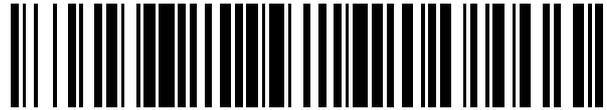


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 022**

51 Int. Cl.:

C07K 14/205 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2004 E 04784662 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **12.07.2006 EP 1678316**

54 Título: **Polipéptidos de Campylobacter y sus métodos de uso**

30 Prioridad:

19.09.2003 US 504119 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.02.2013

73 Titular/es:

**EPITOPIX, LLC (100.0%)
3735 COUNTY ROAD 5
WILLMAR, MN 56201, US**

72 Inventor/es:

**STRAUB, DARREN E. y
EMERY, DARYLL A.**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 022 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

ANTECEDENTES

- 5 **[0001]** *Campylobacter* spp. es parte de la flora intestinal normal de un amplia variedad de animales salvajes y domésticos con un nicho particular para el huésped aviar. *Campylobacter* spp. parece tener una capacidad limitada para ser patogénica en animales salvajes y domésticos. En ganado, *C. fetal subsp. jejuni* y *C. fetus subsp. intestinalis* han sido aisladas de intestinos y experimentalmente transmitidas a terneras rumiantes y prerumiantes que desarrollaron signos clínicos de fiebre, diarrea y disentería esporádica (Dannenberg et al. Am. J. Pathol. 34: 1099 (1958) y Thomas et al. Aust. Vet. J. 36: 146 (1981)). Se ha informado también de un síndrome de diarrea acuosa profusa con fiebre, anorexia y depresión en corderos con *Campylobacter fetus* como agente causante. Se ha informado también que *Campylobacter* spp. causa manifestaciones clínicas de disentería, adenomatosis intestinal y enteritis hemorrágica en cerdos y caballos, y mastitis en ganado comercial lechero.
- 10 **[0002]** En humanos, *Campylobacter* es la causa bacteriana más comúnmente informada de enfermedad diarreaica endémica en todo el mundo. En los Estados Unidos se está convirtiendo en la causa más extendida de infección de transmisión alimentaria y afecta a más de 2 millones de personas anualmente. En Inglaterra y Gales, alrededor de 50.000 casos de *Campylobacter* son comunicados anualmente sin signos de disminución de la incidencia. Se estima que por cada caso comunicado para vigilancia de laboratorio, ocurren otros siete casos sin comunicar. *C. jejuni* y *C. coli* son las dos especies aisladas más comunes responsables de *Campylobacteriosis* humana con *C. jejuni* siendo ahora la especie más frecuentemente aislable.
- 15 **[0003]** Se ha mostrado que el período de incubación después de ingestión de *C. jejuni* es aproximadamente 24-72 horas. El tamaño de inóculo requerido para provocar síntomas clínicos es tan bajo como 800 organismos. La tasa de enfermedad aumenta con números mayores ingeridos del organismo. Los síntomas comúnmente reportados de *Campylobacteriosis* humana incluyen diarrea, fiebre, y calambres abdominales. Con menos frecuencia, *Campylobacter*, particularmente *C. jejuni*, puede causar secuelas secundarias después de una infección aguda, incluyendo, artritis reactiva, fallo renal, Guillian-Barre, síndrome Reiter y otros síntomas extra intestinales.
- 20 **[0004]** La transmisión de *Campylobacter* spp. a poblaciones humanas es principalmente por medio de contaminación ambiental y alimentos contaminados, incluyendo aves de corral y productos de aves de corral tal como huevos. *Campylobacter* spp. puede aislarse del 30-100 % de las aves en muchas especies aviares salvajes y domésticas en cualquier momento dado. En los niños, el contacto con cachorros y gatitos con diarrea se ha mostrado como un importante factor adicional de riesgo. Algunas fuentes adicionales de infección han resultado de beber leche cruda derivada de vacas con mastitis clínica causada por *Campylobacter*. Todos los brotes transmitidos por leche han sido asociados con leche cruda o inapropiadamente pasteurizada.
- 25 **[0005]** La virulencia y patogénesis de *Campylobacter* spp. implica factores específicos tanto del huésped como del patógenos. Muchos determinantes de virulencia patógena-específica contribuyen a la patogénesis de estas bacterias. La virulencia bacteriana de estas bacterias es el resultado de muchos atributos diferentes, los cuales a menudo contribuyen a diferentes etapas en la complicada serie de sucesos reconocida como una infección. La exposición tiene lugar principalmente por el consumo de agua contaminada, comida o por contacto directo de persona a persona. Una vez ingeridas, las etapas de infección comunes a estas bacterias incluyen fijación, colonización, proliferación, daño al tejido, invasión y diseminación.
- 30 **[0006]** La primera barrera del huésped que la *Campylobacter* debe normalmente superar es la superficie mucosa. Una sola capa celular epitelial separa el huésped del lumen del tracto gastrointestinal. Esta barrera y una plétora de otros mecanismos antimicrobianos del huésped disuaden a los microorganismos comensales, patogénicos y oportunistas de establecer la infección. La adherencia a las superficies mucosas es un requisito previo de este patógeno para establecer la infección. Uno de las manifestaciones clínicas más marcadas de la colonización intestinal es la diarrea. Se ha propuesto que este síndrome clínico es producido por la síntesis y excreción de enterotoxinas que causan una secreción neta de fluido y electrolitos (diarrea). Otros factores de virulencia específica incluyen los flagelos, que ayudan a la bacteria a superar el movimiento de compensación de la peristalsis y permite al organismo entrar y cruzar la capa mucosa que cubre el epitelio (Black et al., J. Infect. Dis. 157:472-479 (1988), Caldwell et al., Infect Immun. 50:941-943 (1985), Morooka et al., J. Gen. Micro. 131:1973-1980 (1980) y Newell et al. J. Hyg. Camb. 95:217-227 (1985)). Otros determinantes de patogenidad sospechados incluyen quimiotaxia, adquisición de hierro, invasión celular del huésped, inflamación y secreción activa y disrupción epitelial con goteo de fluido seroso (Black et al. J. Infect. Dis. 157: 472-479 (1988)).
- 35 **[0007]** Los iones metálicos divalentes tales como hierro, cobalto, cobre, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, y cinc son elementos traza a menudo requeridos para la supervivencia de bacterias que infectan a huéspedes tanto animales como humanos. Estos elementos traza metálicos son usados por bacterias como cofactores para enzimas que catalizan reacciones bioquímicas para diversas rutas metabólicas y sistemas de transporte requeridos por el organismo. Los metales hierro, cinc y manganeso son los tres metales más importantes requeridos para la supervivencia de la bacteria. Iones de cinc son esenciales para la actividad de polimerasa de ADN y ARN, mientras que el manganeso es requerido para actividad superóxido dismutasa mitocondrial. El hierro es el más profundamente estudiado de todos los iones metálicos con correlaciones directas en la virulencia y la patogénesis de bacterias. El
- 40
- 45
- 50
- 55

