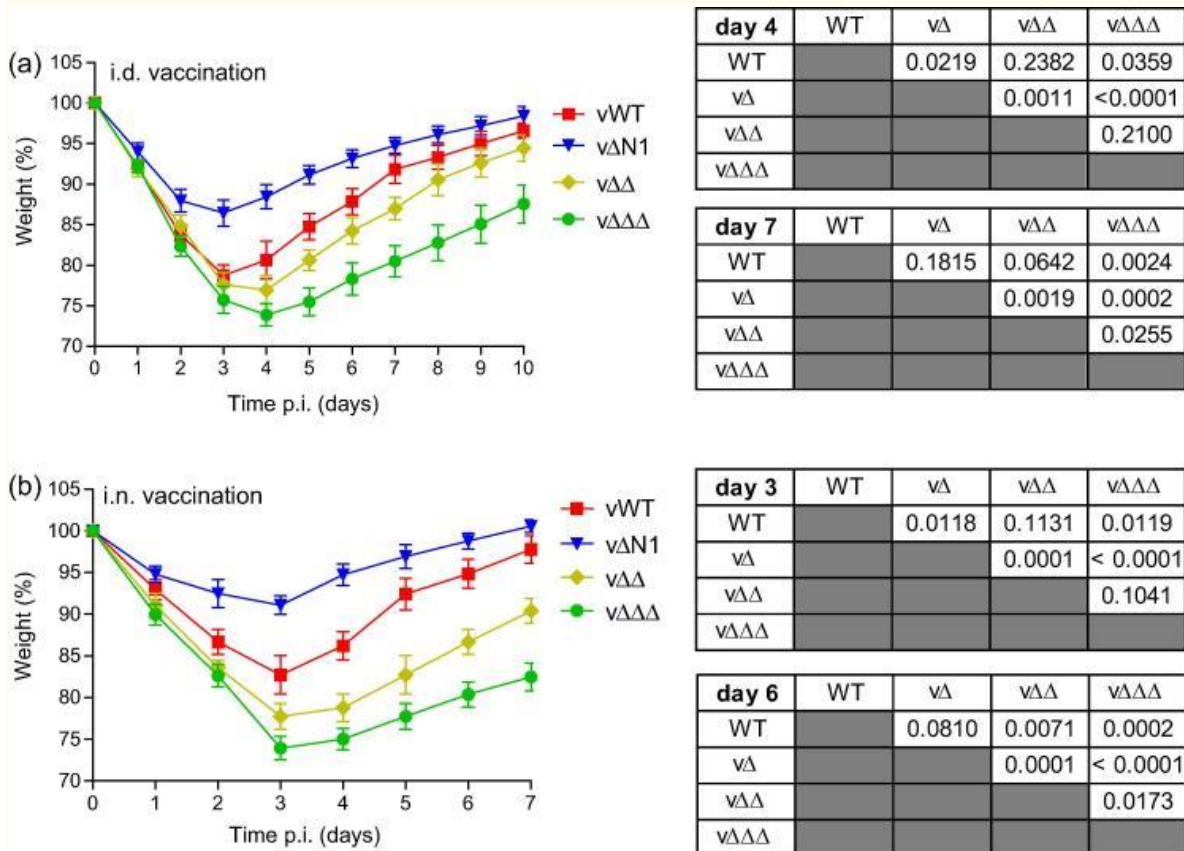


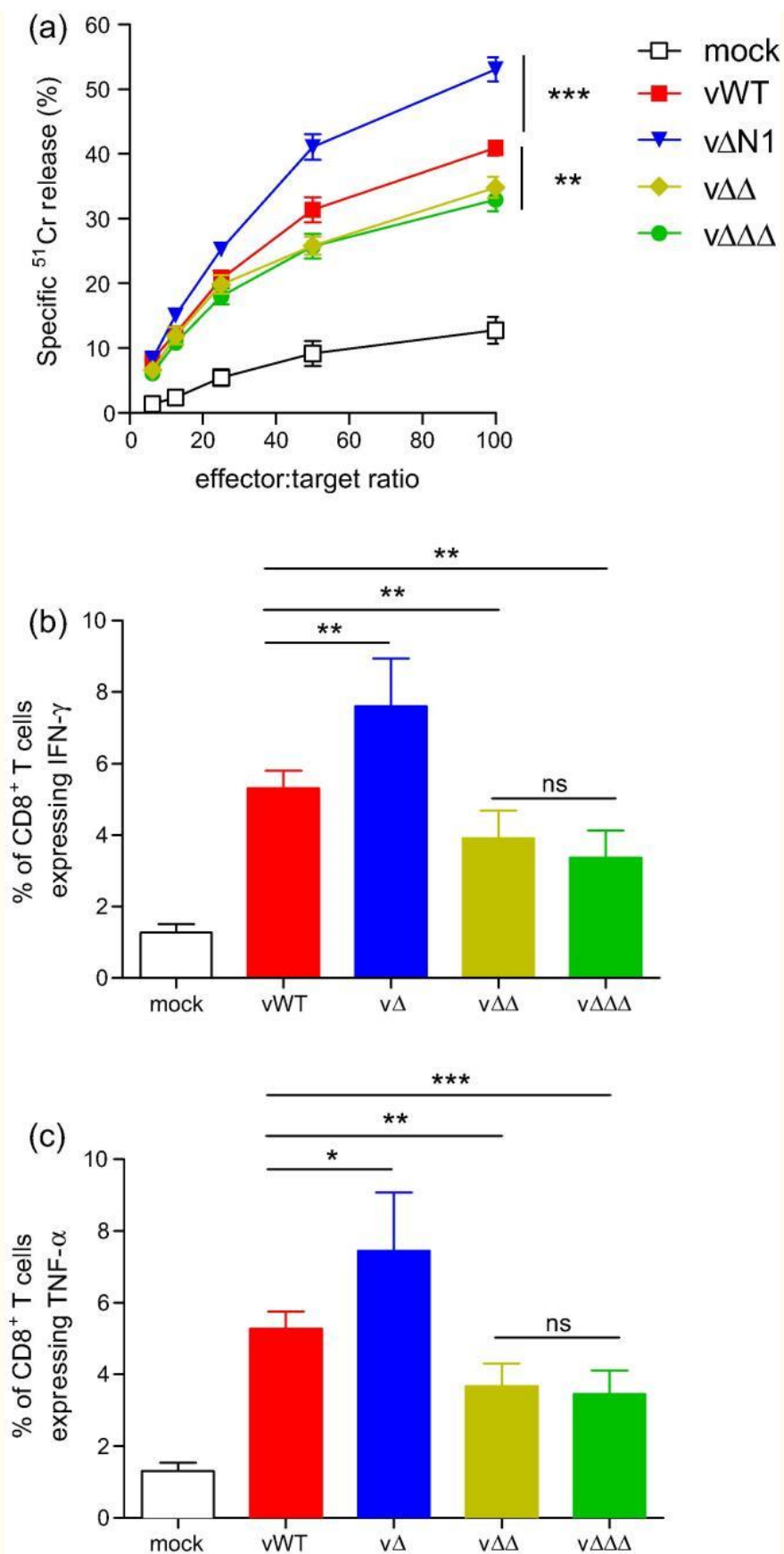
Fig. 3

Vaccine potency of recombinant viruses. (a) Groups of five C57BL/6 mice were vaccinated by i.d. inoculation in both ear pinnae with 10^4 p.f.u. of the indicated viruses and challenged i.n. 1 month

later with 5×10^6 p.f.u. of wild-type WR and the resulting weight change was monitored daily. (b) Groups of five BALB/c mice that were vaccinated i.n. with 5×10^3 p.f.u. of the indicated viruses were challenged i.n. 6 weeks later with 5×10^6 p.f.u. of wild-type VACV WR and the resulting weight change was monitored daily. Data are expressed as the percentage $\pm$ SEM of the mean weight of the same group of animals on day 0. Statistical analyses for data on the days p.i. indicated are in the tables on the right hand side and were performed using the Student's *t*-test. All experiments were conducted at least twice and the data shown are representative.

3.4. The double and triple gene deletion viruses induce lower CTL responses

To understand why vaccination with $v\Delta\Delta$ or $v\Delta\Delta\Delta$ afforded less protection than $v\Delta N1$, CD8⁺ T cells responses one month post-i.d. vaccination were analysed. To measure the cytolytic activity of VACV-specific T cells a chromium release cytotoxicity assay was performed. The specific cytolytic activity of T cells from $v\Delta N1$ -vaccinated mice was significantly higher than that from vWT -vaccinated animals ([Fig. 4a](#)), corroborating recently published findings [\[10\]](#). Conversely, significantly lower VACV-specific cytolytic activity of T cells was measured in $v\Delta\Delta$ - or $v\Delta\Delta\Delta$ -vaccinated mice. Interestingly, no significant difference in cytolytic activity was observed between $v\Delta\Delta$ and $v\Delta\Delta\Delta$.



[Open in a separate window](#)

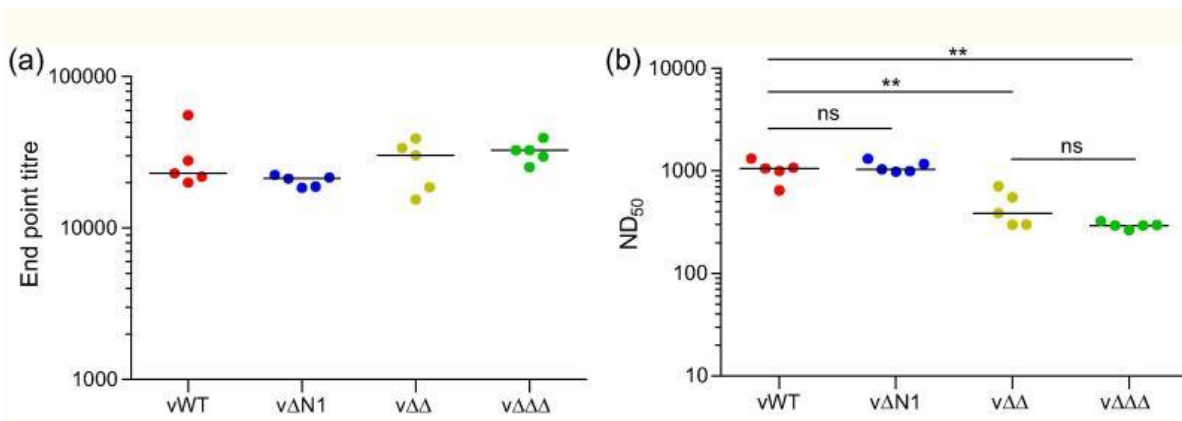
[Fig. 4](#)

CD8⁺ T cells responses one month post-vaccination. The activity of splenic T cells from C57BL/6 mice ($n = 5$) was measured one month post-vaccination with 10^4 p.f.u. of the indicated viruses, or mock-vaccination with PBS in both ear pinnae. (a) The cytolytic activity of splenic T-cells against VACV strain WR-infected EL-4 target cells was determined by ^{51}Cr release assay. Data are expressed as percentage specific lysis $\pm$ SEM. (b and c) The percentage of CD8⁺ T cells expressing IFN γ (b) or TNF α (c) was determined by intracellular cytokine staining. Data are expressed as percentage $\pm$ SD. Statistical analyses were performed using the Student's t -test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: not significant. The experiments were conducted at least 3 times and the data shown are representative.

The release of cytokines by splenic CD8⁺ T cells that were stimulated *ex vivo* with VACV peptides was also analysed by intracellular cytokine staining. In agreement with data published recently [10], splenic CD8⁺ T cells from v Δ N1-vaccinated mice secreted enhanced levels of IFN γ (Fig. 4b) and TNF α (Fig. 4c) following stimulation than cells from vWT-vaccinated mice. In contrast, splenic CD8⁺ T cells from both v $\Delta\Delta$ - and v $\Delta\Delta\Delta$ -vaccinated mice secreted significantly less cytokines. Again, no significant difference was observed between the double and triple gene deletion viruses.

3.5. Double and triple gene deletion viruses induce lower neutralising antibody titres

The poorer immunogenicity of the double and triple gene deletion viruses might also be due to altered antibody responses. To investigate this possibility, sera were collected from mice one month post-i.d. vaccination and the VACV-specific antibody titres and VACV-specific neutralising titres were measured by ELISA and plaque reduction neutralisation respectively. The titre of VACV-specific antibodies measured by ELISA was not different between the groups of vaccinated mice and good antibody levels were induced in all cases (Fig. 5a). The same was not true, however, when the titre of neutralising serum antibodies was measured by plaque reduction neutralisation assay. In this case the ND₅₀ of sera from both the v $\Delta\Delta$ - and v $\Delta\Delta\Delta$ -vaccinated mice was significantly lower than that from both vWT and v Δ N1-vaccinated mice, although there was no significant difference between the double and triple gene deletion viruses (Fig. 5b).



[Fig. 5](#)

Humoral responses one month post-vaccination. Antibody responses of C57BL/6 mice ($n = 5$) were measured one month post-vaccination with 10^4 p.f.u. of the indicated viruses in both ear pinnae. (a) Serum antibody end-point titres against VACV proteins were determined by ELISA. End-point titres were defined as the reciprocal serum dilution giving twice the optical density obtained from BSA. (b) The neutralisation capacity of antibodies in the serum was assessed by plaque-reduction neutralisation against VACV strain WR intracellular mature virus. The median value for each population is represented by a horizontal black bar. Statistical analyses were performed using the Student's *t*-test. ** $P < 0.01$, ns: not significant. Experiments were conducted at least 3 times and representative data are shown.

