

**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 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 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 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 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* 3934 Δ XII* en la que la pérdida de este factor sigma había sido resultado de una contraselección natural) del gen *rpoS* dio como resultado un efecto atenuante sinérgico, que condujo a una cepa altamente atenuada, denominada Δ XIII. 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.

15

20

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

25

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 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 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 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. 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 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 enterica* 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

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 .

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 cytolysin A (clyA) y el fragmento CAP. 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 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 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 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:

- 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)
- 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
10 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 progafo 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
15 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
20 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
25 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

OBTENCIÓN 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 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 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 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 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

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

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 .

10 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

15 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

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 llevaba una cola de histidina (6x-His), fusionada a C_{ly}A 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 µL de extracto proteico de la cepa SE3934-Cap y se le añadió 20 µL de buffer de carga Laemmli 5x. La mezcla fue calentada a 100 °C por 5 minutos. 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 por 10 minutos cada una. Se agregó a la membrana un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (1 µg/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 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
- 5 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 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.
- 10 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 que permanecieron en la etapa experimental.

Ejemplo 4: Detección de anticuerpos contra PCV2

- 15 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 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
- 20 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
- 25 450 nm (Biotek, Winooski, VT, USA).

Ejemplo 5: Expresión del antígeno CAP por SE3934-CAP

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.

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 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 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.

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

5

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%

10 Evaluación de la seguridad de la composición inmunogénica en cerdos

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 composición inmunogénica (dosis: 10⁹ 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 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.

10 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:
 - 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

