



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 987**

51 Int. Cl.:

A61K 39/106 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00949768 .6**

96 Fecha de presentación : **07.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1200121**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

54 Título: **Vacuna para peces.**

30 Prioridad: **07.08.1999 GB 9918591**
30.09.1999 GB 9923030

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Barnes, Andrew, Cartner**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 308 987 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna para peces.

5 La presente invención se relaciona con composiciones novedosas para ser utilizadas como vacunas y medicamentos para el tratamiento profiláctico de los peces para la infección por organismos bacterianos, y particularmente para la protección de los peces de una infección por bacterias tal como *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida*.

10 La *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida*, previamente la *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida* se re-clasificó, y previamente se reportó como *Pasteurella piscicida* y se reasignó a la familia vibrionaceae basándose en su homología de ARN ribosomal 16s de la subunidad pequeña (Gauthier *et al.* (1995) Int. J. Syst. Bacteriol. 45:139-144). *P. damsela* causa graves enfermedades fatales, comúnmente llamadas pseudotuberculosis, en peces marinos de agua caliente que infectan los órganos y tejidos principales resultando en pseudotubérculos o lesiones características en la musculatura.

15 La apariencia de resistencia antibiótica acoplada con la observación que los peces dejan de comer cuando se infectan, y de esta manera no consumen los alimentos medicados con antibióticos, se han sido sugerido como razones para la falla quimioterapéutica. Adicionalmente, existe un creciente cuerpo de evidencia para sugerir una fase de supervivencia intracelular durante la colonización del huésped (Barnes *et al.* (1999) Microbiology 145: 483-494). Por consiguiente, la profilaxis a través de la inmunización parece ser el medio más conveniente para controlar esta enfermedad.

20 Diversas estrategias de vacunación han sido sugeridas, basándose en las bacterias muertas con formalina (bacterinas), sin embargo, muchas de estas han fallado en producir una eficacia protectora reproducible (Romalde & Magarinos (1997) Fish Vaccinology, Karger, Basel, Switzerland, pp167-177). Esto puede reflejar la baja respuesta de anticuerpo, del huésped al agente infeccioso (Arijo *et al.* (1997) Fish Shellfish Immunol. 8: 63-72). Adicionalmente, poco se conoce de los antígenos protectores contenidos en estas preparaciones. Las preparaciones basadas en proteínas de membrana exterior restringidas de hierro (IROMPs) y bacterinas enriquecidas con productos extracelulares (ECP) han sido descritas (Magarinos *et al.* (1994) Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.14:120-122) pero no han sido efectivas en situaciones comerciales.

30 Es un hecho establecido que la bacteria tiene una exigencia absoluta de hierro, y *P. damsela* no es la excepción. Se ha demostrado que bajo condiciones en las cuales el hierro es limitante, ya sea por no incluir suficiente en el medio, o por incluir agentes quelantes que reducen su disponibilidad, una variedad de sistemas de absorción de hierro, de alta afinidad se expresan (Magarinos *et al.* (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 2990-2998). Estos incluyen sideróforos portadores de hierro y proteínas de membrana exterior restringidas de hierro (IROMPs). En otras especies bacterianas tales como *Aeromonas salmonicida* (Hirst & Ellis (1994) Fish Shellfish Immunol. 4:29-45) y *Pasteurella haemolytica* (UK patent specification 8805253 W Donachie, UK) las IROMPs han sido explotadas como antígenos protectores en vacunas exitosas. Sin embargo estas no parecen ser protectoras en la *P. damsela*, (Romalde & Magarinos (1997) Fish Vaccinology, Karger, Basel, Switzerland, pp167-177). Esta falta de protección puede reflejar la estrategia para la infección por *P. damsela*. bajo limitación de hierro, *P. damsela* produce incremento de la actividad de la proteasa (Bakopolous (1997) J. Fish Dis. 20: 297-305) e incremento del polisacárido capsular. El polisacárido capsular incrementa la resistencia a la aniquilación del suero y previene la fagocitosis por macrófagos huésped (Arijo *et al.* (1998) Fish Shellfish Immunol. 8: 63-72.). Es significativo como la *P. damsela* no es resistente al ataque por fagocitos (Skarmeta *et al.* (1995) Dis. Aquat. Org. 23: 51-57) como resultado a su falta de respuesta adaptativa a la muerte por especies de oxígeno reactivo producidas durante el despliegue respiratorio de macrófagos (Barnes *et al.* (1999) Microbiology 145: 483-495). Sin embargo, el incremento de la actividad proteolítica es capaz de liberar el hierro en la forma de hemo a través de la lisis de glóbulos rojos. El hemo se absorbe por la cápsula (Ana Do Vale, Pers. Comm.) y el hierro trasladado a través de la membrana por las IROMPs. De esta manera con el polisacárido capsular que actúa como el primer nivel de absorción de hierro de las IROMPs no se exponen durante el proceso de la enfermedad. Como los niveles de hierro incrementan, producción capsular disminuye, las IROMPs se apagan y la actividad proteolítica llega a ser indetectable (Bakopolous (1997) J. Fish Dis. 20: 297-305). Esto dejaría *P. damsela* susceptible a los anticuerpos y ataque macrófago.

55 Sin embargo, en este punto el organismo es capaz de adherirse a (Yoshida *et al.* (1997) J. Fish Dis. 20: 77-80) y entrar a las células de peces no-fagocíticas (Magarinos *et al.* (1996) FEMS Microbiology Lett. 138: 29-34) de esta manera evitando el ataque por anticuerpos o fagocitos.

60 Es una finalidad de la presente invención proporcionar una vacuna para la protección de los peces de una infección por bacterias tal como *Photobacterium damsela*.

Es otra finalidad de la invención, proporcionar un proceso para la producción de dicha vacuna.

65 De acuerdo con la presente invención se proporciona una vacuna y/o composición terapéutica que comprende material biológico derivado de un cultivo de *Photobacterium damsela*, caracterizado en que las células bacterianas han sido cultivadas en un medio de cultivo que contiene exceso de hierro sobre ese que se necesita para el crecimiento normal de la bacteria.

ES 2 308 987 T3

Por “que contiene exceso de hierro” el medio de cultivo debería contener al menos dos veces la cantidad de hierro en el caldo triptona soja estándar (Oxoid).