[Go to:](#)

4. Discussion

Inducing a robust innate immune response is an important step to designing an immunogenic vaccine and this is often achieved by the addition of a vaccine adjuvant. However, a full understanding of how the innate immune system impacts immune memory is lacking and would greatly enhance our ability to rationally design vaccines with enhanced immunogenicity profiles. VACV-based vectors are popular candidates, however their genomes still encode proteins with a known role in dampening the host innate immune response, which may negatively impact their potential use as vaccine vectors. Indeed, the deletion of numerous VACV immunomodulatory genes has been shown to enhance immunogenicity including the chemokine-binding protein A41 [21], [32], the IL-1 β -binding protein B15 [21], [36], the inhibitor of MHC class II antigen presentation A35 [37], the IL-18-binding protein C12 [38], the type I (B18) and type II (B8) IFN-binding proteins [39], the IRF3/7 inhibitor C6 [11], [12], the NF- κ B inhibitor and anti-apoptotic protein N1 [10], the dual NF- κ B and IRF3/7 inhibitor K7 ([13] and Ren et al., unpublished results) and the TLR signalling inhibitor A46 [40]. Data presented here demonstrate that deletion of three of these genes (*N1L*, *C6L* and *K7R*) in combination from VACV WR did not further enhance the immunogenicity and in fact provided poorer protection than the single gene deletion viruses. These data highlight that in the context of a replicating vaccine vector there is a fine balance between viral attenuation and immunogenic potential.

Given that $v\Delta\Delta$ and $v\Delta\Delta\Delta$ are sequentially more attenuated than $v\Delta N1$ (Fig. 2) they may have generated lower antigen levels and/or been cleared more quickly by the host immune system and hence induced a weaker adaptive response. The importance of antigen availability for the formation of CD8 $^+$ T cell-dendritic cell interaction kinetics and the ensuing memory response was demonstrated recently [41]. Of further interest, the inferior CD8 $^+$ T cell responses and neutralising antibody titres observed with $v\Delta\Delta$ and $v\Delta\Delta\Delta$ were not significantly different between these two viruses, however $v\Delta\Delta\Delta$ provided worse protection than $v\Delta\Delta$ in the challenge studies (Fig. 3). These data may indicate that other aspects of immune memory such as CD4 $^+$ T cells, or the recently identified memory NK cells [42] may play an important role in determining vaccine efficacy of VACV. Whether equivalent protection to WT or $v\Delta N1$ vaccination could be achieved by increasing the vaccination dose of $v\Delta\Delta$ and $v\Delta\Delta\Delta$ warrants further investigation.

A recent study using an MVA vector expressing HIV-1 antigens (MVA-B) in the context of a DNA prime/MVA boost regime found that the deletion of *C6L* and *K7R* in combination enhanced the magnitude and quality of HIV-1-specific CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cell responses in

mice, as well as Env antibody levels compared to the parental MVA-B vector and MVA-B lacking *C6L* alone [13]. These data demonstrate that in the context of a non-replicating strain of VACV, the deletion of more than one immunomodulatory gene may be beneficial. What is not clear from this study, however, is whether these memory responses would have been achieved with the deletion of *K7R* alone, because an MVA-B *K7R* single deletion was not included. Furthermore, whether these correlates of protection will translate to protection in an *in vivo* challenge model remains to be determined. Another recent study, also based on an MVA vector expressing HIV-1 antigens, found enhanced HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses as well as Env-specific antibody responses in rhesus macaques with a vector lacking 4 immunomodulatory proteins [20]. However again this vector was not compared to single gene deletions and protection was not determined by a challenge experiment.

Mounting evidence indicates an important role for type I IFN [43], [44] in vaccine immunogenicity and each of the proteins selected for this study inhibits type I IFN production. Furthermore, the importance of NF- κ B in generating robust memory immune responses was demonstrated recently for N1, an inhibitor of NF- κ B and apoptosis. By vaccinating mice with viruses encoding N1 mutants that were competent for only one of these functions it was demonstrated that the anti-NF- κ B activity of N1 was important for the enhanced protection observed with v Δ N1, with no apparent contribution of its anti-apoptotic function [35]. These types of studies demonstrate how viruses lacking innate immunomodulators can be utilised as tools to further our understanding of the relationship between innate immunity and immune memory, which will be important for future vaccine design.

[Go to:](#)

Appendix A. Supplementary material

Supplementary figures:

[Click here to view.](#) (293K, pptx)

[Go to:](#)

References

1. Smith G.L., Mackett M., Moss B. Recombinant vaccinia viruses as new live vaccines. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1984;**2**:383–407. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Walsh S.R., Dolin R. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vacc.* 2011;**10**:1221–1240. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Wyatt L.S., Earl P.L., Eller L.A., Moss B. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;**101**:4590–4595. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

4. Gomez C.E., Najera J.L., Krupa M., Esteban M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther.* 2008;**8**:97–120. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Gilbert S.C. Clinical development of modified vaccinia virus ankara vaccines. *Vaccine.* 2013;**31**:4241–4246. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Smith G.L., Benfield C.T., de Motes C. Maluquer, Mazzon M., Ember S.W., Ferguson B.J. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol.* 2013;**94**:2367–2392. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Goubau D., Deddouche S., e Sousa C. Reis. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 2013;**38**:855–869. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Sumner R.P., de Motes C. Maluquer, Veyer D.L., Smith G.L. Vaccinia virus inhibits NF-kappaB-dependent gene expression downstream of p65 translocation. *J Virol.* 2014;**88**:3092–3102. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Garcia-Arriaza J., Esteban M. Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity. *Hum Vacc Immunother.* 2014;**10**:2235–2244. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Ren H., Ferguson B.J., de Motes C. Maluquer, Sumner R.P., Harman L.E., Smith G.L. Enhancement of CD8(+) T-cell memory by removal of a vaccinia virus nuclear factor-kappaB inhibitor. *Immunology.* 2015;**145**:34–49. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Sumner R.P., Ren H., Smith G.L. Deletion of immunomodulator C6 from vaccinia virus strain Western Reserve enhances virus immunogenicity and vaccine efficacy. *J Gen Virol.* 2013;**94**:1121–1126. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Garcia-Arriaza J., Najera J.L., Gomez C.E., Tewabe N., Sorzano C.O., Calandra T. A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PLoS ONE.* 2011;**6**:e24244. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Garcia-Arriaza J., Arnaez P., Gomez C.E., Sorzano C.O., Esteban M. Improving adaptive and memory immune responses of an HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B by deletion of vaccinia virus genes (C6L and K7R) blocking interferon signaling pathways. *PLoS ONE.* 2013;**8**:e66894. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Cooray S., Bahar M.W., Abrescia N.G., McVey C.E., Bartlett N.W., Chen R.A. Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol.* 2007;**88**:1656–1666. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Kalverda A.P., Thompson G.S., Vogel A., Schroder M., Bowie A.G., Khan A.R. Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3. *J Mol Biol.* 2009;**385**:843–853. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Graham S.C., Bahar M.W., Cooray S., Chen R.A., Whalen D.M., Abrescia N.G. Vaccinia virus proteins A52 and B14 share a Bcl-2-like fold but have evolved to inhibit NF-kappaB rather than apoptosis. *PLoS Pathog.* 2008;**4**:e1000128. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Bartlett N., Symons J.A., Tschärke D.C., Smith G.L. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J Gen Virol.* 2002;**83**:1965–1976. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Unterholzner L., Sumner R.P., Baran M., Ren H., Mansur D.S., Bourke N.M. Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS Pathog.* 2011;**7**:e1002247. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Benfield C.T., Ren H., Lucas S.J., Bahsoun B., Smith G.L. Vaccinia virus protein K7 is a virulence factor that alters the acute immune response to infection. *J Gen Virol.* 2013;**94**:1647–1657. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Garber D.A., O'Mara L.A., Gangadhara S., McQuoid M., Zhang X., Zheng R. Deletion of specific immune-modulatory genes from modified vaccinia virus Ankara-based HIV vaccines engenders improved immunogenicity in rhesus macaques. *J Virol.* 2012;**86**:12605–12615. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Garcia-Arriaza J., Najera J.L., Gomez C.E., Sorzano C.O., Esteban M. Immunogenic profiling in mice of a HIV/AIDS vaccine candidate (MVA-B) expressing four HIV-1 antigens and potentiation by specific gene deletions. *PLoS ONE.* 2010;**5**:e12395. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Falkner F.G., Moss B. Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol.* 1988;**62**:1849–1854. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Parkinson J.E., Smith G.L. Vaccinia virus gene A36R encodes a M(r) 43–50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus. *Virology.* 1994;**204**:376–390. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Schroder M., Baran M., Bowie A.G. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J.* 2008;**27**:2147–2157. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Ferguson B.J., Benfield C.T., Ren H., Lee V.H., Frazer G.L., Strnadova P. Vaccinia virus protein N2 is a nuclear IRF3 inhibitor that promotes virulence. *J Gen Virol.* 2013;**94**:2070–2081. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Williamson J.D., Reith R.W., Jeffrey L.J., Arrand J.R., Mackett M. Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route. *J Gen Virol.* 1990;**71**:2761–2767. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Alcami A., Smith G.L. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell.* 1992;**71**:153–167. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

28. Tscharke D.C., Smith G.L. A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *J Gen Virol.* 1999;**80**:2751–2755. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Tscharke D.C., Reading P.C., Smith G.L. Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J Gen Virol.* 2002;**83**:1977–1986. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Tscharke D.C., Karupiah G., Zhou J., Palmore T., Irvine K.R., Haeryfar S.M. Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J Exp Med.* 2005;**201**:95–104. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Tscharke D.C., Woo W.P., Sakala I.G., Sidney J., Sette A., Moss D.J. Poxvirus CD8+ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J Virol.* 2006;**80**:6318–6323. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Clark R.H., Kenyon J.C., Bartlett N.W., Tscharke D.C., Smith G.L. Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy. *J Gen Virol.* 2006;**87**:29–38. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Law M., Putz M.M., Smith G.L. An investigation of the therapeutic value of vaccinia-immune IgG in a mouse pneumonia model. *J Gen Virol.* 2005;**86**:991–1000. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Putz M.M., Midgley C.M., Law M., Smith G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat Med.* 2006;**12**:1310–1315. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. de Motes C. Maluquer, Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W. Inhibition of apoptosis and NF-kappaB activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS Pathog.* 2011;**7**:e1002430. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Staib C., Kisling S., Erfle V., Sutter G. Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol.* 2005;**86**:1997–2006. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Rehm K.E., Roper R.L. Deletion of the A35 gene from modified vaccinia virus ankara increases immunogenicity and isotype switching. *Vaccine.* 2011;**29**:3276–3283. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Falivene J., Zajac M.P. Del Medico, Pascutti M.F., Rodriguez A.M., Maeto C., Perdiguero B. Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18 binding protein. *PLoS ONE.* 2012;**7**:e32220. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Gomez C.E., Perdiguero B., Najera J.L., Sorzano C.O., Jimenez V., Gonzalez-Sanz R. Removal of vaccinia virus genes that block interferon type I and II pathways improves

- adaptive and memory responses of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C in mice. *J Virol.* 2012;**86**:5026–5038. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Perdiguero B., Gomez C.E., Di Pilato M., Sorzano C.O., Delaloye J., Roger T. Deletion of the vaccinia virus gene A46R, encoding for an inhibitor of TLR signalling, is an effective approach to enhance the immunogenicity in mice of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C. *PLoS ONE.* 2013;**8**:e74831. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Henrickson S.E., Perro M., Loughhead S.M., Senman B., Stutte S., Quigley M. Antigen availability determines CD8(+) T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity.* 2013;**39**:496–507. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Gillard G.O., Bivas-Benita M., Hovav A.H., Grandpre L.E., Panas M.W., Seaman M.S. Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes. *PLoS Pathog.* 2011;**7**:e1002141. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Le Bon A., Tough D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol.* 2002;**14**:432–436. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
44. Huber J.P., Farrar J.D. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology.* 2011;**132**:466–474. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

[Infect Immun.](#) 2004 Oct; 72(10): 5535–5547.

doi: [10.1128/IAI.72.10.5535-5547.2004](https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5535-5547.2004)

PMCID: PMC517600

PMID: [15385450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15385450/)

Enteric Pathogens as Vaccine Vectors for Foreign Antigen Delivery

[Camille N. Kotton*](#) and [Elizabeth L. Hohmann](#)

[Author information](#) [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Live attenuated bacteria are attractive vaccine vectors that can elicit host immune responses to foreign antigens. Bacterial vectors may mimic natural infection and therefore interact with the mucosal, humoral, and cellular compartments of the immune system. A plethora of foreign (heterologous) antigens derived from bacterial, fungal, viral, or parasitic organisms have been expressed within bacterial vectors. Delivery of contraceptive and tumor antigens, cytokines, and adjuvants has also been explored. The result is a type of “vaccine factory” (29) in which the bacterial vector produces a foreign protein. Since bacterial vectors replicate within the host, it is hoped that they provide sustained exposure to the antigen, potentially augmenting the type and level of immune response. In addition, bacteria naturally possess immunostimulatory molecules such as lipopolysaccharide (LPS) and flagella that can stimulate immune responses (56). Internationally, there are three live bacterial vaccines commercially available and in clinical use: *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR, and *Mycobacterium bovis* BCG. These strains plus many other attenuated strains have been used as vectors to express heterologous antigens. Live bacterial vector vaccines have been evaluated in numerous animal and human studies, but there are currently no licensed live bacterial vector vaccines being used clinically.

The most compelling rationales for the development of live bacterial vectors are the possibility of oral delivery and protection at mucosal surfaces. This review will cover attenuated bacterial enteric pathogens used as vectors to express foreign (heterologous) antigens, with emphasis on those that have reached clinical study, including *Salmonella*, *Shigella*, *V. cholerae*, and *Listeria*. This review will not cover bacterial vectors used to deliver DNA vaccines or subunit and conjugate vaccines.

[Go to:](#)

LIVE BACTERIAL VECTORS IN HUMANS

Live bacterial vectors offer many potential clinical advantages. They are easy and relatively inexpensive to produce; they are also well suited to large-scale manufacture and potentially stable without refrigeration (via lyophilization), are able to carry large or multiple antigens

or adjuvants, and can be eradicated with antibiotics should the need arise. These attributes may make these vaccinations more available to the developing world. Compared to injectable vaccines, oral delivery should result in increased compliance, safety, and ease of administration. Eliciting mucosal, cellular, and humoral immunity is desirable for protection against many of the organisms that infect at mucosal surfaces, such as human immunodeficiency virus (HIV) and other important gastrointestinal, genital, and respiratory pathogens. Attenuation can be accomplished through the deletion of different genes, including virulence, regulatory, and metabolic genes. Some attenuated bacterial vectors have already been evaluated in humans, as discussed below.