FIGURA 1

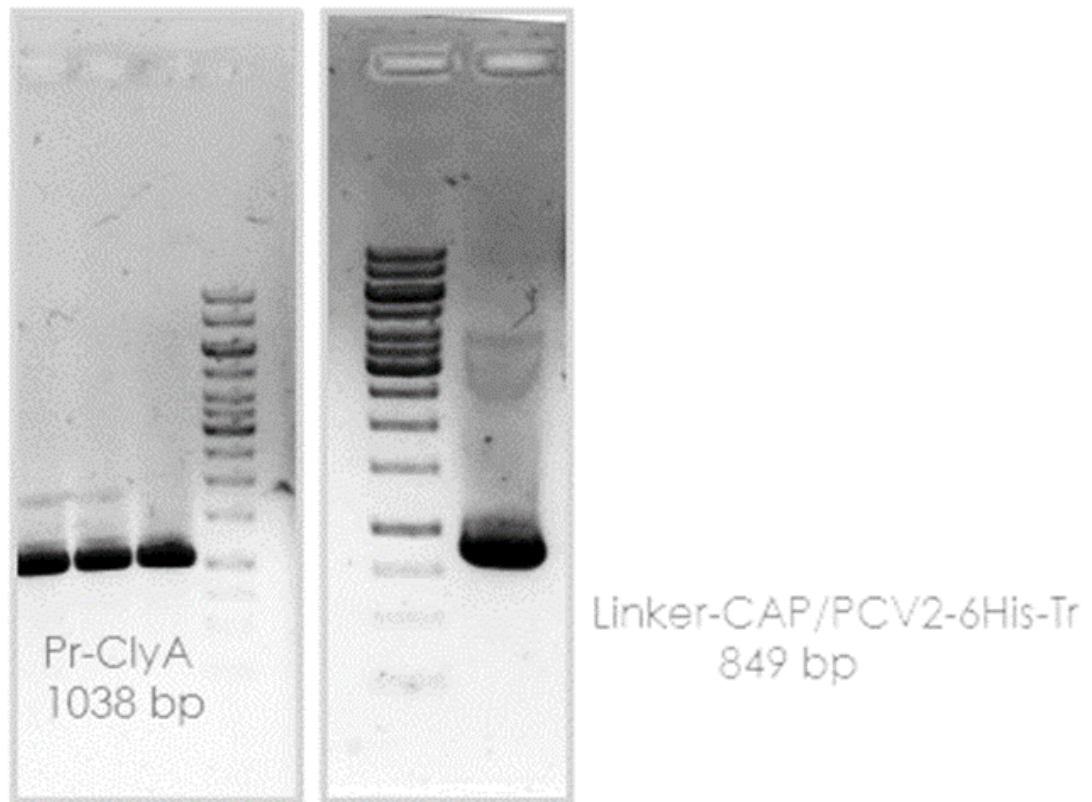


FIGURA 2

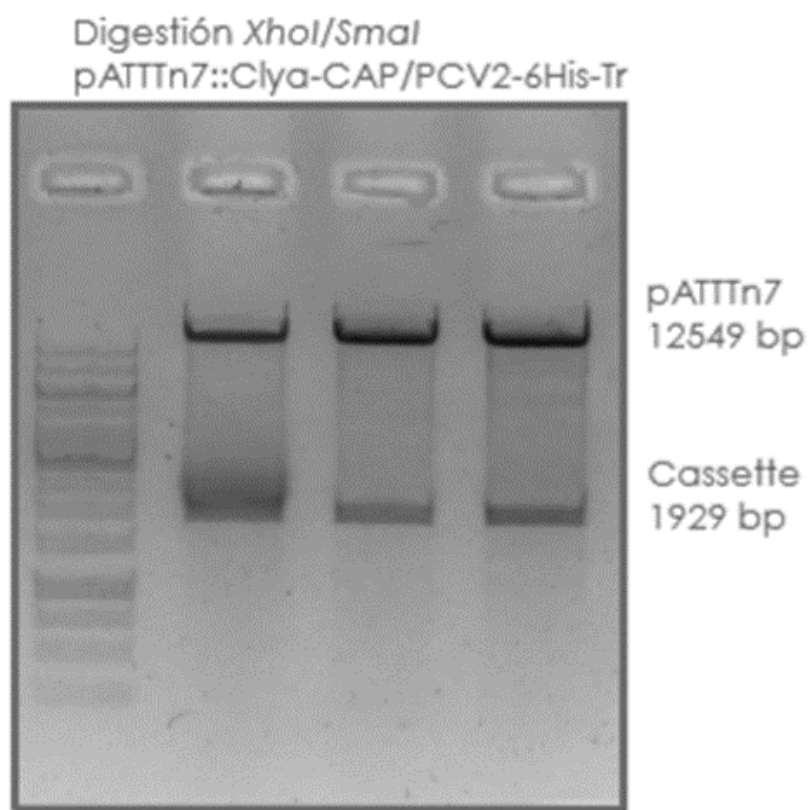


FIGURA 3

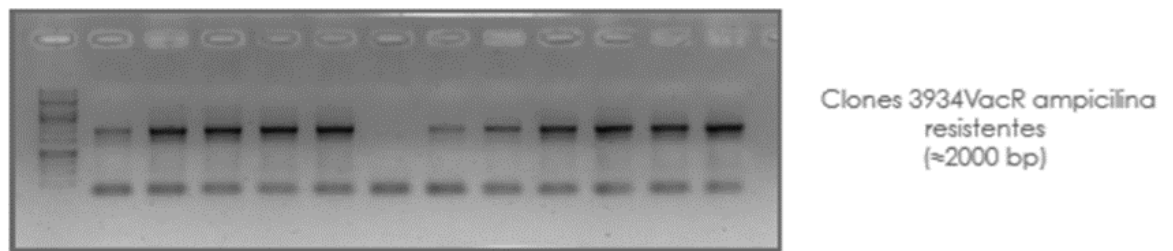


FIGURA 4

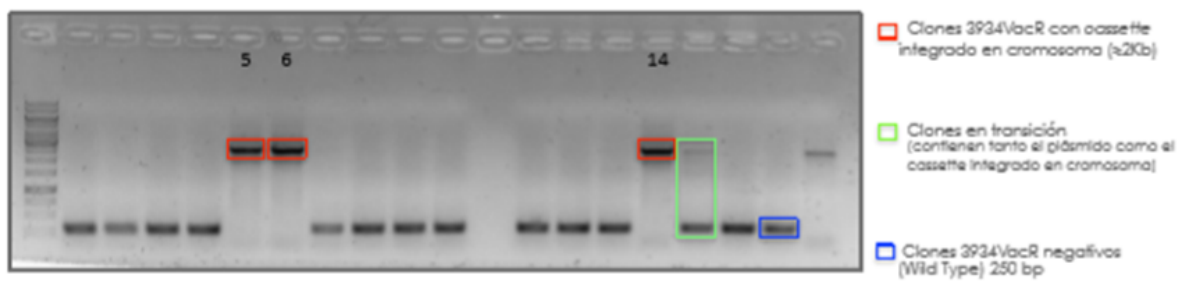