Preferiblemente el medio de cultivo contiene entre 0.5 μM y 1 mM de hierro.

Más preferiblemente el medio contiene entre 10 μM y 500 μM de hierro.

Más preferiblemente el medio contiene entre 25 μM y 500 μM de hierro.

Usualmente una proteína de membrana exterior, que se puede involucrar en la entrada en las células huésped o invasina o la adhesión, se expresa en niveles más altos que aquellos en un medio de cultivo normal.

Por “expresado en niveles más altos que aquellos en medio de cultivo normal” la proteína o invasina o la adhesión se expresa a al menos dos veces los niveles de expresión normales. Los niveles de expresión normales son niveles de expresión en el caldo triptona soja estándar (Oxoid).

Usualmente una proteína extracelular serológicamente relacionada con la invasina se expresa a niveles más altos que en el cultivo normal.

Usualmente un complejo de proteína extracelular de 55 Kda y/o una proteína de membrana exterior de 97 Kda se expresa a niveles más altos que aquellos en un medio de cultivo normal.

La invención también proporciona proteínas purificadas como se describe, para utilizar como vacunas o en la preparación de vacunas.

La invención también proporciona anticuerpos con las proteínas purificadas.

La invención también proporciona un método para la producción en donde las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene suficiente hierro de tal manera que las células se cargan con hierro al punto donde la absorción lineal del hierro a partir del medio de cultivo no ocurre más.

Preferiblemente las células se saturan con hierro.

Preferiblemente el hierro se suministra al medio en la forma de una sal férrica.

Preferiblemente la bacteria ha sido inactivada después del cultivo.

Preferiblemente la inactivación se realiza utilizando una composición de formaldehído.

La invención además proporciona células o membranas celulares o productos celulares de la bacteria cultivada.

El material biológico preferiblemente se proporciona en un portador fisiológicamente aceptable.

La composición de la invención preferiblemente incluye un adyuvante apropiado para mejorar la respuesta inmunológica.

De esta manera se proporciona, una composición de una vacuna para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de los peces para la infección por bacterias, particularmente por el organismo *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*.

La composición comprende los componentes producidos por un cultivo del organismo. El cultivo se trata para matar el organismo antes del uso, preferiblemente por el tratamiento con formalina después de que los componentes han sido producidos.

Dos de los componentes, involucrados en la invasión de células huésped y producidas en grandes cantidades, cuando el cultivo se aumenta en medio que contiene un exceso de hierro, induce la producción de anticuerpos en la inyección en los peces, que previenen la entrada del organismo en las células de los peces.

Estos anticuerpos protegen a los peces de una infección por el organismo.

La invención de esta manera también proporciona anticuerpos.

En una modalidad particular, el material biológico se deriva del cultivo de la cepa de *Photobacterium damselae* MT1415 depositada bajo el No. de acceso 41062 el 4 de Agosto 2000 en N.C.I.M.B. en Aberdeen, Reino Unido.

El presente inventor ha determinado que una proteína (invasina o adhesina) expresada en la membrana exterior bajo condiciones repletas de hierro se involucra con la internalización de la *P. damselae* por Células Fibroblásticas de Róbalo de Mar. Las lecitinas que se unen específicamente a esta proteína inhiben la capacidad invasiva de *P. damselae*, mientras que las lecitinas que no se unen a la proteína no inhiben significativamente la invasión de las líneas celulares

ES 2 308 987 T3

Fibroblastos de las Larvas de Róbalo de Mar (SBLs). Adicionalmente, los anticuerpos construidos contra esta proteína en róbalo de mar impiden la internalización de la bacteria por las células epiteliales del pescado (EPCs). La expresión de esta proteína se puede incrementar, mediante la adición de hierro férrico en la forma de cloruro férrico, en el medio de cultivo. Por ejemplo, la adición de cien micromolar (100 μ M) de cloruro férrico incrementa la expresión de la proteína por al menos 2.6 veces. Las bacterinas producidas por el cultivo de *P. damsela* bajo dicho suplemento de hierro son protectoras contra la pasteurellosis clínica en truchas arco iris y en besugo de mar joven.

El hierro se puede suplir con el medio de cultivo de cualquier modo que se produce su absorción por las células bacterianas de tal manera que resulta un incremento de la invasina. Otras condiciones del cultivo también pueden incrementar la expresión de esta proteína. Por ejemplo, se podrá expresar más, bajo anaerobiosis en la presencia de suficiente hierro. Sin embargo, las densidades celulares más altas se logran, mediante el cultivo de la bacteria entre 22°C y 35°C con agitación continua, u otro tipo de aireación, para mantener el contenido de oxígeno.

Las células de la vacuna de la invención se inactivan por cualquier método estándar, pero convenientemente por el uso de formaldehído. Otra preparación de la vacuna tal como adición de un adyuvante, concentración de las células, o resuspensión en un portador aceptable puede ofrecer una protección adicional.

Las vacunas de la invención y un método para su producción, serán descritas a manera de ilustración, solamente por referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes. Otras modalidades que están dentro del alcance de las reivindicaciones, pasaran por la mente de aquellos de habilidad en el oficio a la luz de estos.

Figuras

Figura 1. Muestra un histograma del porcentaje de supervivencia relativo (RPS) vs tratamiento con la vacuna para truchas arco iris desafiadas con los organismos del género *Photobacterium*.

Figura 2. Muestra un histograma del RPS vs tratamiento con la vacuna para dorada (*Sparus aurata*) desafiadas con organismos del género *Photobacterium*.

Figura 3. Muestra un Western blot de las proteínas de la membrana exterior de *P. damsela* (OMP, sendas 2,4,6,8) y productos celulares (ECP, sendas 3,5,7,9) teñidos con aurodye (para la proteína, sendas 1-5) y róbalo de mar vs *P. damsela* con suplemento de hierro (sendas 6-9), Mostrando claramente el complejo proteína de 97 KDa (senda 8) y proteína de 55 Kda (sendas 7, 9).

Figura 4. Muestra el porcentaje de células EPC con al menos una *P. damsela* intracelular preincubada con 2) suero normal de róbalo de mar o 3) antisuero róbalo de mar vs *P. damsela* invasina con 1) control.