Potential pitfalls of live bacterial vectors include possible systemic dissemination, transmission to contacts of the recipient, unanticipated or undesirable immune responses, and environmental contamination. Systemic dissemination and illness could occur in either healthy or immunocompromised individuals. Postinfectious reactions are possible, including arthritis, uveitis, and urethritis, that are similar to those seen after natural enteric infections such as campylobacteriosis ([108](#)) or salmonellosis ([144](#)), although these are not necessarily limited to live vaccines, as exemplified by a recent description of oculorespiratory symptoms after immunization with inactivated split virus influenza vaccine ([125](#)). Environmental contamination or inadvertent spread of the live bacterial strain necessitates evaluation of these possibilities during the development of live vectors.

[Go to:](#)

STIMULATION OF THE IMMUNE SYSTEM

Parenteral vaccines elicit primarily a humoral (antibody) immune response ([86](#)). Although successful for a variety of systemic pathogens ([111](#)), it has been hoped that mucosal vaccines may provide a more physiological and effective protective immune response, since it is estimated that 90% of human infections are initiated at mucosal surfaces ([73](#)). Bacterial vaccine vectors induce the production of multiple cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF- α), gamma interferon (IFN- γ), and interleukin-12 (IL-12), and proinflammatory mediators such as nitric oxide, which enhance early innate immunity and create a local environment favorable to antigen presentation ([31](#)). An ideal vector should stimulate both strong primary and lasting memory immune responses.

Mucosal immunity collectively accounts for more than two-thirds of the activity of the entire immune system, based on considerations of the numbers of immunocompetent cells, the extent of the mucosal tissues, and the quantities of immunoglobulins produced at these sites ([114](#)). Mucosal immunity is distinguished from systemic immunity by the abundance of secretory immunoglobulin A (IgA) and a dedicated cellular response. In the gut lumen, the most important protective antibodies include those that inactivate soluble toxic protein products of bacteria (antitoxins), facilitate phagocytosis and intracellular digestion of bacteria (opsonins), interact with components of serum complement and lysozyme to damage the bacterial membrane with resultant bacteriolysis (lysins, as with gram-negative infections), prevent proliferation or invasion of infectious virus (neutralizing antibodies, as with polio), or interact with components of the bacterial surface to prevent adhesion to mucosal surfaces (anti-adhesins, as with *Escherichia coli* or *V. cholerae*) ([91](#)).

Development of immunity to *Salmonella* infections relies on the cellular, humoral, and mucosal arms of the immune system (88). Although the role of humoral immunity has been long appreciated, recent work has explored the specifics of cellular responses. Separate studies in primates with serovar Typhi Ty21a and with *Salmonella* vectors expressing simian immunodeficiency virus antigens show that CD8⁺ cellular immunity is increased after immunization with *Salmonella*, specifically in the intestinal T-cell population that is positive for the intestinal homing receptor $\alpha_4\beta_7$ (39, 87), and “homes” to and resides within the intestinal compartment (Table 1). Other studies in humans with serovar Typhi Ty21a demonstrate that immunization elicits a specific CD8⁺ cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) response (122). Serovar Typhi CVD908-*htrA* also elicits both a CD4⁺ and a CD8⁺ cellular immune response in humans (123). Attenuated serovar Typhi vaccines delivered intranasally in mice also stimulate CD8⁺ major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CTLs (103).

TABLE 1.

Human studies of *S. enterica* vectors expressing a foreign antigen^a

TABLE 1.

Human studies of *S. enterica* vectors expressing a foreign antigen^a

Serovar	Parent strain	Vaccine strain	Genetic mutation(s)	Foreign antigen expressed	No. of volunteers	No. of volunteers with IgG response to:		Reference
						Vector	Foreign antigen	
Typhi	Ty21a	5076-1C (different lots)	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen	<i>S. sonnei</i> LPS	60	NA	12/56	15
Typhi	Ty21a	5076-1C	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen	<i>S. sonnei</i> LPS	16	NA	3	58, 136
Typhimurium	ATCC 14028	LH1160	<i>phoP</i> , <i>phoQ</i> , <i>purB</i>	<i>H. pylori</i> urease	6	5	3	3
Typhi	Ty21a	EX645	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen	<i>V. cholerae</i> LPS O antigen	10	7	3	43
Typhi	Ty21a	EX645	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen	<i>V. cholerae</i> LPS O antigen (with challenge)	14	14	1	130
Typhi	Ty21a	EX645	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen	<i>V. cholerae</i> O antigen	61	NA	NA	5
Typhi	Ty21a	EX880	<i>galE</i> , <i>rpoS</i> , Vi antigen <i>rfb</i>	<i>V. cholerae</i> O antigen	80	NA	NA	5, 7
Typhi	Ty2	CVD908	<i>aroC</i> , <i>aroD</i> , <i>rpoS</i>	<i>P. falciparum</i> CSP	10	10	2	53
Typhi	Ty2	CVD908- <i>htrA</i>	<i>aroC</i> , <i>aroD</i> , <i>htrA</i> , <i>rpoS</i>	Tetanus toxin	20	4/9 ^b	3	131
Typhi	Ty2	γ4632	<i>cya</i> , <i>crp</i> , <i>cdt</i> , <i>asd</i> , <i>rpoS</i>	Hepatitis B	40	24	0	132
Typhi	Ty2	γ4632	<i>cya</i> , <i>crp</i> , <i>cdt</i> , <i>asd</i> , <i>rpoS</i>	Hepatitis B (oral)	7	6	0	94
Typhi	Ty2	γ4632	<i>cya</i> , <i>crp</i> , <i>cdt</i> , <i>asd</i> , <i>rpoS</i>	Hepatitis B (rectal)	6	1	1	94

Only IgG responses in serum are shown, since other immunological tests were not consistently performed and IgG responses in serum to vector and foreign antigen were usually determined. A denominator in the response column implies that not all volunteers had test results. These studies differ greatly with regard to methodologies and study designs, and this table is presented only as a compilation of study references without implied comparisons.

^bOnly data from highest inocula given.

The intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* also induces both mucosal and systemic immunity. When *L. monocytogenes* was used in early work in mice to express *E. coli* β-galactosidase, a CD8⁺ cellular immune response to the foreign protein was found (124). A murine study showed that oral inoculation of *L. monocytogenes* expressing HIV-1-Gag induced mucosal and systemic CTL-mediated immunity to the viral antigen (107). In the only published human trial to date, humoral, mucosal, and cellular immune responses to attenuated *L. monocytogenes* were all detected in individual volunteers (4).

The type of immunity that is elicited by bacterial vectors depends on both the vector used and the “biological details” of foreign antigen expression. For example, *V. cholerae* is

noninvasive and elicits mostly a secretory IgA and serum vibriocidal antibody response, whereas the more invasive salmonellae will elicit mucosal, humoral, and systemic immunity, and *Listeria* tends to elicit a predominantly cellular response. Although it is presumed that the immunity a host engenders against the foreign antigen will be similar to that raised by the vector, this may not always be true, since host responses may be strongly influenced by factors such as method of foreign antigen expression and secretion.

[Go to:](#)

EFFECT OF PREVIOUS EXPOSURE TO BACTERIAL VECTORS

Recipients of live attenuated vaccines may have had prior exposure to enteric pathogens that are used as vectors (sometimes this prior exposure is called “vector priming”). Whether this previous exposure increases or decreases the immune response to a vectored antigen remains to be determined and may be specific to vector and antigen. Preexisting immunity against the vaccine vector could enhance presentation of the foreign antigen to T cells by mechanisms such as enhanced uptake of antibody-coated recombinant bacteria by antigen-presenting cells, by altering the cytokine milieu during presentation, or by direct cell-cell interactions. Studies of vector priming in animals and humans have produced conflicting data ([73](#)).

Most work on vector priming in animals has been done in BALB/c mice, a line with genetically determined susceptibility to intracellular pathogens. Using *S. enterica* serovar Dublin *aroA* vectors, two studies have demonstrated some improvement in response to foreign antigen delivered orally or systemically to vector-primed hosts ([8](#), [141](#)). Other groups, using *S. enterica* serovar Typhimurium *aroA* or the naturally attenuated *S. stanley*, concluded that prior exposure to the vector compromises both serum and intestinal antibody responses to a range of foreign antigens ([6](#), [74](#), [112](#), [138](#), [139](#)). Bouwer et al. showed that previous exposure of BALB/c mice to *L. monocytogenes* did not inhibit the development of a primary CTL response to an epitope delivered by an *L. monocytogenes* vector ([17](#)).

Human data on vector priming is also conflicting. When serovar Typhi Ty21a is given as a vaccine, the immune response inversely correlates with the preimmunization IgA anti-LPS antibody titer ([86](#)). Similarly, when serovar Typhi Ty21a was used to express *V. cholerae* O antigen in a large human study, volunteers with higher prevaccine titers against *V. cholerae* were less likely to develop significant bactericidal responses against *V. cholerae* after immunization ([5](#)). However, in a study of women who were orally and rectally vaccinated with serovar Typhi Ty21a, researchers found that *Salmonella*-specific antibodies in the human female genital tract induced by primary vaccination could be enhanced by subsequent rectal administration of these vaccines ([82](#)). In a recent trial with serovar Typhi Ty21a expressing *H. pylori* ureases A and B, one volunteer with prior immunity to the carrier appeared to have an enhanced immune response to the foreign antigen ([19](#)). Further human studies are needed to clarify the significance of vector priming.

[Go to:](#)

BALANCE BETWEEN IMMUNOGENICITY AND ATTENUATION IN ATTENUATED BACTERIAL STRAINS

Balancing immunogenicity and attenuation of vectors may be difficult. Excessive attenuation of the bacterial vector can render it poorly immunogenic, as seen in our human study of Ty445, a serovar Typhi Ty2 strain with *phoP/phoQ aroA* deleted (only 2 of 14 volunteers receiving Ty445 seroconverted) (62). Inadequate attenuation may result in excessive reactogenicity or symptomatic infection, especially in immunocompromised hosts.

Vectors that seem highly attenuated in animals do not always result in a lack of reactogenicity in humans. In trying to improve upon Ty21a, Hone et al. constructed a *galE* mutant in serovar Typhi Ty2 (Ty2H1) which was serum sensitive and highly attenuated in the mouse hog gastric mucin virulence assay compared to the Ty2 parent strain (64). When four human volunteers ingested 7×10^8 CFU of this strain, two became ill and developed a typhoid fever-like illness with fever and bacteremia. The authors of that study concluded that the *galE* mutation alone did not adequately attenuate serovar Typhi Ty2 for human use. Similar results occurred with a *Shigella* vaccine strain CVD1203, derived from wild-type *S. flexneri* 2a by introducing deletions in chromosomal *aroA* and invasion plasmid *virG*. This strain was highly attenuated in the guinea pig conjunctival sac challenge (Serény) model. Two 10^9 CFU orogastric doses (2 weeks apart) stimulated production of secretory IgA antibodies to *S. flexneri* 2a and protected against conjunctival challenge with virulent *S. flexneri* 2a (99). When given to humans, a single dose of CVD1203 at 10^6 , 10^8 , or 10^9 CFU resulted in self-limited (<48-h duration), objective reactogenicity (fever, diarrhea, or dysentery) in 0, 18, and 72% of subjects, respectively, and in no placebo recipients. The majority of volunteers in each group did develop IgA-producing anti-LPS antibody-secreting cells (ASCs), but the reactogenicity of the vaccine was not predicted by the animal model (78) data.

The specific attenuation(s) chosen for a vaccine vector strain can have a significant impact on its immunogenicity (13, 27, 36, 134, 137, 142). For example, *Salmonella* PhoP-null mutants are more efficiently processed by macrophages in vitro than wild-type bacteria; salmonellae constitutively expressing PhoP (PhoPc) are processed even less efficiently than wild-type salmonellae (142). The altered processing and presentation efficiency is not due to differences in the level of antigen expressed by the bacteria or differences in the level of bacterial uptake by the macrophages. Paradoxically, *Salmonella* PhoPc mutants have been shown to be highly immunogenic vectors for delivery of papillomavirus antigens in mice (11, 95). Although the *Salmonella* PhoPc mutant was more efficient at infecting dendritic cells in vitro than the wild type and the *phoP* and *aroA* mutants, PhoPc mutants induced significantly less IL-10, suggesting that this mutant suppressed the secretion of IL-10 by dendritic cells and may result in a stronger cell-mediated immune response than the other attenuations (33). These data not only demonstrate a role for virulence loci in directing induction of specific immune responses (142) but also highlight the idiosyncratic nature of antigen-vector combinations.

Recent work with a panel of purine (*purEK* and *purHD*) and guanine (*guaAB*) auxotrophs in *S. flexneri* 5 was undertaken to maximize immunogenicity and minimize reactogenicity. The best vaccine candidate in mice was the *S. flexneri* 5 *guaAB purHD* strain, which was markedly attenuated but still induced proinflammatory cytokines and factors such as IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor alpha, and inducible nitric oxide synthase. This strain upregulated cytokines such as IL-12 and IFN- γ and also highly stimulated MHC class II

expression, suggesting activation of innate immunity (21). A detailed comparison of rationally designed attenuated mutants would be ideal, but a lack of good animal models makes vector development an empirical business requiring human clinical studies.

[Go to:](#)

OPTIMIZING EXPRESSION: CODONS, PLASMIDS, AND CHROMOSOMES

Expression of foreign antigens in live bacterial vectors can be complicated. The possibility of improper protein folding, lack of posttranslational modification, degradation of foreign proteins by bacterial proteases, inclusion of toxic protein sequences, lack of proper secretion, or ineffective presentation to the immune system can lead to the induction of nonprotective immune responses or the complete abolition of immune responses. Choice of promoter, localization within the vector, construction of protein fusions to promote secretion, codon optimization for a bacterial host, and plasmid copy number can all affect foreign antigen expression.

Differences in codon usage between organisms can have a significant impact on heterologous protein production. A gene with a codon usage different from the targeted bacterial host can have poor expression in that particular host. The presence of rare codons in cloned genes can affect protein expression level and mRNA and plasmid stability. In some cases, rare codons can inhibit protein synthesis and cell growth. Although more often cited for DNA vaccine work, codon optimization of tetanus toxin fragment C expressed by serovar Typhimurium *aroA* resulted in protection of orally immunized mice against an otherwise-lethal tetanus toxin challenge (40).