FIGURA 5

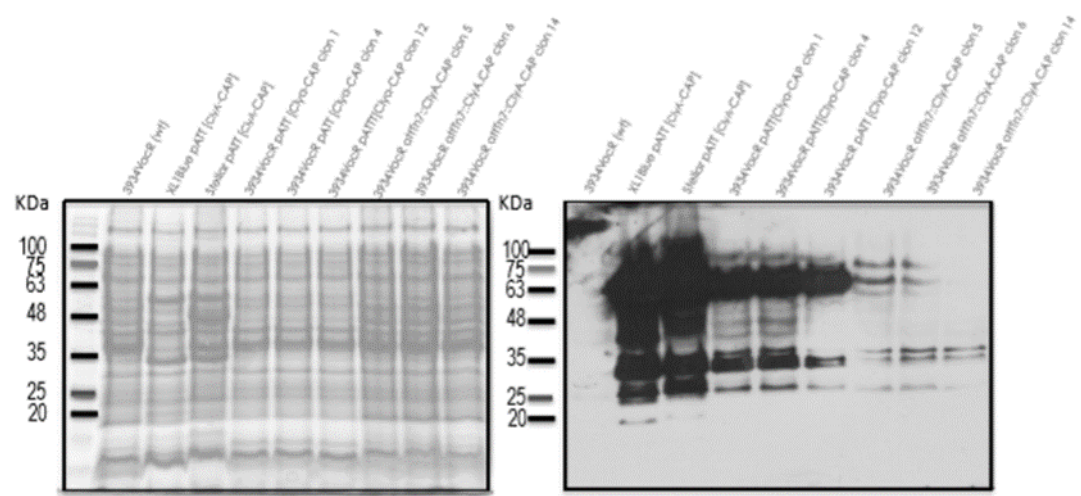


FIGURA 6

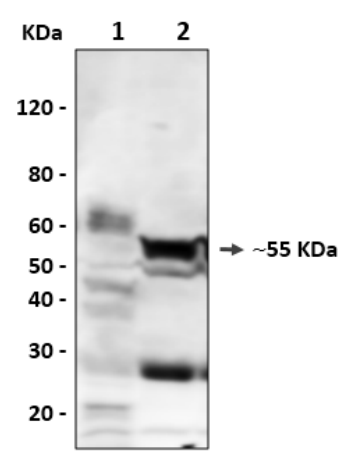
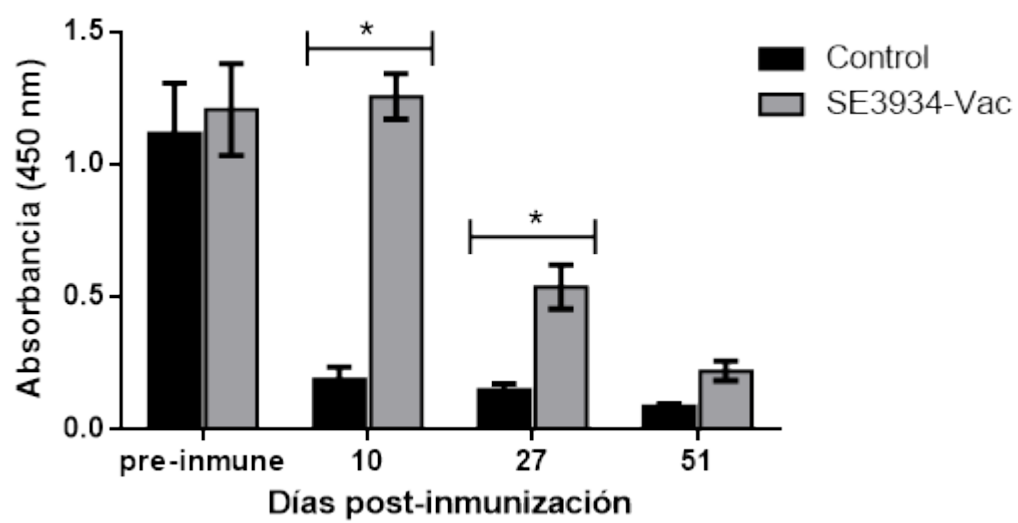


FIGURA 7



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*.