Figura 5. Muestra la invasión de las células EPC/SBL por *P. damsela* incubadas con varias lecitinas, relativa a los controles no incubados previamente con las lecitinas.

Figura 6. Muestra un Western blot de OMPs de *P. damsela* producidas bajo condiciones con suplemento de hierro, probadas con las lecitinas y antisuero róbalo de mar vs *P. damsela* y conejo anti complejo 55 KDa. Sendas: 1) conejo vs anticuerpo complejo 55 KDa; 2) róbalo vs anticuerpo MT1415 3) aglutinina dolichos biflorus biotinilada; 4) lectina Concanavalin A biotinilada; 5) marcadores de peso molecular biotinilados Sigma.

Figura 7 muestra un Western blot, teñido con Róbalo de Mar vs anticuerpo *Photobacterium damsela*, de las proteínas de membrana exterior de las preparaciones de la vacuna que muestran ausencia del complejo 55 KDa en cultivo agotado de hierro (Vacuna B), comparado con cultivo con un suplemento de hierro (Vacuna A).

Figura 8 muestra el porcentaje de supervivencia relativo (RPS) del Róbalo de Mar *Dicentrarchus Labrax* desafiado con *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida* después de la vacunación con ya sea A) Vacuna que expresa el complejo OMP de 55 KDa y 97 KDa o B) Vacuna que NO expresa el complejo OMP de 55 KDa o 97 KDa (ver también la Figura 7).

Ejemplo 1

Producción de una vacuna de P. damsela que expresa la invasina

El caldo triptona de soja (Oxoid) se preparó en agua destilada a 30 g/l y se le adicionó cloruro de sodio a 20 g/l en matraces cónicos de tal manera que el volumen del matraz fue cinco veces el volumen del medio para permitir suficiente aireación. Después de la esterilización por autoclave a 121°C por 15 minutos, se adicionó cloruro férrico a una concentración final de 100 micromolar a partir de un stock estéril de 100 milimolar en agua destilada. El caldo se pre-calentó a 25°C y se sembró con 1/10000 volumen de un caldo de cultivo triptona soja toda la noche, que contiene 2% de sal, de *Photobacterium damsela* (cepa MT1415, aislado virulento de cápsula positiva según se deposita bajo el No. de acceso. 41062 el 4 de Agosto 2000 a N.C.I.M.B en Aberdeen, Reino Unido). La incubación se continuó a 25°C con agitación a 140 rpm por 40 horas. Después de la incubación, el cultivo se inactivó por adición de 0.5% de formalina v/v (0.2% de formaldehído libre) y el caldo se dejó a 25°C por 24 horas para permitir la inactivación

ES 2 308 987 T3

completa. La densidad óptica de la preparación final de la vacuna se determinó y la vacuna se almacenó a 4°C hasta que se necesite.

5 Para la administración, esta suspensión celular se administró en un número de maneras: La trucha arco iris (10-15 g) se conserva en agua dulce a 25°C se anestesia con MS222 (sigma). Los peces anestesiados se vacunaron por inyección intraperitoneal de la preparación de la vacuna pura (100 µl) o la preparación referencia o solución estandarizada de fosfato estéril como un control. Al menos 500 días extremos después de la inmunización, los peces se desafiaron por inyección de 10⁸ cfu de *P. damsela* virulento vía intraperitoneal. La mortalidad se registró diariamente y se determinó el RPS (porcentaje de supervivencia relativo), en comparación con el pescado control. Los resultados se mostraron en la Figura 1 abajo, en donde el RPS utilizando la presente invención se compara con un número de vacunas referencia. 1, vacuna referencia; 2, vacuna referencia; 3, vacuna restringida de hierro; 4, vacuna con suplemento de hierro (vacuna de la invención); 5, vacuna de caldo triptona soja estándar (TSB); 6-12, vacunas referencia.

15 De manera alternativa, 0.3 g de besugo de mar, se inmunizaron por solo 60 segundos de inmersión en una dilución de diez veces de la presente invención o vacuna referencia. 500 días extremos después de la vacunación, los peces se desafiaron por inmersión en una suspensión que contiene aproximadamente 10⁵ cfu/ml *P. damsela* virulenta por 1 hora a 25°C. La mortalidad se registró como se describe arriba. Los resultados se dan en la Figura 2: 1, vacuna restringida de hierro; 2, vacuna TSB; 3, vacuna con suplemento de hierro (invención).

20 *Identificación de los protectores antígenos*

La vacuna preparada como se describe arriba se utilizó para inmunizar el róbalo de mar (*Dicentrarchus labrax*) por inyección intraperitoneal. El adyuvante incompleto de Freund se administró simultáneamente en una relación de 1:1. Los peces se mantuvieron en agua de mar a 25°C por 20 días después de los cuales, recibieron una segunda dosis idéntica. Después de otros 20 días, los peces se purgaron y se recolectaron permitiendo que la sangre coagulara y retirando los glóbulos rojos por centrifugaron. Los sueros se dializaron contra solución salina estandarizada de fosfato y se almacenaron congelados a -80°C.

30 Las proteínas de membrana exterior (OMP) y los productos celulares (ECP) se prepararon de *P. damsela* cultivado con limitación de hierro, en TSB estándar, o con suplemento de hierro. Para la limitación de hierro, se adicionó el 2,2 dipiridil (100 micromolar) al caldo triptona soja para quelar el hierro antes de la inoculación con *P. damsela*. La incubación luego se realizó como se describe anteriormente. La OMP se prepara por precipitación siguiendo la solubilización de sarcosilo de la membrana interior (Hancock & Poxton (1988) Bacterial Cell Surface Techniques, John Wiley & Sons, Chichester, UK). Los productos extracelulares se recuperaron a partir de los sobrenadantes del caldo cultivo.