Foreign antigens may be expressed from a chromosomal integration or from a plasmid. Chromosomal integration of single gene copies generally increases the stability of the foreign antigen genes but reduces antigen mass compared to multicopy plasmids. A single chromosomal gene copy may be adequate when stable proteins are expressed from strong promoters in a highly immunogenic vector, as in the case of an *L. monocytogenes* strain expressing HIV gene products under the control of the hemolysin promoter (89). This *Listeria* construct was able to induce Th1-type HIV-Gag specific CD4⁺ T cells in mice. Cells were of the Th1 phenotype and produced IFN- γ at levels similar to CD4⁺ T cells directed against an endogenous listerial antigen. However, another group reported 50-fold less antigen production and no immune responses in mice after receipt of serovar Typhimurium bearing a chromosomal integration of the HIV-1 gp120 gene compared to a similarly attenuated strain expressing the same antigen from a multicopy *asd*-stabilized plasmid (44). Other investigators reported 10-fold-lower production of a fusion protein composed of the cholera toxin B subunit (CT-B) and the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in vitro in a *V. cholerae* chromosomal integration strain compared to their *glnA* balanced lethal plasmid strain (121). Decreased antigen expression correlated with a decreased immune response in mice. In a different study, these authors reported 100- to 1,000-fold-greater expression of the foreign antigen from a plasmid-bearing strain compared to the chromosomal integration strain, as well as a greater immune response in mice (118); another group showed similar findings with *E. coli* mutant heat-labile enterotoxin in serovar Typhimurium in mice (27).

For ease of manipulation and copy number effects, plasmids are often used in bacterial vectors. An optimal plasmid is stable in vivo, has a copy number which supports vigorous antigen production but does not compromise the growth rate or metabolism of the vector (48), is nonconjugative, and has a narrow host range. Antibiotic resistance genes are in general proscribed in clinical products. Attempts to optimize plasmid-based expression systems have resulted in several clever ideas that are discussed below.

[Go to:](#)

PLASMID STABILITY

To be effective, an antigen-encoding plasmid must be retained by the vector microorganism. Although antibiotic pressure works well for plasmid maintenance in vitro, this selective pressure is not present in vivo. Balanced lethal host-vector systems ensure that plasmid is maintained in the bacterial vector by requiring that the proteins expressed by the plasmid are essential for survival of the vector. A classic example is the *asd* system. A deletion of the chromosomal aspartate-semialdehyde dehydrogenase (*asd*) gene is made in the bacterial vector, resulting in an absolute requirement for diaminopimelic acid, an essential component of the peptidoglycan of the cell wall of gram-negative bacteria that is not found in mammalian hosts. The *asd* gene is supplied on a plasmid and complements the mutation. In the original work describing this system in serovar Typhimurium, the plasmid was stable in the absence of any exogenous selective pressure in vitro or in vivo (30). The system has since been used to express varied foreign antigens in both murine and human studies (94). A similar system is the *glnA* balanced lethal system in *V. cholerae* (121).

The *hok-sok* system, initially developed for use in serovar Typhi, is similar to the balanced lethal system but does not require genetic manipulation of the vector organism. It was developed for use in serovar Typhi, since the *asd*-based plasmids, successfully used in serovar Typhimurium, were less successful at eliciting immunity to the foreign antigen in these strains (94, 132). This two-component toxin-antitoxin system or “killer locus” is based on the naturally occurring *hok-sok* postsegregational killing system on the *E. coli* antibiotic resistance factor pR1. Synthesis of Hok (a lethal pore-forming protein) is blocked by binding of a *sok* mRNA to *hok* mRNA. However, *sok* mRNA is highly susceptible to degradation, and its intracellular concentration must be maintained by constitutive transcription from plasmids carrying *hok-sok*. Thus, bacteria that lose these plasmids are postsegregationally killed when the levels of the protective *sok* mRNA rapidly drop, and the levels of the more stable toxin-encoding *hok* mRNA quickly lead to Hok synthesis and cell death (52). Unfortunately, some work showed that >50% of bacteria that lost the plasmid were still viable, suggesting that the presence of a *hok-sok* postsegregational killing system is not sufficient to ensure vector death (49). The highest levels of sustained synthesis of the test heterologous antigen were detected from expression plasmids carrying the full complement of maintenance functions, including at least one partition function that mediates pairing of plasmids at mid-cell and subsequently moves them to the cell poles before cell division. Although less successful than the *asd* balanced lethal system, this system is conceptually appealing. Other plasmid-based mechanisms that result in carefully choreographed, time-limited antigen secretion and/or programmed vector death can also be envisioned.

[Go to:](#)

HOST FITNESS AND PLASMID BURDEN: POOR HOUSEGUESTS?

Some part of a bacterial vector's metabolism is usurped by maintenance of an antigen-bearing plasmid, potentially compromising the vector's growth rate, fitness, persistence, and immunogenicity. Studies with *E. coli* have clearly established that plasmid-bearing bacteria grow more slowly than plasmid-less bacteria (16, 90). Since mucosal vaccines are sometimes designed to not replicate extensively in vivo, this is not always detrimental. Plasmid copy number has a significant impact on the survival and success of the bacterial vector. As the copy number increases, the toxicity to the vector increase as well (49) and the growth rate of such strains decreases. Similarly, as expression of heterologous genes increases, for example, by manipulation of promoter strength or promoter induction, the growth rate decreases further (14, 104, 143). Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) antigens expressed in *Shigella* resulted in a slowing of the intracellular growth rate and a decrease in invasiveness in HeLa cells (1). Covone et al. found that a serovar Typhimurium strain expressing mutant *E. coli* heat-labile enterotoxin with a high-copy-number plasmid underwent lysis in stationary phase, a phenomenon which was not observed with a medium-copy-number plasmid (27). Thus, there is a fine balance between adequate antigen production, toxicity, invasiveness, and immunogenicity.

[Go to:](#)

LOCATION, LOCATION, LOCATION

Expression of a foreign antigen on the outer surface of a bacterial vector or secretion of an antigen into the extracellular milieu (51, 59, 71) appears to be immunologically advantageous in many instances. Recent work in mice with serovar Typhimurium expressing the recombinant *Streptococcus pneumoniae* antigen PspA compared expression in the cytoplasm with secretion into the periplasm and culture supernatant. There was a 10^4 increase in IgG titer in animals that received the strain bearing a secreted antigen (70).

Foreign antigen genes may be fused with those of naturally occurring secreted bacterial protein(s). A popular system is the hemolysin A (HlyA) export-expression system of uropathogenic *E. coli*. Heterologous antigens are inserted into a truncated version of the HlyA protein and secreted by the hemolysin type I secretion apparatus. More than a dozen foreign antigens have used this secretion system successfully (50, 117).

The Lpp-OmpA system can successfully target foreign antigens to bacterial outer membrane. A fusion between the signal sequence and first nine N-terminal amino acids of the mature major *E. coli* lipoprotein (Lpp) and five transmembrane segments of the outer membrane protein A (OmpA) effectively exposes homologous and heterologous proteins on the external side of the *E. coli* outer membrane in vitro (45-47). This system has been used in attenuated serovar Typhimurium to express an immunodominant epitope of HIV transcriptase, resulting in mucosal IgA and cellular immune responses in mice (20).

The type III secretion system of *Salmonella* and *Yersinia* spp. has also been exploited for foreign antigen delivery (39, 55, 116). Upon bacterial contact with a eukaryotic cell, the *Salmonella* type III secretion system creates a hypodermic needle-like apparatus that

spans the bacterial envelope and “injects” proteins from the bacteria into the host cell. Type III secretion systems have been used as delivery mechanisms for vaccine antigens because effector proteins such as SopE directly access MHC class I-restricted, cytosolic antigen-processing pathways. SopE fusion proteins with H-2-restricted influenza virus epitopes expressed by *Salmonella* can effectively present influenza virus antigens to MHC class I-restricted T-cell hybridoma cells in vitro (3, 39, 116). *Salmonella* vectors expressing SopE fusion proteins with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) epitopes protected mice from fatal intracerebral challenge with LCMV (116).

The autotransporter secretion pathway of gram-negative bacteria has been used for the surface display of antigenic determinants (81). Autotransporters are expressed as a single polypeptide chain containing all of the features necessary to translocate an N-terminal passenger domain to the cell surface, which makes them attractive candidates for antigen display. For example, the autotransporter domain of the *E. coli* adhesion AIDA-I (for adhesin involved in diffuse adherence) was fused to a *Yersinia* heat shock protein and expressed in *E. coli* and serovar Typhimurium. This vaccine strain had high genetic stability in vivo and resulted in a pronounced cellular immune response in mice (81) vaccinated intragastrically. In a similar study, the same autotransporter domain was used to express both nearly full-length *H. pylori* UreA and defined T-helper-cell epitopes on the surface of attenuated serovar Typhimurium, which were much more protective vaccines in subsequent challenge experiments than a similar vaccine strain that expressed UreA in the cytoplasm (110).

The ice nucleation protein of *Pseudomonas syringae* is another cell surface display system that has been used for display of foreign antigens (84). The ice nucleation protein is an outer membrane protein that accelerates ice crystal formation in supercooled water and has been used to express large proteins at the cell surface. When used to express the foreign antigens hepatitis B surface antigen and the core protein of hepatitis C in serovar Typhi strain Ty21a, this expression system was able to elicit a much higher antibody response in mouse serum than a system that expressed antigens intracellularly (84).

Other methods to improve presentation to the immune system include fusions to the *E. coli* heat-labile LT-B (66), the MalE export signal (72), the *Salmonella* autotransporter MisL (113), and insertion of antigen into several cell surface proteins, including the main *Salmonella* flagellar component FliC (96) and the *E. coli*-derived P87 fimbriae (24), LamB (57), TolC (128), and PhoE (67).

[Go to:](#)

PROMOTERS

Choice of promoter can have a significant impact on the amount of antigen produced and on the immunogenicity of the vaccine. In early studies, strong constitutive promoters were often used with the expectation that “more is better.” Since constant antigen synthesis may result in decreased vector fitness, increased attenuation, and decreased immunogenicity (29), some recent work has focused on promoters that are in vivo inducible, such as the anaerobically inducible *nirB* (23) and *dmsA* (101) promoters. A recent comparison of seven different promoters in *Salmonella* used flow cytometry to quantify in vivo antigen levels

and to simultaneously monitor the early steps of antigen-specific T-cell responses in mice. The present study demonstrated that in vivo expression levels for an antigen can be rationally selected, perhaps allowing one to fine-tune and time the expression of foreign antigens (18) to direct specific immune responses. The *pagC* promoter was found to have especially high in vivo activity with low in vitro activity, which may explain why it has generated strong humoral immune responses in prior studies (18). John et al. evaluated the strong constitutive *tac* promoter, the in vivo-induced *htpG* promoter, and the in vivo-induced iron-regulated *irgA* promoter to express CT-B in *V. cholerae* strain Peru 2 (69). In vitro expression was greatest under the control of the *tac* promoter and the *irgA* promoter when under low-iron conditions. Interestingly, although the gut is a low-iron environment, the immune response in mice was much higher when the *tac* promoter was used. The failure of in vitro testing to predict in vivo responses is not unique to live bacterial vectors, but the complexity of living vectors interactions' with mammalian hosts adds to the challenge of developing this type of vaccine.

[Go to:](#)

ALTERNATIVE DELIVERY SITES

Although the majority of mucosal vaccines have been delivered orally, other mucosal sites, such as the nares, vagina, and colon, could also be used as delivery sites. Inoculation at one mucosal surface can confer immunity at other sites (56, 68, 82, 94), and the site of administration can have a significant impact on the type of immune response (68). Some studies evaluating live vectors for cancer immunotherapy have used intravenous administration of attenuated bacteria (22). Intranasal administration of mucosal vaccines has been popular in multiple animal models. Some studies report higher antibody titers via the intranasal route compared to oral inoculation (98). To our knowledge, there have been no published human trials in which live attenuated bacteria have been administered intranasally. Given the proximity of the central nervous system to the nares, complications of direct spread of an infection into the brain, i.e., “vector sinusitis,” could be of concern and might not be predictable from animal models. Although not a live vaccine, a recent inactivated intranasal influenza vaccine given with *E. coli* heat-labile toxin as a mucosal adjuvant was associated with Bell's palsy in humans, resulting in the vaccine being removed from the market (93).

Rectal vaccination has also been evaluated for attenuated enteric pathogens as vaccine vectors, with the hope that this route might be more immunologically relevant for important sexually transmitted pathogens. In 1996, Nardelli-Haeffliger et al. showed for the first time that it was possible to induce specific secretory IgA in the genital and rectal tracts of women by using an attenuated serovar Typhi χ 4632 *cya crp-cdt asd* expressing a gene encoding a hepatitis B virus core-pre-S protein vaccine strain given orally or rectally (94). These investigators found that the secretory IgA response was predominantly against the vector rather than the foreign antigen and that oral immunization was more effective than rectal immunization in inducing a systemic humoral response: while oral immunization induced seroconversion against *Salmonella* LPS in six of seven volunteers, only one of six women developed anti-LPS and anti-pre-S1 after rectal immunization. In another study of 26 women who underwent oral and/or rectal immunization with Ty21a, *Salmonella*-specific IgG and IgA antibodies were measured periodically in vaginal lavage and cervical

mucus. *Salmonella*-specific antibodies (especially IgA) were significantly increased in vaginal fluids and cervical mucus in seven women who were given an oral priming dose followed by rectal booster at 6 months (82). These results suggest that specific antibodies in the human female genital tract induced by primary oral vaccination can be boosted by subsequent rectal administration of vaccines. Human studies with CT-B-subunit conducted by Holmgren and coworkers (68) showed that a combination of nasal and vaginal immunization was the most effective way to induce genital tract IgA; results obtained with this unique adjuvant molecule may not extend generally to bacterial vectors.

[Go to:](#)

SPECIFIC ENTERIC PATHOGENS USED AS VECTORS

Salmonellae.

Salmonellae were among the first bacteria used as recombinant vectors for antigen delivery (29). In their seminal study in 1981, Formal et al. demonstrated that live, attenuated serovar Typhi Ty21a expressing a *Shigella* surface antigen protected mice against subsequent serovar Typhi and *S. sonnei* challenges (42). Salmonellae are the most commonly studied vectors, perhaps in part because of the ease with which they are genetically manipulated, the existence of the serovar Typhimurium BALB/c (NRAMP1^{-/-}) mouse model for preclinical work, and favorable prior human experience with the live attenuated vaccine U.S. Food and Drug Administration-approved vaccine for typhoid fever, Ty21a. Ty21a serves as an important safety benchmark for researchers undertaking clinical trials. Ty21a was created from Ty2, which has been maintained in laboratories since its isolation in 1918. Ty2, which is known to have a frameshift mutation in *rpoS* (28), underwent chemical mutagenesis with nitrosoguanidine to create Ty21a. Ty21a is known to be Vi antigen negative and harbors a *galE* mutation that results in altered biosynthesis of smooth LPS. Other mutations are suspected but not identified thus far; sequencing of Ty21a is currently under way (D. J. Kopecko and D. Q. Xu, unpublished data). Because Ty21a requires three or four doses to induce a significant protective immunity in two-thirds of people immunized (86), work has focused on developing a live attenuated serovar Typhi derivative that survives longer in the gut to trigger both a priming and booster immune response with a single dose. Recent work has shown that immunization of human volunteers with Ty21a elicits specific CD8⁺ CTL (87, 103, 122) and specific circulating mucosa-homing CD4⁺ and CD8⁺ T cells, almost all of which express the gut-homing integrin $\alpha_4\beta_7$ (87).

Serovar Typhi Ty21a has been used for the delivery of foreign antigens (42, 58). When *Helicobacter pylori* urease was expressed in serovar Typhi Ty21a (19), 10 of 12 human volunteers developed humoral immune responses to the *Salmonella* carrier, as detected by examining antigen-specific ASCs, but only two volunteers seroconverted to serovar Typhi LPS, as measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Five volunteers had positive responses in at least one of three assays for cellular responses to the vector (i.e., lymphoproliferation, IFN- γ secretion, and IFN- γ enzyme-linked immunospot [ELISPOT] assays), and three volunteers showed a weak but significant T-cell response to *H. pylori* urease. No volunteer had detectable humoral responses to urease.

Since Ty21a was constructed by general chemical and UV mutagenesis techniques (i.e., the strain contains uncharacterized mutations) and requires multiple doses, recent serovar

Typhi vaccine development efforts have focused on creating defined mutations that retain immunogenicity but allow for a more effective attenuation. Common attenuations in serovar Typhi include mutations that render the bacteria auxotrophic for nutrients that are scarce or absent in mammals (e.g., *purA* or *aro* mutations), mutations that alter important regulatory genes (e.g., *cya/crp*, *phoP/phoQ*, and *rpoS*), mutations in secretory function (e.g., *ssaV*), and temperature-sensitive mutations (e.g., *ts*) (56, 60). Often more than one defined deletion mutation has been introduced to minimize the chance of reversion to a wild-type virulent phenotype.

Defects in the aromatic amino acid synthesis pathway (including the *aroA*, *aroC*, and *aroD* genes) were one of the first attenuating mutations investigated, after an *aroA* mutant of serovar Typhimurium was shown to elicit protective immunity against fatal salmonellosis in a mouse model (63). Human studies of serovar Typhi Ty2 *aroC aroD* (CVD908) expressing the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) provided the first report of attenuated serovar Typhi eliciting a human serologic or a CTL response to a foreign protein. This investigational strain was well tolerated by 10 volunteers given two doses of 5×10^7 organisms 8 days apart. All 10 subjects developed serologic responses to O and H antigens of the live serovar Typhi vector, whereas three vaccinees responded to the foreign antigen: one developed an 80-fold rise in serum anti-sporozoite antibody, another had a 4-fold rise in antibody to a recombinant portion of CSP, and a third developed CSP-specific CD8⁺ CTL activity. Unfortunately, positive blood cultures and fevers were seen in some volunteers when early *aro* strains were administered to humans (65). Introduction of another mutation in the stress response gene *htrA* (133) appears to have eliminated this problem. The serovar Typhi strain CVD 908-*htrA*, with *aroC aroD* and *htrA* deleted, has been used in multiple human and animal studies. CVD908-*htrA* was used as a vector to deliver nontoxic fragment C of tetanus toxin to human volunteers. Although hampered by preexisting immunity to tetanus in healthy adults, increases in the levels of IgG antitoxin in serum were elicited in three of nine volunteers who received $\geq 10^8$ CFU doses of CVD908-*htrA*(pTETlpp) construct (131). Subjects who received the *S. enterica*-expressing C fragment had a decreased cellular and humoral response to serovar Typhi antigens compared to volunteers who ingested the parent strain without foreign antigen.

The *phoP/phoQ* locus provides an interesting target for vaccine design. This two-component regulatory locus is necessary for serovar Typhimurium survival within macrophages, defensin resistance, acid resistance, and murine typhoid fever pathogenesis (92). Serovar Typhi Ty2 *phoP/phoQ* mutants may have a more favorable side effect profile because of these phenotypes. Single doses of serovar Typhi Ty2 *phoP/phoQ* (Ty800) induced high-level immune responses in humans with a single dose and without adverse effects other than diarrhea in a small number of volunteers (61). Serovar Typhi Ty2 *phoP/phoQ* (Ty800) was engineered to express *H. pylori* urease from a *purB*-based balanced lethal plasmid system and evaluated in a human study. The majority of volunteers developed mucosal immunity (eight of eight by IgA ELISPOT) and humoral immunity to the vector (seven of eight by serum ELISA), but no volunteer had detectable mucosal or humoral immune responses to the urease antigen after immunization with single doses. A subset of three volunteers received an oral booster vaccination consisting of recombinant purified *H. pylori* urease A/B and *E. coli* heat-labile toxin B subunit 15 days after

immunization with the live vector. None of the three volunteers had detectable humoral or mucosal immune responses to urease (32). In subsequent work, an identically engineered serovar Typhimurium *phoP/phoQ purB*-expressing urease was given to human volunteers (3). Five of six volunteers seroconverted to serovar Typhimurium antigens and had strong evidence of anti-*Salmonella* mucosal immune responses by ELISPOT assay. Three of six (three of five who seroconverted to *Salmonella*) had immune responses in the most sensitive assay of urease-specific immunoglobulin production by blood mononuclear cells in vitro. Although not compared contemporaneously, attenuated serovar Typhimurium appeared more effective than identically attenuated serovar Typhi in engendering immune responses to urease. The data suggested that this could be due to a greater stability of antigen-expressing plasmid in serovar Typhimurium and/or prolonged intestinal colonization. Specific factors unique to nontyphoidal salmonellae may also have been important for stimulation of the gastrointestinal immune system, and raise the interesting question as to whether attenuated nontyphoidal salmonellae can be utilized as vectors for human vaccines.

Although most *Salmonella* vaccine strains have mutations in metabolic or regulatory genes, Hindle et al. (60) mutated a specific type III secretion system virulence factor *ssaV* to attenuate their strains of serovar Typhi and serovar Typhimurium. Both strains were well tolerated at escalating doses. The serovar Typhi strain provided better immune responses than the serovar Typhimurium strain, with six of nine volunteers developing anti-serovar Typhi LPS IgA ASC responses and three of three vaccinees receiving doses of 10^8 and two of three receiving 10^9 CFU, which elicited high-titer LPS-specific IgG levels in serum. Only volunteers immunized with 10^9 CFU of the serovar Typhimurium strain mounted detectable anti-serovar Typhimurium LPS-specific ASC responses, and serum antibody responses were variable. These data indicate that mutations in type III secretion systems may provide a route to the development of live vaccines in humans.

Shigellae and hybrids.

Shigellae spread cell to cell and do not usually result in deeper tissue spread and/or septicemia. Like listeriae, once internalized and free from the primary vacuole, shigellae move and reproduce in the host cytosol. This allows bacterial proteins to directly bind MHC class I molecules not normally available to intravacuolar bacteria. This results in the generation of CD8⁺ cells, which are necessary to control intracellular pathogens and viruses (56).

There are four clinically significant *Shigella* serogroups. Only *S. dysenteriae* serotype 1 causes severe dysentery due to Shiga toxin production. *S. flexneri* and *S. sonnei* are the most common agents of endemic shigellosis in the developing world, whereas *S. sonnei* is the most common serogroup found in industrialized countries (80). *S. boydii* and *S. dysenteriae* are less common agents of shigellosis. Limited animal models (predominantly the Serény guinea pig conjunctivitis model and primates) make preclinical studies of *Shigella*-vector vaccines difficult (56).

S. flexneri 2a is the most commonly used strain in vaccine work and, to our knowledge, is the only one that has been used to express foreign antigens. Thus far, there have been no published human trials involving *S. flexneri* expressing foreign antigens. *Shigella* strains have been attenuated by introducing mutations that alter the cytosolic proliferation

(*aroA*, *aroD*, *thyA*, *pur*, *iuc*, and *guaBA*), the ability to spread from cell to cell (*kcpA* and *virG/icsA*) (56), or the ability to produce enterotoxin (*sen* and *set*). Multiple mutations have been combined to try to maximize delivery of antigen to mucosal lymphoid tissues but minimize tissue damage and diarrhea. This has been difficult, perhaps in part because of the low infectious dose and high virulence of this organism.

The most experience has been with the CVD series, derived from *S. flexneri* 2a strain 2457T. *aroA* and *virB/icsA* are deleted in CVD1203, and CVD1203 has been shown to be immunogenic by stimulating secretory IgA antibodies and protective in the conjunctival sac challenge (Serény test) in guinea pigs (99). When used to deliver ETEC colonization factor antigen I (CFA/I) and colonization factor antigen CS3 in guinea pigs and mice, CVD1203 was able to elicit high titers of anti-*Shigella* LPS secretory IgA and anti-CS3 secretory IgA, as well as a strong serum IgG response against the ETEC antigens (but not against *Shigella* LPS) (98). In humans, CVD1203 (without a foreign antigen) was immunogenic, as measured by IgG LPS by ELISA and IgA-producing anti-LPS ASCs, and yet this strain was excessively reactogenic at higher doses (self-limited, objective reactogenicity [fever, diarrhea, or dysentery] developed in 0, 18, and 72% of subjects receiving, respectively, 10^6 , 10^8 , or 10^9 CFU) (78), indicating a need for further attenuation.

CVD1204 is the most extensively evaluated *Shigella* vaccine strain. It is a *guaBA* attenuated strain of *S. flexneri* 2a and thus has limited proliferation capacity in vivo due to the inactivation of purine metabolic pathway enzymes. It has been used to deliver foreign antigens in guinea pigs, including fragment C of tetanus toxin (2) and different ETEC antigens (1, 9, 75). CVD1204 was used to express fragment C of tetanus toxin either as a polypeptide expressed in the bacteria or as a DNA vaccine. Guinea pigs immunized intranasally with either recombinant strain mounted a IgG response in serum against fragment C of tetanus toxin and a secretory immune response against *S. flexneri* 2a LPS. The animals were protected against ocular challenge with wild-type *S. flexneri* 2a, demonstrating the ability of CVD1204 to serve both as a vector for foreign antigen delivery and as a mucosal *Shigella* vaccine (2).

With a goal of creating a multivalent *Shigella*-ETEC vaccine, a series of ETEC antigen-containing CVD1204 strains were created (1, 9, 75). The first strains expressed both ETEC CFA/I and one of two mutant heat-labile toxins (75). These strains elicited significant humoral immunity against *Shigella* and CFA/I but less immunity against either heat-labile toxin in guinea pigs. Challenge studies with wild-type *S. flexneri* 2a demonstrated protection in all animals. The present study demonstrated the feasibility of expressing multiple ETEC antigens on a single plasmid and the ability to raise immunity against both the vectored antigen and the bacterial host (75). Subsequent work with CVD1204 to express ETEC *E. coli* surface antigens CS2 and CS3 showed similar results (1). Finally, when guinea pigs were intranasally inoculated with five different CVD1204 strains containing plasmids expressing the ETEC colonization factors CFA/I, CS2, CS3, CS4, and LThK63, respectively, serum IgG and mucosal IgA immune responses were observed against each ETEC antigen, as well as the *Shigella* vector (9). The goal is to make a vaccine that is protective against both *Shigella* spp. and ETEC; Barry et al. propose using a mixture of five different *Shigella* strains, each expressing one or more ETEC antigens.

Strain SC602 (*S. flexneri* 2a *virB/icsA iuc iut*) is attenuated both in its capacity to move intra- and intercellularly and in its survival in tissues. SC602 has been found to be safe and protective in the macaque monkey model and in human volunteers. Seven volunteers who had been vaccinated 8 weeks earlier with a single dose of 10^4 CFU and 7 control subjects were challenged with 2×10^3 CFU of virulent *S. flexneri* 2a organisms (26). Six of the control volunteers developed shigellosis with fever and severe diarrhea or dysentery, whereas none of the vaccinees had fever, dysentery, or severe symptoms. Three vaccinees had mild diarrhea; these subjects had lower antibody titers than did the asymptomatic volunteers. SC602 is an example of an attenuated *S. flexneri* 2a candidate vaccine that provides protection against shigellosis in a stringent, human challenge model. In mice, SC602 has been successfully used to express a foreign antigen (the C3 neutralizing epitope of the poliovirus VP1 protein within the IpaC carrier protein) and to induce a serum and local antibody response (10). Significant mouse-to-mouse variability of the IgG immune response to C3 and IpaC was seen, and it was not felt that this provided an optimal mucosal vaccine.

Additional strains of *S. flexneri* 2a have been attenuated, but none have been used for foreign antigen expression thus far. CVD1205 is a *guaBA virG/icsA* deleted strain that has been evaluated in guinea pigs (97). CVD1207 is a *virG/icsA sen set guaBA* attenuated strain that has been evaluated in humans (79). CVD1208 is a *sen set guaBA* attenuated strain that has been used as a DNA vaccine vector in an animal model (102).