40 ECPs y OMP (concentraciones iguales de las proteínas) se corrieron sobre geles SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras y se realizó una transferencia sobre la membrana PVDF. Las membranas se probaron con *P. damsela* róbalo vs hierro-suplemento, seguido por anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina de ratón vs róbalo previamente descrito (Santos *et al.* (1997) Fish. Shellfish Immunol.7:175-191), seguido por cabra vs ratón conjugado con una enzima fosfatasa alcalina. Para visualizar las bandas, las membranas se incubaron en un sustrato que consiste de Nitroazul de tetrazolio y 5- Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. Los resultados se mostraron en la figura 3 y figura 7. En las preparaciones de OMP a partir de cultivos que contienen hierro una banda clara es visible cerca al marcador 97 el cual no está presente en el cultivo con limitación de hierro (figuras 3 y 7). Por densitometría de barrido se determinó que esta banda es al menos 2.6 veces más concentrada en OMPs a partir de cultivos suplementados con hierro que de los cultivos de TSB estándar, y no detectable en cultivos limitados de hierro. En las ECPs a partir de las células cultivadas en medios que contienen hierro, dos bandas fueron evidentes, una que corre cerca a 97 Kda parecía ser la misma como la banda vista en las preparaciones OMP. La otra fue más pequeña, que corre cerca a, pero debajo de, el marcador 55 KDa. Ninguna de estas bandas se detectó en OMPS o ECP a partir de células cultivadas en medios deficientes de hierro.

Inhibición de la invasión de células epiteliales del pescado por antisuero construido contra P. damsela suplemento de hierro

55 La capacidad de *P. damsela* para invadir las células epiteliales del pescado (EPC) se determinó por un método de conteo directo de marcación fluorescente descrito por Bandin *et al.* (1995) Dis Aquat. Org. 23: 221-227. Las células *P. damsela* se marcaron utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0.1 mg/ml) por 1 hora. *P. damsela* luego se lavaron extensamente en PBS y se resuspendieron a una densidad de 10⁹ células /ml. La suspensión celular se dividió y una alícuota incubada con suero inmune inactivado por calor preparada por el calentamiento del antisuero róbalo de mar vs suplemento de hierro *P. damsela* descrito arriba a 45°C por 15 minutos, mientras que una segunda alícuota se incubó con suero normal de róbalo de mar inactivado por calor. Las alícuotas (10 microlitros) de células *P.damsela* tratadas de suero se adicionaron a 6 x 10⁵ EPC células en 1ml de G-MEM, y se dejaron pegar e invadir por 2 horas a 25°C. Las bacterias externas se retiraron con un lavado en PBS y EPCs se contra-tiñieron con bromuro de etidio. Las alícuotas (10 µl) se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con un cubreobjetos antes del análisis por microscopía fluorescente. Las proporciones de bacterias internalizadas se determinaron por recuento directo de al menos 100 campos. Los experimentos se replicaron cuatro veces. Los resultados se presentan en la figura 4: 1, controles, *P. damaelae* sin suero; 2, *P. damsela* incubada con suero de róbalo normal inactivado por calor; 3, *P. damsela* incubada con antisuero inactivado por calor (róbalo vs *P. damsela*).

Identificación de la proteína asociada con la internalización de P. damsela en Células de Róbalo de Mar utilizando lecitinas

Trabajos previos sugieren que las entidades involucradas en la internalización de *P. damsela* en células de peces pueden ser glicoproteínas (Magarios *et al.*(1996) FEMS Microbiol Lett. 138: 29-34). Las cadenas laterales de carbohidratos de glicoproteínas se pueden unir específicamente por ciertas lecitinas. Las lecitinas son extractos de plantas con afinidades específicamente altas por configuraciones de ciertos azúcares. Incubando *P. damsela* con diferentes lecitinas luego determinando su capacidad para invadir células de fibroblastos larvales (SBL) del róbalo de mar, se identifican las lecitinas que son capaces de inhibir la invasión y aquellas que no son. Las glicoproteínas involucradas en la invasión entonces se podrían identificar por sondas de Western blots con lecitinas biotiniladas.

P. damsela, se marca con FITC, lava y se resuspende a una densidad de 10^9 cfu/ml como se describe arriba, se incubó por 1 hora con varias lecitinas (Vector Laboratories) a una concentración de $100 \mu\text{g}$ lectina/ml. Después de la incubación, las células se lavan extensamente y los ensayos de invasión se realizan como se describe arriba. Los resultados se presentan en la figura 5: *P. damsela* incubada con: 1, aglutinina Sophora japónica; 2, aglutinina Concanavalin A; 3, aglutinina Lens culinaris; 4, aglutinina Griffonia simplicifolia; 5, aglutinina de germen de trigo succinilado; 6, aglutinina Dolichos biflorus; 7, aglutinina de maní; 8, aglutinina de soja; 9, aglutinina Ulex europaeus; 10, aglutinina de germen de trigo.

Dos lecitinas que fueron capaces de inhibir fuertemente la invasión por *P. damsela*, aglutinina Sophora japónica (SJA) y aglutinina ConA (ConA) se seleccionaron. Una lectina que no inhibe la invasión, la aglutinina Dolichos biflorus (DBA) también se seleccionó. Las preparaciones biotiniladas de estas lecitinas (Vector Laboratories) se utilizaron para teñir Western blots de OMPs separadas de SDS-PAGE a partir de *P. damsela*. Los resultados se presentan en la figura 6:

Todas las lecitinas tiñeron un número de carbohidratos/glicoproteínas. Sin embargo, solo una región fue teñida por ConA, pero no teñida por DBA. Esta región consiste de un complejo de tres bandas de proteínas y tuvo un peso molecular aproximado de 55 Kda bajo condiciones no-reductoras y solo se detectó en las preparaciones OMP de *P. damsela* cultivadas bajo condiciones repletas de hierro, no en las preparaciones para *P. damsela* cultivadas bajo limitación de hierro. Adicionalmente, cuando los Western blots de OMPs a partir de *P. damsela* se cortaron y tiñeron con ConA lectina y antisuero róbalo de mar vs *P. damsela* suplementado con hierro una banda común, el complejo 55 Kda, fue teñido por ambos métodos. La senda 1 muestra OMPs probada con conejo vs complejo 55 KDa, La senda 2 muestra OMPs probadas con antisuero róbalo vs Photobacterium damsela MT1415 utilizado en el estudio de inhibición de la invasión. La senda 3 muestra OMPs probadas con la aglutinina dolichos biflorus, La senda 4 muestra OMPs probadas con lectina Concanavalin A, La senda 5 muestra marcadores de peso molecular biotinilados Sigma (SDS-6B).