An epithelial cell-invasive *E. coli* strain, K-12, was used as a carrier for *Shigella* antigens and tested in humans. This live, oral *Shigella* hybrid vaccine was constructed by transfer of the 140-MDa invasiveness plasmid from *S. flexneri* 5 and the chromosomal genes encoding the group- and type-specific O antigen of *S. flexneri* 2a to *E. coli* K-12 (76). Designated EcSf2a-1, this vaccine produced adverse reactions (fever, diarrhea, or dysentery) in 4 (31%) of 13 subjects who ingested a single dose of 1.0×10^9 CFU, while at better-tolerated doses (5.0×10^6 to 5.0×10^7 CFU), it provided no significant protection against challenge with *S. flexneri* 2a. A further-attenuated *aroD* mutant derivative, EcSf2a-2, was then developed. Rhesus monkeys that received EcSf2a-2 tolerated the vaccine well, and the vaccinated monkeys were protected against shigellosis after challenge with *S. flexneri* 2a (60% efficacy). In humans, EcSf2a-2 was well tolerated at lower inocula. After a single dose of 2.5×10^9 CFU, however, 4 (17%) of 23 subjects experienced adverse reactions, and after a single dose of 1.8×10^{10} CFU, 2 of 4 volunteers developed dysentery. Recipients of three doses of 1.2 to 2.5×10^9 CFU showed significant increases in the levels of antibody to LPS (61%) in serum and invasiveness plasmid antigens (44%) and in gut-derived IgA ASCs specific for LPS (100%) and invasiveness plasmid antigens (60%). Despite its immunogenicity, the vaccine conferred only 36% protection against illness induced by experimental challenge. In subsequent work with 21 adults, four doses of 7×10^8 CFU EcSf2a-2 spaced over 17 days were well tolerated and elicited an ASC response to *Shigella* LPS in all subjects but resulted in a vaccine efficacy of only 27% after experimental challenge with virulent *S. flexneri* 2a (77).

V. cholerae.

Unlike many of the other enteric pathogens, *V. cholerae* does not invade the mucosa. *V. cholerae* colonizes the surface of the small intestine and secretes cholera toxin, resulting in

potentially severe diarrhea. Natural disease induces a Th2-type immune response, and recent data suggest more of an inflammatory response than previously understood (106). The fact that it adheres to M cells and other epithelial cells without further invasion may be viewed as a strength (decreased pathogenicity) and a weakness (decreased interaction with deeper immune compartments (140) from the perspective of vector development. Cholera might be best suited for delivery of antigens relevant to luminal organisms rather than infections that invade systemically and/or require a vigorous cellular immune response for clearance.

Many attenuated strains of *V. cholerae* have been evaluated in human studies, but few have shown low reactogenicity and protective immunity. CVD 103-HgR is a derivative of *V. cholerae* O1 classical strain 569B that does not express the enzymatically active subunit of cholera toxin, CtxA, and contains a mercury resistance gene (*hgR*) that permits identification of the vaccine strain; in volunteer studies, it provided 62 to 100% protection against cholera caused by classical and El Tor *V. cholerae* O1 for at least 6 months (119) but was poorly protective in a field trial involving 67,500 people in Indonesia (109). Peru 15 is a well-tolerated and immunogenic oral cholera vaccine derived from *V. cholerae* O1 El Tor Inaba that affords protective efficacy against life-threatening cholera diarrhea in a human volunteer challenge model (25). *V. cholerae* 638 (El Tor, Ogawa), a CTX ϕ -negative hemagglutinin/protease-defective strain was safe and immunogenic in a trial of 42 volunteers (12); 638T, the thymidine auxotrophic version of 638, is nonproliferative and may offer vaccination without the environmental contamination of a proliferative strain (135). Additional live attenuated *V. cholerae* O1 El Tor and *V. cholerae* O139 vaccines are in various stages of analysis (119). Many of these vaccines have undergone removal of the entire cholera toxin genetic element (the filamentous phage Ctx ϕ), including the *attRS1* site (the site of reintegration), by molecular genetic techniques. This last modification decreases the likelihood that the vaccine strains will reacquire Ctx ϕ in the environment and become toxigenic again. In an attempt to decrease reactogenicity, a number of these strains are also deficient in motility.

V. cholerae has been used to express a variety of foreign antigens in animal models (56, 73), including *Shigella* O polysaccharide (41), heat-labile enterotoxin of *E. coli* (120), *Clostridium difficile* toxin A (117), the serine-rich *E. histolytica* protein (118), and the spherule-associated antigen 2/proline-rich antigen (Ag2/PRA) of *Coccidioides immitis* (126). There are no published human trials with *V. cholerae* expressing foreign antigens. Recent work with foreign antigens in *V. cholerae* has examined their export to the cell surface or to the extracellular milieu (73). Protein fusions between foreign antigens and the nonenzymatic CT-B are able to induced high-titer immune responses against the foreign epitope in mice (118). This system is limited to smaller epitopes that do not interfere with the function of CT-B (73). To enhance the capacity to secrete large foreign antigens, the *E. coli* HlyA secretion system has been used successfully in *V. cholerae* to express toxin A of *C. difficile* genetically fused to HlyA (117). Other work with foreign antigens in *V. cholerae* has focused on optimizing the promoter used to express the foreign antigen (69), comparing expression from a plasmid with expression from a chromosomal integration (118, 121), and developing a balanced lethal plasmid system (121).

Although not live vaccines, *V. cholerae* organisms have recently been used as “bacterial ghosts,” a novel vaccine delivery system with intrinsic adjuvant properties that may

become an effective vaccine delivery vehicle (38). Bacterial ghosts are nonliving bacterial cell envelopes devoid of cytoplasmic contents that maintain their cellular morphology and native surface antigenic structures. Since both native and foreign antigens can be expressed in the envelope complex of ghosts, multiple antigens of various origins can be presented to the immune system simultaneously.

Listeriae.

Similar to salmonellae, listeriae invade the intestinal epithelium and disseminate to systemic lymphoid tissues. Rather than entering into the gut-associated lymphoid tissues via M cells and Peyer's patches, however, *L. monocytogenes* invades by binding the bacterial surface protein internalin with E-cadherin on eukaryotic enterocytes (83). Like *Shigella*, *Listeria* spreads from cell to cell by propelling itself with host filamentous actin. It escapes a membrane-bound vacuole and synthesizes and secretes proteins within the cytoplasm, which can then be processed by the MHC class I pathway of the infected cell. Both CD4⁺- and CD8⁺-T-cell responses are needed for clearance of a listerial infection in mice. Peptides derived from *L. monocytogenes* in the phagolysosome can be presented via both MHC class I and class II pathways and thus induce both CD4⁺- and strong CD8⁺-T-cell responses (105).

L. monocytogenes is an attractive vaccine vector for viral antigens since it can stimulate a CD8⁺ response to foreign antigens. Antigens studied in mice LCMV nucleoprotein, influenza virus NP, HPV-16, and HIV Gag (4, 56). In addition, *L. monocytogenes* has been shown to elicit a CD4⁺ response to a *Leishmania* antigen in mice (127) and to HIV-1 Gag in mice (89). Since the bacteria replicate within the cytoplasm without coming into contact with the extracellular environment, *L. monocytogenes* does not elicit a strong humoral immune response and thus may be better used to prevent diseases that do not require significant humoral immunity. *Listeria* has also been evaluated as an anti-tumor vaccine and as a DNA vaccine vector (73).

Although it is a pathogen commonly found in many foods, *Listeria* is a rare cause of disease in immunocompetent hosts; it is more likely to cause disease in immunosuppressed individuals and pregnant women. Mutations have been introduced to limit bacterial spread, including *actA* (actin nucleator, necessary for cell to cell spread but still able to escape the phagosome), *plcB* (phospholipase B, needed for escape from secondary vacuoles), *Da* (alanine racemase, rendering the strain auxotrophic for D-alanine), and *dat* (D-amino acid aminotransferase, necessary for cell wall biosynthesis).

L. monocytogenes has been successfully used to express HIV Gag from a chromosomally integrated copy of *gag* behind the strong *Listeria hly* promoter (105). Recent work in mice explored the ability of this construct to induce CD8⁺ T cells against HIV Gag in the spleen, mesenteric lymph nodes, and Peyer's patches and its ability to provide effector Gag-specific CD8⁺ T cells to the lamina propria after intravenous, oral, or rectal administration of the vaccine. Both primary and secondary oral immunization resulted in abundant Gag-specific CD8⁺-activated T cells in the lamina propria that constituted ~35% of the CD8 compartment. To achieve significant levels of Gag and listeriolysin O-specific CD8⁺ T cells in mucosal lymphoid tissues, two immunizations were required. These data suggest that mucosally administered *L. monocytogenes* can prompt a vigorous cellular response at mucosal sites and that booster doses can maintain this response (105).

In the only published human safety study to date (4), an attenuated *L. monocytogenes* strain bearing deletions in the *actA* and *plcB* virulence genes was evaluated in 20 healthy adult men. Single escalating oral doses of 10^6 to 10^9 CFU were administered; in the highest-dose cohort (10^9 CFU), humoral, mucosal, and cellular immune responses to the investigational organism were detected in individual volunteers. It would appear from the limited human studies conducted thus far that attenuated *L. monocytogenes* can be studied in healthy adult volunteers without serious long-term health sequelae.

[Go to:](#)

OTHER BACTERIAL VECTORS

In addition to the enteric pathogens discussed above, other bacteria being considered as live vectors include *Yersinia enterocolitica* (55), *Y. pseudotuberculosis* (115), *Bordetella bronchiseptica*, and *B. pertussis* (129). The mucosal commensals such as *Streptococcus gordonii* (85) and the lactic acid bacteria (54, 100) such as the *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. have also been shown to raise immunity to foreign antigens in animal models. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) has also been used in animal models to elicit a cellular immune response to foreign antigens. In 24 human volunteers, intradermal BCG expressing the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* had a safety profile comparable to that of licensed BCG, but it did not elicit primary humoral responses to the vectored antigen (37). Although not a bacterial vector, endospores from *Bacillus subtilis* are also being used as an oral vaccine delivery system (34, 35). The advantages of using the *B. subtilis* spore as a vaccine vehicle include nonpathogenicity, advanced cloning tools, hardiness of the spores, cost-effective manufacturing, long-term storage properties, and its current use as a probiotic for both humans and animals (34).

[Go to:](#)

SUMMARY

Live attenuated enteric bacterial vectors expressing foreign antigens have the potential to provide protection against a multitude of diseases, including HIV, bioterrorism agents, and enteric pathogens. Although the animal data have been encouraging, thus far there is no bacterial vector containing a foreign antigen shown to be effective in reliably eliciting high-level immune responses in a significant proportion of human vaccinees. Further human studies of improved bacterial vectors with more vigorous or elegant antigen expression systems will be needed to further develop these tools.

[Go to:](#)

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by NIAID grants K08 AI001701 to C.N.K. and R01 51206 to E.L.H.

We thank Katherine Raschke for review of the manuscript.

[Go to:](#)

NOTES

Editor: J. B. Kaper

[Go to:](#)

REFERENCES

1. **Altbaum, Z., E. M. Barry, G. Losonsky, J. E. Galen, and M. M. Levine.** 2001. Attenuated *Shigella flexneri* 2a Δ *guaBA* strain CVD 1204 expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS2 and CS3 fimbriae as a live mucosal vaccine against *Shigella* and ETEC infection. *Infect. Immun.* **69**:3150-3158. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. **Anderson, R. J., M. F. Pasetti, M. B. Sztein, M. M. Levine, and F. R. Noriega.** 2000. *guaBA* attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. *Vaccine* **18**:2193-2202. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. **Angelakopoulos, H., and E. L. Hohmann.** 2000. Pilot study of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect. Immun.* **68**:2135-2141. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. **Angelakopoulos, H., K. Loock, D. M. Sisul, E. R. Jensen, J. F. Miller, and E. L. Hohmann.** 2002. Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA/plcB* in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect. Immun.* **70**:3592-3601. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. **Attridge, S.** 1991. Oral immunization with *Salmonella typhi* Ty21a-based clones expressing *Vibrio cholerae* O-antigen: serum bactericidal antibody responses in man in relation to pre-immunization antibody levels. *Vaccine* **9**:877-882. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. **Attridge, S. R., R. Davies, and J. T. LaBrooy.** 1997. Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine* **15**:155-162. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. **Attridge, S. R., C. Dearlove, L. Beyer, L. van den Bosch, A. Howles, J. Hackett, R. Morona, J. LaBrooy, and D. Rowley.** 1991. Characterization and immunogenicity of EX880, a *Salmonella typhi* Ty21a-based clone which produces *Vibrio cholerae* O antigen. *Infect. Immun.* **59**:2279-2284. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. **Bao, J. X., and J. D. Clements.** 1991. Prior immunologic experience potentiates the subsequent antibody response when *Salmonella* strains are used as vaccine carriers. *Infect. Immun.* **59**:3841-3845. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

9. **Barry, E. M., Z. Altboum, G. Losonsky, and M. M. Levine.** 2003. Immune responses elicited against multiple enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae and mutant LT expressed in attenuated *Shigella* vaccine strains. *Vaccine* **21**:333-340. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. **Barzu, S., J. Arondel, S. Guillot, P. J. Sansonetti, and A. Phalipon.** 1998. Immunogenicity of IpaC-hybrid proteins expressed in the *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate SC602. *Infect. Immun.* **66**:77-82. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. **Baud, D., J. Benyacoub, V. Revaz, M. Kok, F. Ponci, M. Bobst, R. Curtiss III, P. De Grandi, and D. Nardelli-Haeffliger.** 2004. Immunogenicity against human papillomavirus type 16 virus-like particles is strongly enhanced by the PhoPc phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **72**:750-756. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. **Benitez, J. A., L. Garcia, A. Silva, H. Garcia, R. Fando, B. Cedre, A. Perez, J. Campos, B. L. Rodriguez, J. L. Perez, T. Valmaseda, O. Perez, M. Ramirez, T. Ledon, M. D. Jidy, M. Lastre, L. Bravo, and G. Sierra.** 1999. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX ϕ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect. Immun.* **67**:539-545. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. **Benyacoub, J., S. Hopkins, A. Potts, S. Kelly, J. P. Kraehenbuhl, R. Curtiss III, P. De Grandi, and D. Nardelli-Haeffliger.** 1999. The nature of the attenuation of *Salmonella typhimurium* strains expressing human papillomavirus type 16 virus-like particles determines the systemic and mucosal antibody responses in nasally immunized mice. *Infect. Immun.* **67**:3674-3679. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. **Betenbaugh, M. J., and P. Dhurjati.** 1990. Effects of promoter induction and copy number amplification on cloned gene expression and growth of recombinant cell cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**:111-120. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. **Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, G. Losonsky, D. Herrington, S. Berman, and S. B. Formal.** 1987. Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J. Infect. Dis.* **155**:1260-1265. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. **Boe, L., K. Gerdes, and S. Molin.** 1987. Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **169**:4646-4650. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. **Bouwer, H. G., H. Shen, X. Fan, J. F. Miller, R. A. Barry, and D. J. Hinrichs.** 1999. Existing antilisterial immunity does not inhibit the development of a *Listeria monocytogenes*-specific primary cytotoxic-T-lymphocyte response. *Infect. Immun.* **67**:253-258. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. **Bumann, D.** 2001. Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4⁺-T-cell responses. *Infect. Immun.* **69**:7493-7500. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