Relación serológica entre la OMP de 97 KDa y la ECP de 55 KDa

La OMP de 97 KDa y la ECP de 55 KDa se sometieron a escisión cuidadosamente a partir de geles de poliacrilamida, homogenizada y se inyecta en róbalo de mar. Después de 30 días, los sueros se recolectaron y utilizaron para probar Western blots de OMPs y ECPs. Los antisueros construidos en róbalo de mar contra la OMP de 97 Kda reaccionaron en cruz con la ECP de 55 Kda. De manera similar, los anticuerpos construidos en róbalo de mar contra la ECP de 55 Kda también reaccionaron en cruz con la OMP de 97 KDa. El inventor sugiere que la ECP de 55 Kda es una versión segregada de la OMP de 97 Kda.

Purificación y secuencia N-terminal

La purificación posterior de la proteína de 55 Kda y la secuenciación han revelado tres proteínas en esta región. La principal proteína antigénica es N-terminal bloqueada, consistente con la glicosilación después de la transcripción, y por consiguiente incapaz de obtener una secuencia, sin embargo esta fracción tiene actividad hemaglutinante fuerte, que sugiere probable implicación en la internalización. Una segunda proteína dio una secuencia de aminoácido N-terminal con 100% de homología con β -1,4 N-acetil muramidasa, una defensa contra otra bacteria: AMKRHGLDNYRGYSLGNWVC. La tercera proteína puede ser un fragmento de una deaminasa o dehidratasa catabólica: NVVLHGDNFDSTXVVKAV.

Comparación de la eficacia protectora de vacunas que expresan el complejo 55 KDa con vacunas que no lo hacen en un estudio de desafío en Róbalo de Mar (Dicentrarchus labrax)

El siguiente estudio se llevó a cabo independientemente en CEFAS Weymouth Laboratory bajo el protocolo de estudio P0075, referencia 99008). Las vacunas que expresan el complejo de proteína 55 KDa se prepararon como sigue: 500 ml del caldo triptona de soja + 2% de NaCl (TSB2) que contiene 200 micromolar de cloruro férrico en un matraz erlenmeyer de 2.5 L se inoculo con un 0.01% v/v de inóculo de un cultivo por 18 h de TSB2 MT1415 de *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida*. El cultivo se cultivó con agitación a 140 rpm hasta la última fase de crecimiento exponencial (aproximadamente 40 horas) a 24°C. El cultivo resultante se inactivó con formalina (concentración final 0.2%), y la proteasa se inactivó, adicionando fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) a una concentración final de 100 micromolar de una solución stock de 100 milimolar en isopropanol.

ES 2 308 987 T3

Para preparar las vacunas en las cuales la expresión del complejo 55 KDa se inhibió completamente. El aislado MT1415 *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida* se subcultivó dos veces por 18 horas en TSB2 que contiene 100 micromolar de 2,2 dipiridil, un quelante de hierro. Este cultivo resultante, agotado de hierro completamente, se utilizó como el inóculo (0.5% v/v) para el cultivo de la vacuna que se cultivó en 500 ml de TSB2 que contiene 100 micromolar de 2,2 dipiridil en un matraz erlenmeyer de 2.5 L. con agitación a 140 rpm hasta la última fase de crecimiento exponencial (aproximadamente 48 horas) a 24 C. La ausencia del complejo 55Da a partir de esta preparación se confirmó por un análisis western blot de las proteínas de la membrana exterior preparadas a partir de un cultivo duplicado (Consultar la figura 7).

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citadas en la descripción

- GB 8805253 A [0005].

Literatura no-patente citada en la descripción

- GAULTHER *et al.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, 139-144 [0002]
- BARNES *et al.* *Microbiology*, 1999, vol. 145, 483-494 [0003]
- ROMALDE; MAGARINOS. *Fish Vaccinology*, 1997, 167-177 [0004]
- ARIJO *et al.* *Fish Shellfish Immunol.*, 1997, vol. 8, 63-72 [0004]
- MAGARINOS *et al.* *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 1994, vol. 14, 120-122 [0004]
- MAGARINOS *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 2990-2998 [0005]
- HIRST; ELLIS. *Fish Shellfish Immunol.*, 1994, vol. 4, 29-45 [0005]
- ROMALDE; MAGARI-OS. *Fish Vaccinology*, 1997, 167-177 [0005]
- BAKOPOLOUS. *J. Fish Dis.*, 1997, vol. 20, 297-305 [0005] [0005]
- ARIJO *et al.* *Fish Shellfish Immunol.*, 1998, vol. 8, 63-72 [0005]
- SKARMETA *et al.* *Dis. Aquat. Org.*, 1995, vol. 23, 51-57 [0005]
- BARNES *et al.* *Microbiology*, 1999, vol. 145, 483-495 [0005]
- YOSHIDA *et al.* *J. Fish Dis.*, 1997, vol. 20, 77-80 [0006]
- MAGARI-OS *et al.* *FEMS Microbiology Lett.*, 1996, vol. 138, 29-34 [0006]
- HANCOCK; POXTON. *Bacterial Cell Surface Techniques*. John Wiley & Sons, 1988 [0050]
- SANTOS *et al.* *Fish. Shellfish Immunol.*, 1997, vol. 7, 175-191 [0051]
- BANDIN *et al.* *Dis Aquat. Org.*, 1995, vol. 23, 221-227 [0052]
- MAGARIOS *et al.* *FEMS Microbiol Lett.*, 1996, vol. 138, 29-34 [0053].

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende material biológico derivado de un cultivo de *Photobacterium damsela* **carac-**
terizado en que las células bacterianas han sido cultivadas en un medio de cultivo que contiene al menos dos veces la
cantidad de hierro como en un caldo triptona soja estándar, en donde dicho material biológico incluye: una proteína
de membrana exterior de aproximadamente 97 kDa como se evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras,
que se involucran en la entrada en células huésped y/o una proteína extracelular de aproximadamente 55 kDa como se
evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras y en donde la proteína se expresa a niveles al menos dos veces
10 del nivel de expresión como en un caldo triptona soja estándar.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la proteína de membrana exterior es la invasina
y/o la proteína extracelular serológicamente se relaciona con la invasina.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la proteína de membrana exterior es la adhesina.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la proteína de membrana exterior es una proteína
de membrana exterior de 97 kDa.
- 20 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la proteína extracelular es una proteína extrace-
lular de 55 kDa.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la proteína extracelular de 55 kDa es un com-
plejo de proteína extracelular que comprende: (i) una proteína bloqueada N-terminal (ii) proteína con la secuencia
25 AMKRHGLDNYRGYSLGNWVC (iii) una proteína con la secuencia NVVLHGDNFDSTXVXVKAV.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición comprende una proteína de
membrana exterior de 97 kDa y una proteína extracelular de 55 kDa.
- 30 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición consiste de una proteína de
membrana exterior de 97 kDa y una proteína extracelular de 55 kDa.
9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en donde dicha composición comprende
los componentes producidos por cultivo de *Photobacterium damsela* MT1415 depositado bajo el No. de acceso 41062
35 en NCIMB en Aberdeen, UK.
10. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la fabricación de una vacuna
para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de los peces infectados por el organismo *Photobacterium damsela*.
- 40 11. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la fabricación de una vacuna para el trata-
miento profiláctico y/o terapéutico de los peces infectados por la subespecie piscicida del organismo *Photobacterium*
damsela.
12. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 10 o 11 para el tratamiento profiláctico y/o terapéu-
45 tico de pseudotuberculosis en los peces.
13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12 en donde los peces son peces marinos de agua
caliente.
- 50 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 en donde las especies de peces, se seleccionan de la trucha arco iris,
besugo de mar o róbalo de mar.
15. Proceso para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para utilizar en
una vacuna para peces que comprende: (i) cultivo de células de *Photobacteria damsela* en un medio de cultivo que
55 contiene al menos dos veces la cantidad de hierro como en el caldo triptona soja estándar y (ii) aislamiento de una
proteína de membrana exterior de *Photobacteria damsela* que es aproximadamente 97 kDa como se evalúa por SDS-
PAGE bajo condiciones no-reductoras que se involucra en la entrada en células huésped y/o una proteína extracelular
del *Photobacterium damsela* que es aproximadamente 55 kDa como se evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones no-
reductoras.
- 60 16. Proceso de acuerdo con la reivindicación 15 en donde en la etapa (ii) la proteína de membrana exterior de 97
kDa y/o una proteína extracelular de 55 kDa se aísla en la preparación de una vacuna para peces.
17. Proceso de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16 en donde se adiciona un adyuvante apropiado
65 para mejorar la respuesta inmunológica.
18. Anticuerpo construido contra una proteína de membrana exterior del *Photobacteria damsela* que es aproxi-
madamente 97 kDa como se evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras o construido contra una proteína

ES 2 308 987 T3

extracelular del *Photobacterium damsela*e que es aproximadamente 55 kDa como se evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

5 19. Composición de la vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso profiláctico y/o terapéutico en peces infectados por la bacteria.

20. Composición de la vacuna de acuerdo con la reivindicación 19 que adicionalmente comprende un adyuvante apropiado para mejorar la respuesta inmunológica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