19. **Bumann, D., W. G. Metzger, E. Mansouri, O. Palme, M. Wendland, R. Hurwitz, G. Haas, T. Aebischer, B. U. von Specht, and T. F. Meyer.** 2001. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* **20**:845-852. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. **Burnett, M. S., N. Wang, M. Hofmann, and G. Barrie Kitto.** 2000. Potential live vaccines for HIV. *Vaccine* **19**:735-742. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. **Cersini, A., M. C. Martino, I. Martini, G. Rossi, and M. L. Bernardini.** 2003. Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants. *Infect. Immun.* **71**:7002-7013. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. **Chabalgoity, J. A., G. Dougan, P. Mastroeni, and R. J. Aspinall.** 2002. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev. Vaccines* **1**:495-505. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. **Chatfield, S. N., I. G. Charles, A. J. Makoff, M. D. Oxe, G. Dougan, D. Pickard, D. Slater, and N. F. Fairweather.** 1992. Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology* **10**:888-892. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. **Chen, H., and D. M. Schifferli.** 2000. Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *Infect. Immun.* **68**:3129-3139. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. **Cohen, M. B., R. A. Giannella, J. Bean, D. N. Taylor, S. Parker, A. Hoepfer, S. Wowk, J. Hawkins, S. K. Kochi, G. Schiff, and K. P. Killeen.** 2002. Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect. Immun.* **70**:1965-1970. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. **Coster, T. S., C. W. Hoge, L. L. VanDeVerg, A. B. Hartman, E. V. Oaks, M. M. Venkatesan, D. Cohen, G. Robin, A. Fontaine-Thompson, P. J. Sansonetti, and T. L. Hale.** 1999. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect. Immun.* **67**:3437-3443. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. **Covone, M. G., M. Brocchi, E. Palla, W. Dias da Silveira, R. Rappuoli, and C. L. Galeotti.** 1998. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **66**:224-231. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. **Coynault, C., V. Robbe-Saule, and F. Norel.** 1996. Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol. Microbiol.* **22**:149-160. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. **Curtiss, R., III.** 2002. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J. Clin. Investig.* **110**:1061-1066. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

30. **Curtiss, R., III, K. Nakayama, and S. M. Kelly.** 1989. Recombinant avirulent *Salmonella* vaccine strains with stable maintenance and high level expression of cloned genes in vivo. *Immunol. Investig.* **18**:583-596. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. **Dietrich, G., S. Spreng, D. Favre, J. F. Viret, and C. A. Guzman.** 2003. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**:10-19. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. **DiPetrillo, M. D., T. Tibbetts, H. Kleanthous, K. P. Killeen, and E. L. Hohmann.** 1999. Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* **18**:449-459. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. **Dreher, D., M. Kok, L. Cochand, S. G. Kiama, P. Gehr, J. C. Pechere, and L. P. Nicod.** 2001. Genetic background of attenuated *Salmonella typhimurium* has profound influence on infection and cytokine patterns in human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **69**:583-589. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. **Duc le, H., H. A. Hong, and S. M. Cutting.** 2003. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine* **21**:4215-4224. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. **Duc le, H., H. A. Hong, N. Fairweather, E. Ricca, and S. M. Cutting.** 2003. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect. Immun.* **71**:2810-2818. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. **Dunstan, S. J., C. P. Simmons, and R. A. Strugnell.** 1998. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* **66**:732-740. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. **Edelman, R., K. Palmer, K. G. Russ, H. P. Secrest, J. A. Becker, S. A. Bodison, J. G. Perry, A. R. Sills, A. G. Barbour, C. J. Luke, M. S. Hanson, C. K. Stover, J. E. Burlein, G. P. Bansal, E. M. Connor, and S. Koenig.** 1999. Safety and immunogenicity of recombinant Bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. *Vaccine* **17**:904-914. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. **Eko, F. O., T. Schukovskaya, E. Y. Lotzmanova, V. V. Firstova, N. V. Emalyanova, S. N. Klueva, A. L. Kravtsov, L. F. Livanova, V. V. Kutyrev, J. U. Igietseme, and W. Lubitz.** 2003. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine* **21**:3663-3674. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. **Evans, D. T., L. M. Chen, J. Gillis, K. C. Lin, B. Harty, G. P. Mazzara, R. O. Donis, K. G. Mansfield, J. D. Lifson, R. C. Desrosiers, J. E. Galan, and R. P. Johnson.** 2003. Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *J. Virol.* **77**:2400-2409. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

40. Fairweather, N. F., S. N. Chatfield, A. J. Makoff, R. A. Strugnell, J. Bester, D. J. Maskell, and G. Dougan. 1990. Oral vaccination of mice against tetanus by use of a live attenuated *Salmonella* carrier. *Infect. Immun.* **58**:1323-1326. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Favre, D., S. J. Cryz, Jr., and J. F. Viret. 1996. Development of *Shigella sonnei* live oral vaccines based on defined rfbInaba deletion mutants of *Vibrio cholerae* expressing the *Shigella* serotype D O polysaccharide. *Infect. Immun.* **64**:576-584. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Formal, S. B., L. S. Baron, D. J. Kopecko, O. Washington, C. Powell, and C. A. Life. 1981. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the *galE* *Salmonella typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect. Immun.* **34**:746-750. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Forrest, B. D., J. T. LaBrooy, S. R. Attridge, G. Boehm, L. Beyer, R. Morona, D. J. Shearman, and D. Rowley. 1989. Immunogenicity of a candidate live oral typhoid/cholera hybrid vaccine in humans. *J. Infect. Dis.* **159**:145-146. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
44. Fouts, T. R., R. G. Tuskan, S. Chada, D. M. Hone, and G. K. Lewis. 1995. Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. *Vaccine* **13**:1697-1705. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Francisco, J. A., R. Campbell, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 1993. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10444-10448. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Francisco, J. A., C. F. Earhart, and G. Georgiou. 1992. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2713-2717. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Francisco, J. A., C. Stathopoulos, R. A. Warren, D. G. Kilburn, and G. Georgiou. 1993. Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Bio/Technology* **11**:491-495. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Galen, J. E., and M. M. Levine. 2001. Can a “flawless” live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* **9**:372-376. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Galen, J. E., J. Nair, J. Y. Wang, S. S. Wasserman, M. K. Tanner, M. B. Sztein, and M. M. Levine. 1999. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**:6424-6433. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Gentschev, I., G. Dietrich, and W. Goebel. 2002. The *Escherichia coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* **10**:39-45. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Gentschev, I., I. Glaser, W. Goebel, D. J. McKeever, A. Musoke, and V. T. Heussler. 1998. Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* by using

- recombinant *Salmonella dublin*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infect. Immun.* **66**:2060-2064. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
52. **Gerdes, K., J. S. Jacobsen, and T. Franch.** 1997. Plasmid stabilization by post-segregational killing. *Genet. Eng.* **19**:49-61. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
53. **Gonzalez, C., D. Hone, F. R. Noriega, C. O. Tacket, J. R. Davis, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. Hoffman, A. Malik, E. Nardin, et al.** 1994. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J. Infect. Dis.* **169**:927-931. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
54. **Grangette, C., H. Muller-Alouf, M. Geoffroy, D. Goudercourt, M. Turneer, and A. Mercenier.** 2002. Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine* **20**:3304-3309. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
55. **Gundel, I., G. Weidinger, V. ter Meulen, J. Heesemann, H. Russmann, and S. Niewiesk.** 2003. Oral immunization with recombinant *Yersinia enterocolitica* expressing a measles virus CD4 T cell epitope protects against measles virus-induced encephalitis. *J. Gen. Virol.* **84**:775-779. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
56. **Hantman, M. J., E. L. Hohmann, C. G. Murphy, D. M. Knipe, and S. I. Miller.** 1999. Antigen delivery systems: development of recombinant live vaccines using viral or bacterial vectors, p. 779-791. In P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, J. Bienenstock, W. Strober, and J. McGhee (ed.), *Mucosal immunology*, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
57. **Hayes, L. J., J. W. Conlan, J. S. Everson, M. E. Ward, and I. N. Clarke.** 1991. *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein epitopes expressed as fusions with LamB in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*; their application as potential immunogens. *J. Gen. Microbiol.* **137**(Pt. 7):1557-1564. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
58. **Herrington, D. A., L. Van de Verg, S. B. Formal, T. L. Hale, B. D. Tall, S. J. Cryz, E. C. Tramont, and M. M. Levine.** 1990. Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccines: further experience with a bivalent *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* vaccine and protection conferred by previous *Shigella sonnei* disease. *Vaccine* **8**:353-357. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
59. **Hess, J., I. Gentshev, D. Miko, M. Welzel, C. Ladel, W. Goebel, and S. H. Kaufmann.** 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:1458-1463. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
60. **Hindle, Z., S. N. Chatfield, J. Phillimore, M. Bentley, J. Johnson, C. A. Cosgrove, M. Ghaem-Maghani, A. Sexton, M. Khan, F. R. Brennan, P. Everest, T. Wu, D. Pickard, D. W. Holden, G. Dougan, G. E. Griffin, D. House, J. D. Santangelo, S. A. Khan, J. E. Shea, R. G. Feldman, and D. J. Lewis.** 2002. Characterization of *Salmonella*

enterica derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. Infect. Immun. **70**:3457-3467. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

61. **Hohmann, E. L., C. A. Oletta, K. P. Killeen, and S. I. Miller.** 1996. *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. J. Infect. Dis. **173**:1408-1414. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

62. **Hohmann, E. L., C. A. Oletta, and S. I. Miller.** 1996. Evaluation of a *phoP/phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. Vaccine **14**:19-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

63. **Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature **291**:238-239. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

64. **Hone, D. M., S. R. Attridge, B. Forrest, R. Morona, D. Daniels, J. T. LaBrooy, R. C. Bartholomeusz, D. J. Shearman, and J. Hackett.** 1988. A *galE* via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect. Immun. **56**:1326-1333. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

65. **Hone, D. M., C. O. Tacket, A. M. Harris, B. Kay, G. Losonsky, and M. M. Levine.** 1992. Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. J. Clin. Investig. **90**:412-420. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

66. **Jagusztyń-Krynicka, E. K., J. E. Clark-Curtiss, and R. Curtiss III.** 1993. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. Infect. Immun. **61**:1004-1015. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

67. **Janssen, R., and J. Tommassen.** 1994. PhoE protein as a carrier for foreign epitopes. Int. Rev. Immunol. **11**:113-121. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

68. **Johansson, E. L., L. Wassen, J. Holmgren, M. Jertborn, and A. Rudin.** 2001. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. Infect. Immun. **69**:7481-7486. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

69. **John, M., T. I. Crean, S. B. Calderwood, and E. T. Ryan.** 2000. In vitro and in vivo analyses of constitutive and in vivo-induced promoters in attenuated vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. **68**:1171-1175. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

70. **Kang, H. Y., and R. Curtiss III.** 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **37**:99-104. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

71. **Kaufmann, S. H., and J. Hess.** 1999. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol. Lett.* **65**:81-84. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
72. **Kirschmann, D. A., P. A. De Ciechi, C. P. Bono, M. L. Zacheis, B. D. Schwartz, and S. L. Woulfe.** 1995. Utilization of soluble fusion proteins for induction of T-cell proliferation. *Cell. Immunol.* **160**:193-198. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
73. **Kochi, S. K., K. P. Killeen, and U. S. Ryan.** 2003. Advances in the development of bacterial vector technology. *Expert. Rev. Vaccines* **2**:31-43. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
74. **Kohler, J. J., L. B. Pathangey, S. R. Gillespie, and T. A. Brown.** 2000. Effect of preexisting immunity to *Salmonella* on the immune response to recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin. *Infect. Immun.* **68**:3116-3120. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
75. **Koprowski, H., 2nd, M. M. Levine, R. J. Anderson, G. Losonsky, M. Pizza, and E. M. Barry.** 2000. Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:4884-4892. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
76. **Kotloff, K. L., D. A. Herrington, T. L. Hale, J. W. Newland, L. Van De Verg, J. P. Cogan, P. J. Snoy, J. C. Sadoff, S. B. Formal, and M. M. Levine.** 1992. Safety, immunogenicity, and efficacy in monkeys and humans of invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun.* **60**:2218-2224. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
77. **Kotloff, K. L., G. A. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, T. L. Hale, D. N. Taylor, J. W. Newland, J. C. Sadoff, S. B. Formal, and M. M. Levine.** 1995. Evaluation of the safety, immunogenicity, and efficacy in healthy adults of four doses of live oral hybrid *Escherichia coli*-*Shigella flexneri* 2a vaccine strain EcSf2a-2. *Vaccine* **13**:495-502. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
78. **Kotloff, K. L., F. Noriega, G. A. Losonsky, M. B. Sztein, S. S. Wasserman, J. P. Nataro, and M. M. Levine.** 1996. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect. Immun.* **64**:4542-4548. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
79. **Kotloff, K. L., F. R. Noriega, T. Samandari, M. B. Sztein, G. A. Losonsky, J. P. Nataro, W. D. Picking, E. M. Barry, and M. M. Levine.** 2000. *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in *virG*, *sen*, *set*, and *guaBA*, is highly attenuated in humans. *Infect. Immun.* **68**:1034-1039. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
80. **Kotloff, K. L., J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, and M. M. Levine.** 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. W. H. O.* **77**:651-666. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