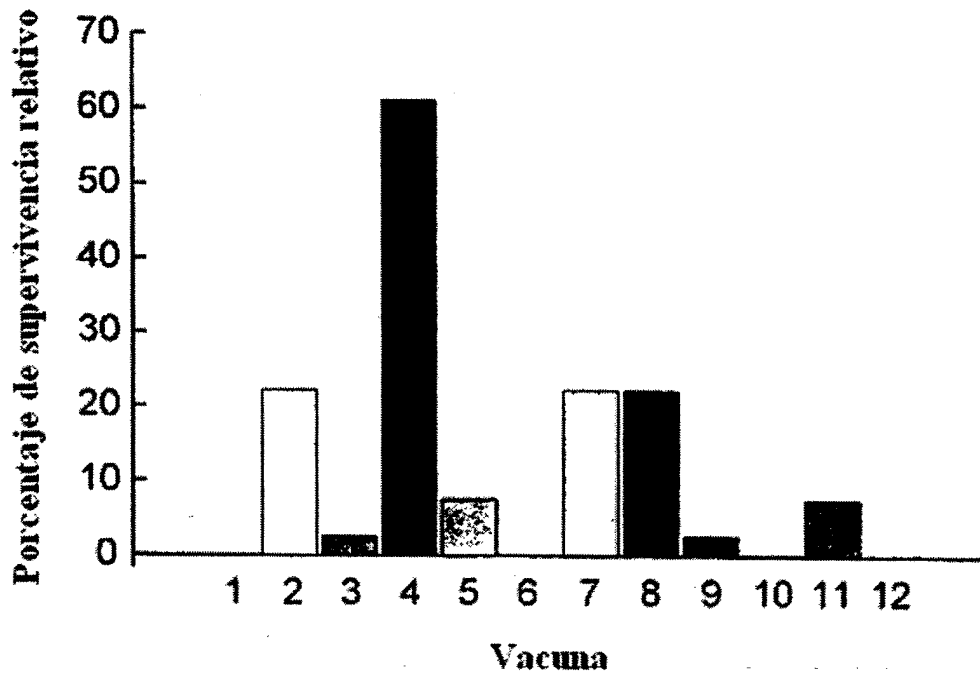


Fig 1

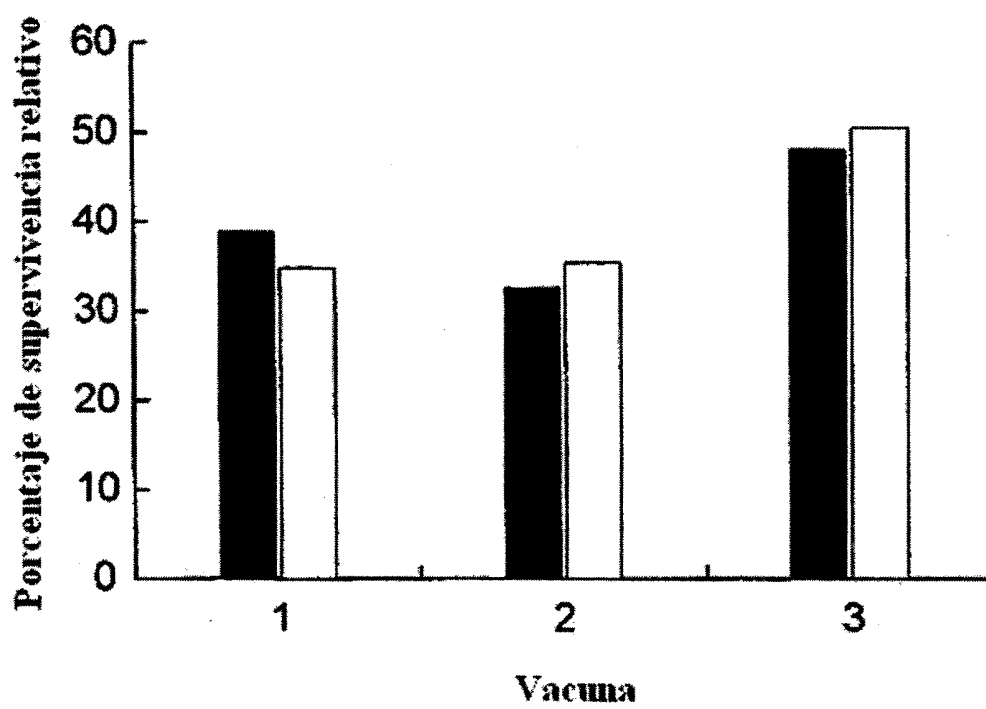


Fig 2

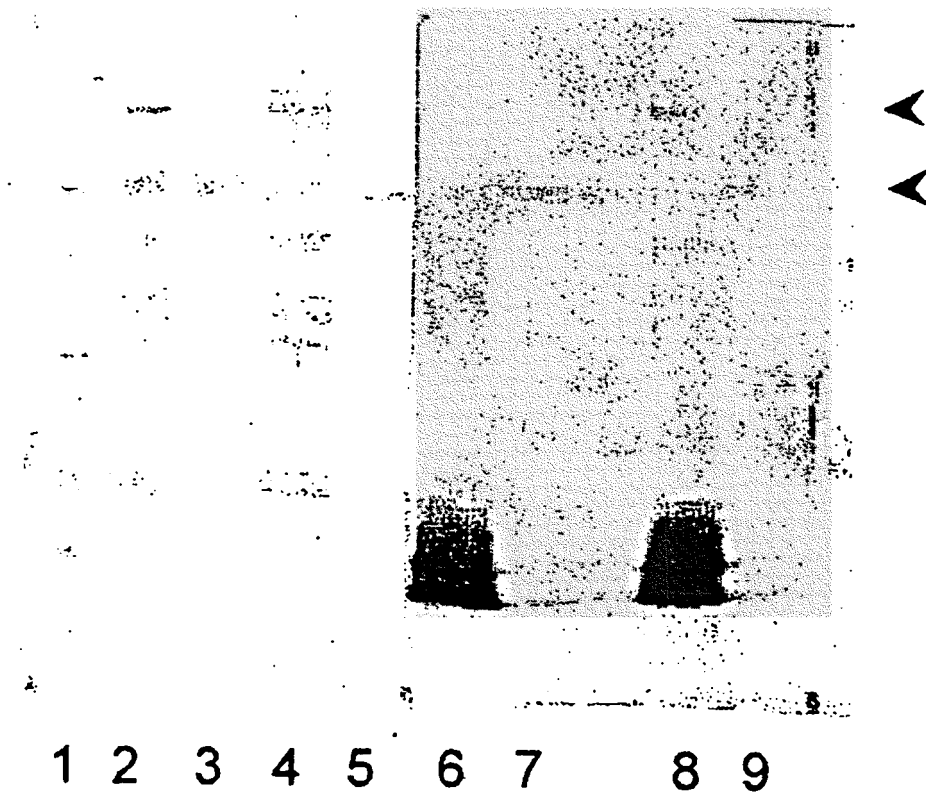


Fig 3

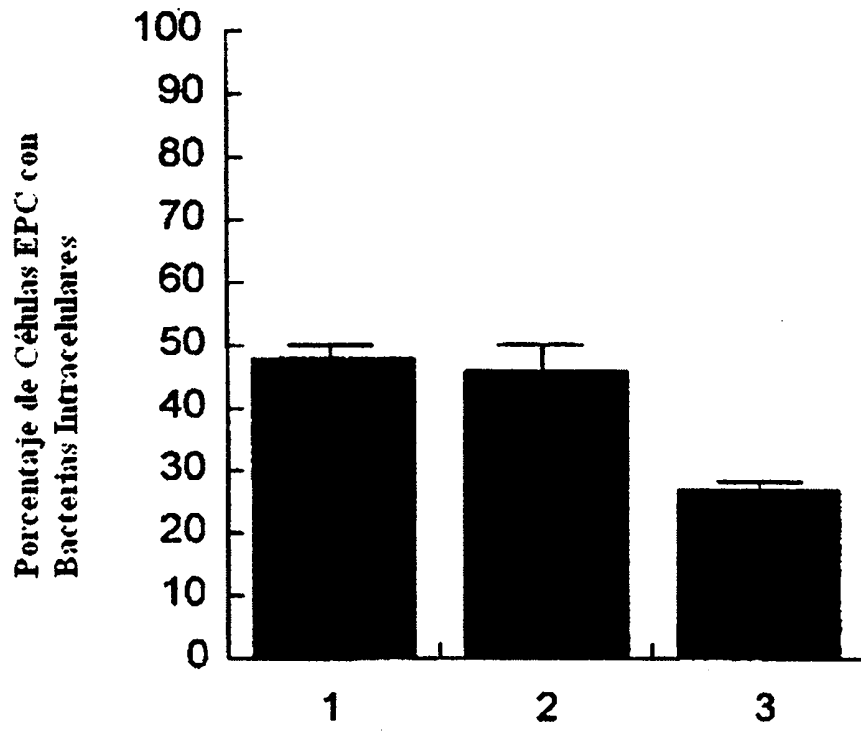


Fig 4

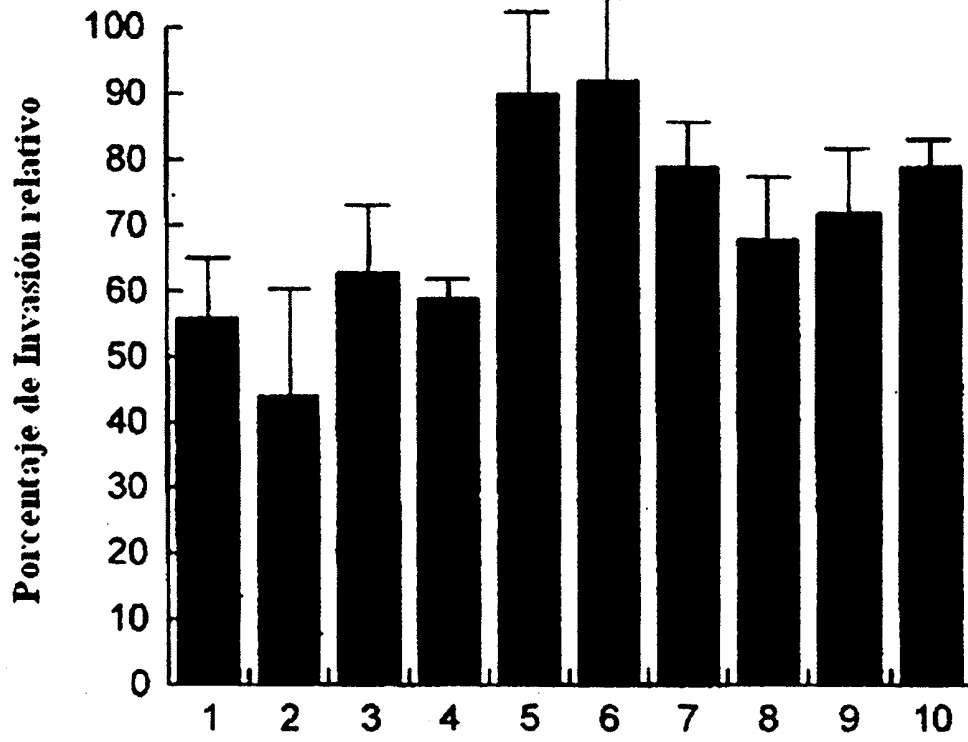


Fig 5

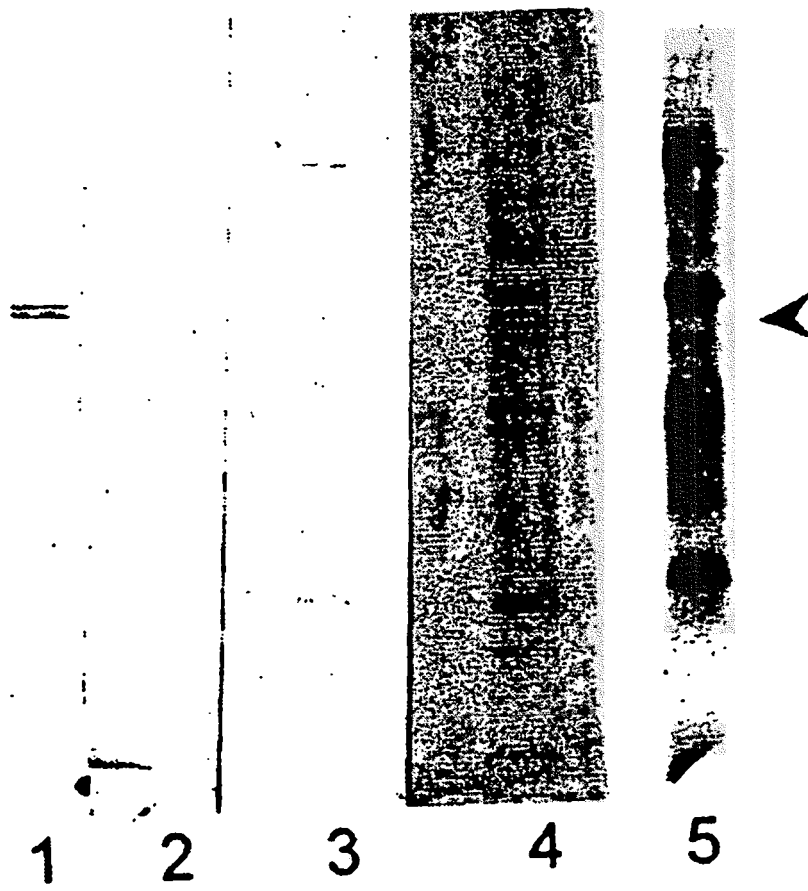


Fig 6



Fig 7

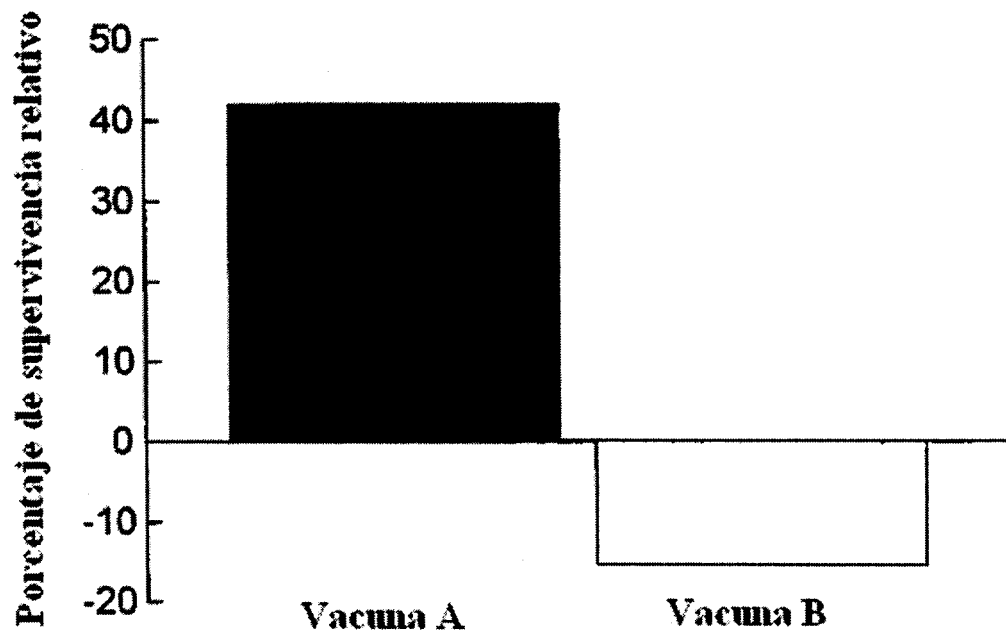


Fig 8