81. **Kramer, U., K. Rizos, H. Apfel, I. B. Autenrieth, and C. T. Lattemann.** 2003. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* **71**:1944-1952. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
82. **Kutteh, W. H., A. Kantele, Z. Moldoveanu, P. A. Crowley-Nowick, and J. Mestecky.** 2001. Induction of specific immune responses in the genital tract of women after oral or rectal immunization and rectal boosting with *Salmonella typhi* Ty21a vaccine. *J. Reprod. Immunol.* **52**:61-75. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
83. **Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart.** 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722-1725. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
84. **Lee, J. S., K. S. Shin, J. G. Pan, and C. J. Kim.** 2000. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* **18**:645-648. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
85. **Lee, S. F.** 2003. Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**:231-235. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
86. **Levine, M. M.** 1999. Typhoid fever vaccines, p. 781-814. *In* S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (ed.), *Vaccines*, 3rd ed. The W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.
87. **Lundin, B. S., C. Johansson, and A. M. Svennerholm.** 2002. Oral immunization with a *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in humans. *Infect. Immun.* **70**:5622-5627. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
88. **Mastroeni, P.** 2002. Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Curr. Mol. Med.* **2**:393-406. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
89. **Mata, M., and Y. Paterson.** 1999. Th1 T-cell responses to HIV-1 Gag protein delivered by a *Listeria monocytogenes* vaccine are similar to those induced by endogenous listerial antigens. *J. Immunol.* **163**:1449-1456. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
90. **McDermott, P. J., P. Gowland, and P. C. Gowland.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:139-143. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
91. **McGhee, J. R., J. Mestecky, M. T. Dertzbaugh, J. H. Eldridge, M. Hirasawa, and H. Kiyono.** 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**:75-88. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
92. **Miller, S. I.** 1991. PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol. Microbiol.* **5**:2073-2078. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
93. **Mutsch, M., W. Zhou, P. Rhodes, M. Bopp, R. T. Chen, T. Linder, C. Spyr, and R. Steffen.** 2004. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.* **350**:896-903. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

94. **Nardelli-Haeffliger, D., J. P. Kraehenbuhl, R. Curtiss III, F. Schodel, A. Potts, S. Kelly, and P. De Grandi.** 1996. Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. *Infect. Immun.* **64**:5219-5224. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
95. **Nardelli-Haeffliger, D., R. B. Roden, J. Benyacoub, R. Sahli, J. P. Kraehenbuhl, J. T. Schiller, P. Lachat, A. Potts, and P. De Grandi.** 1997. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect. Immun.* **65**:3328-3336. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
96. **Newton, S. M., C. O. Jacob, and B. A. Stocker.** 1989. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* **244**:70-72. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
97. **Noriega, F. R., G. Losonsky, C. Lauderbaugh, F. M. Liao, J. Y. Wang, and M. M. Levine.** 1996. Engineered Δ *guaB-A* Δ *virG* *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205: construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect. Immun.* **64**:3055-3061. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
98. **Noriega, F. R., G. Losonsky, J. Y. Wang, S. B. Formal, and M. M. Levine.** 1996. Further characterization of Δ *aroA* Δ *virG* *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:23-27. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
99. **Noriega, F. R., J. Y. Wang, G. Losonsky, D. R. Maneval, D. M. Hone, and M. M. Levine.** 1994. Construction and characterization of attenuated Δ *aroA* Δ *virG* *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect. Immun.* **62**:5168-5172. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
100. **Nouaille, S., L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella, and V. Azevedo.** 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* **2**:102-111. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
101. **Orr, N., J. E. Galen, and M. M. Levine.** 2001. Novel use of anaerobically induced promoter, *dmsA*, for controlled expression of fragment C of tetanus toxin in live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 908-htrA. *Vaccine* **19**:1694-1700. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
102. **Pasetti, M. F., E. M. Barry, G. Losonsky, M. Singh, S. M. Medina-Moreno, J. M. Polo, J. Ulmer, H. Robinson, M. B. Sztein, and M. M. Levine.** 2003. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. *J. Virol.* **77**:5209-5217. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
103. **Pasetti, M. F., R. Salerno-Goncalves, and M. B. Sztein.** 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines delivered intranasally elicit regional and

systemic specific CD8⁺ major histocompatibility class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.* **70**:4009-4018. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

104. **Pecota, D. C., C. S. Kim, K. Wu, K. Gerdes, and T. K. Wood.** 1997. Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1917-1924. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

105. **Peters, C., X. Peng, D. Douven, Z. K. Pan, and Y. Paterson.** 2003. The induction of HIV Gag-specific CD8⁺ T cells in the spleen and gut-associated lymphoid tissue by parenteral or mucosal immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* HIV Gag. *J. Immunol.* **170**:5176-5187. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

106. **Qadri, F., T. R. Bhuiyan, K. K. Dutta, R. Raqib, M. S. Alam, N. H. Alam, A. M. Svennerholm, and M. M. Mathan.** 2004. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* **53**:62-69. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

107. **Rayevskaya, M. V., and F. R. Frankel.** 2001. Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J. Virol.* **75**:2786-2791. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

108. **Rees, J. H., S. E. Soudain, N. A. Gregson, and R. A. Hughes.** 1995. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **333**:1374-1379. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

109. **Richie, E. E., N. H. Punjabi, Y. Y. Sidharta, K. K. Peetosutan, M. M. Sukandar, S. S. Wasserman, M. M. Lesmana, F. F. Wangsasaputra, S. S. Pandam, M. M. Levine, P. P. O'Hanley, S. J. Cryz, and C. H. Simanjuntak.** 2000. Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* **18**:2399-2410. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

110. **Rizos, K., C. T. Lattemann, D. Bumann, T. F. Meyer, and T. Aebischer.** 2003. Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* **71**:6320-6328. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

111. **Robbins, J. B., R. Schneerson, and S. C. Szu.** 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* **171**:1387-1398. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

112. **Roberts, M., A. Bacon, J. Li, and S. Chatfield.** 1999. Prior immunity to homologous and heterologous *Salmonella* serotypes suppresses local and systemic anti-fragment C antibody responses and protection from tetanus toxin in mice immunized with *Salmonella* strains expressing fragment C. *Infect. Immun.* **67**:3810-3815. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

113. **Ruiz-Perez, F., R. Leon-Kempis, A. Santiago-Machuca, G. Ortega-Pierres, E. Barry, M. Levine, and C. Gonzalez-Bonilla.** 2002. Expression of the *Plasmodium*

falciiparum immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. Infect. Immun. **70**:3611-3620. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

114. Russell, M. W., M. H. Martin, H. Y. Wu, S. K. Hollingshead, Z. Moldoveanu, and J. Mestecky. 2000. Strategies of immunization against mucosal infections. Vaccine **19**(Suppl. 1):S122-S127. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

115. Russmann, H., U. Gerdemann, E. I. Igwe, K. Panthel, J. Heesemann, S. Garbom, H. Wolf-Watz, and G. Geginat. 2003. Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. Infect. Immun. **71**:3463-3472. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

116. Russmann, H., H. Shams, F. Poblete, Y. Fu, J. E. Galan, and R. O. Donis. 1998. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. Science **281**:565-568. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

117. Ryan, E. T., J. R. Butterson, R. N. Smith, P. A. Carroll, T. I. Crean, and S. B. Calderwood. 1997. Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. Infect. Immun. **65**:2941-2949. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

118. Ryan, E. T., J. R. Butterson, T. Zhang, M. A. Baker, S. L. Stanley, Jr., and S. B. Calderwood. 1997. Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. Infect. Immun. **65**:3118-3125. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

119. Ryan, E. T., and S. B. Calderwood. 2000. Cholera vaccines. Clin. Infect. Dis. **31**:561-565. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

120. Ryan, E. T., T. I. Crean, M. John, J. R. Butterson, J. D. Clements, and S. B. Calderwood. 1999. In vivo expression and immunoadjuvancy of a mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. **67**:1694-1701. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

121. Ryan, E. T., T. I. Crean, S. K. Kochi, M. John, A. A. Luciano, K. P. Killeen, K. E. Klose, and S. B. Calderwood. 2000. Development of a $\Delta glnA$ balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. **68**:221-226. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

122. Salerno-Goncalves, R., M. F. Pasetti, and M. B. Sztein. 2002. Characterization of CD8⁺ effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. J. Immunol. **169**:2196-2203. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

123. Salerno-Goncalves, R., T. L. Wyant, M. F. Pasetti, M. Fernandez-Vina, C. O. Tacket, M. M. Levine, and M. B. Sztein. 2003. Concomitant induction of CD4⁺ and

CD8⁺ T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 908-*htrA*. J. Immunol. **170**:2734-2741. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

124. **Schafer, R., D. A. Portnoy, S. A. Brassell, and Y. Paterson.** 1992. Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. J. Immunol. **149**:53-59. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

125. **Scheifele, D. W., B. Duval, M. L. Russell, R. Warrington, G. DeSerres, D. M. Skowronski, M. Dionne, J. Kellner, D. Davies, and J. MacDonald.** 2003. Ocular and respiratory symptoms attributable to inactivated split influenza vaccine: evidence from a controlled trial involving adults. Clin. Infect. Dis. **36**:850-857. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

126. **Silva, A. J., A. Mohan, and J. A. Benitez.** 2003. Cholera vaccine candidate 638: intranasal immunogenicity and expression of a foreign antigen from the pulmonary pathogen *Coccidioides immitis*. Vaccine **21**:4715-4721. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

127. **Soussi, N., H. Saklani-Jusforgues, J. H. Colle, G. Milon, N. Glaichenhaus, and P. L. Goossens.** 2002. Effect of intragastric and intraperitoneal immunization with attenuated and wild-type LACK-expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. Vaccine **20**:2702-2712. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

128. **Spreng, S., G. Dietrich, W. Goebel, and I. Gentschev.** 2003. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein. Vaccine **21**:746-752. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

129. **Stevenson, A., and M. Roberts.** 2003. Use of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* as live vaccines and vectors for heterologous antigens. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **37**:121-128. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

130. **Tacket, C. O., B. Forrest, R. Morona, S. R. Attridge, J. LaBrooy, B. D. Tall, M. Reymann, D. Rowley, and M. M. Levine.** 1990. Safety, immunogenicity, and efficacy against cholera challenge in humans of a typhoid-cholera hybrid vaccine derived from *Salmonella typhi* Ty21a. Infect. Immun. **58**:1620-1627. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

131. **Tacket, C. O., J. Galen, M. B. Sztein, G. Losonsky, T. L. Wyant, J. Nataro, S. S. Wasserman, R. Edelman, S. Chatfield, G. Dougan, and M. M. Levine.** 2000. Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. Clin. Immunol. **97**:146-153. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

132. **Tacket, C. O., S. M. Kelly, F. Schodel, G. Losonsky, J. P. Nataro, R. Edelman, M. M. Levine, and R. Curtiss III.** 1997. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. Infect. Immun. **65**:3381-3385. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

133. **Tacket, C. O., M. B. Sztein, G. A. Losonsky, S. S. Wasserman, J. P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S. N. Chatfield, and M. M. Levine.** 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and

immune response in humans. *Infect. Immun.* **65**:452-456. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

134. **Valentine, P. J., B. P. Devore, and F. Heffron.** 1998. Identification of three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical *aroA* mutant. *Infect. Immun.* **66**:3378-3383. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

135. **Valle, E., T. Ledon, B. Cedre, J. Campos, T. Valmaseda, B. Rodriguez, L. Garcia, K. Marrero, J. Benitez, S. Rodriguez, and R. Fando.** 2000. Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholera vaccine candidate derived from strain 638. *Infect. Immun.* **68**:6411-6418. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

136. **Van de Verg, L., D. A. Herrington, J. R. Murphy, S. S. Wasserman, S. B. Formal, and M. M. Levine.** 1990. Specific immunoglobulin A-secreting cells in peripheral blood of humans following oral immunization with a bivalent *Salmonella typhi-Shigella sonnei* vaccine or infection by pathogenic *S. sonnei*. *Infect. Immun.* **58**:2002-2004. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

137. **VanCott, J. L., S. N. Chatfield, M. Roberts, D. M. Hone, E. L. Hohmann, D. W. Pascual, M. Yamamoto, H. Kiyono, and J. R. McGhee.** 1998. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat. Med.* **4**:1247-1252. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

138. **Vindurampulle, C. J., and S. R. Attridge.** 2003. Impact of vector priming on the immunogenicity of recombinant *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.* **71**:287-297. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

139. **Vindurampulle, C. J., and S. R. Attridge.** 2003. Vector priming reduces the immunogenicity of salmonella-based vaccines in *nramp1*^{+/+} mice. *Infect. Immun.* **71**:2258-2261. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

140. **Viret, J. F., D. Favre, B. Wegmuller, C. Herzog, J. U. Que, S. J. Cryz, Jr., and A. B. Lang.** 1999. Mucosal and systemic immune responses in humans after primary and booster immunizations with orally administered invasive and noninvasive live attenuated bacteria. *Infect. Immun.* **67**:3680-3685. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

141. **Whittle, B. L., and N. K. Verma.** 1997. The immune response to a B-cell epitope delivered by *Salmonella* is enhanced by prior immunological experience. *Vaccine* **15**:1737-1740. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

142. **Wick, M. J., C. V. Harding, N. J. Twesten, S. J. Normark, and J. D. Pfeifer.** 1995. The *phoP* locus influences processing and presentation of *Salmonella typhimurium* antigens by activated macrophages. *Mol. Microbiol.* **16**:465-476. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

143. **Wu, K., D. Jahng, and T. K. Wood.** 1994. Temperature and growth rate effects on the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability. *Biotechnol. Prog.* **10**:621-629. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

144. **Yu, D. T.** 2003. Definition and diagnosis of undifferentiated spondyloarthritis, Reiter's syndrome, and reactive arthritis. UpToDate 2003. [Online.]