hierro es esencial para toda vida y se requiere para rutas metabólicas y enzimáticas de los organismos en todos los niveles filogénicos.

5 **[0008]** La capacidad de *Campylobacter* para evadir los mecanismos naturales de defensa del huésped vertebrado depende en parte de su capacidad para obtener hierro huésped, el cual a su vez influye directamente en la interacción patógeno-huésped. A causa de la naturaleza esencial del hierro, los huéspedes vertebrados han desarrollado mecanismos elaborados para ligar hierro a fluidos corporales (por ejemplo, transferrina en fluidos sanguíneo y linfático y lactoferrina en secreciones externas). Estas proteínas de unión a hierro de alta afinidad crean un entorno restringido de hierro dentro del huésped reduciendo el nivel de hierro hasta aproximadamente 10^{-18} molar, una concentración demasiado baja para soportar el crecimiento de casi todas las bacterias. Estos mecanismos secuestrantes de hierro del huésped actúan como un mecanismo de defensa natural para combatir la invasión bacteriana. Para eludir estas condiciones restrictivas de hierro muchas especies bacterianas tienen mecanismos evolucionados para obtener hierro. 10 Los mecanismos más comunes incluyen la difusión de hierro soluble a través de porinas y sistemas de transporte especializados que median la ingesta de hierro por sideróforos. Este último sistema es con mucho el mecanismo más ampliamente extendido o ubicuo para la adquisición de hierro e implica la quelación específica de hierro férrico por sideróforos y la síntesis de sus sistemas de transporte cognados, lo que permite a las bacterias continuar replicándose y superar los mecanismos de defensa no específicos del huésped. La replicación continuada, y por ello cada paso en el proceso infeccioso, depende finalmente de la capacidad del organismo para obtener hierro de su huésped.

20 **[0009]** Con tantas funciones básicas confiando en la disponibilidad de hierro, las bacterias han desarrollado una red regulatoria compleja para adquirir hierro bajo condiciones fisiológicas variantes. El hierro es un catión divalente que existe tanto en el estado ferroso (Fe^{2+}) como el estado férrico (Fe^{3+}). Bajo condiciones anaeróbicas, el hierro está presente en la forma ferrosa soluble (Fe^{2+}) y puede libremente difundirse a través de las porinas de la membrana externa dentro del periplasma. Por ejemplo, en *E. coli* el sistema de transporte de FeoAB presente en la membrana citoplasmática transportará las moléculas de hierro ferroso dentro del citoplasma celular. Bajo condiciones aeróbicas y pH neutro, el hierro está principalmente presente en la forma insoluble férrica (Fe^{3+}) y no puede pasar a través de las porinas de la membrana externa por difusión pasiva. En lugar de ello, moléculas llamadas sideróforos son segregadas por las bacterias, las cuales tienen una alta afinidad para el hierro férrico. Los complejos ferri-sideróforos son reconocidos por receptores en la membrana externa, colectivamente referidos como los receptores dependientes de TonB. Estos receptores, una vez unidos a sideróforos cargados, se creen que interactúan con TonB y sus proteínas asociadas localizadas en el periplasma y la membrana citoplasmática. Estas interacciones proteína-proteína, aunque pobremente entendidas, sirven para proporcionar la energía necesaria para transportar los complejos ferri-sideróforos por de la membrana externa y a través del espacio periplásmico. Los sistemas de transporte ABC presentes en la membrana citoplasmática sirven para transportar los complejos hierro-sideróforo por la membrana citoplasmática. Las enzimas de reductasa entonces sirven para reducir el hierro férrico a su forma ferrosa, lo que lo disocia del sideróforo y libera hierro dentro de la célula.

35 **[0010]** Diversas especies de bacterias patogénicas usan mecanismos adicionales para obtener hierro de huéspedes mamíferos, incluyendo la unión directa de heme y hemoglobina. Las proteínas receptoras que ligan estas moléculas conteniendo hierro confían más probablemente en el complejo TonB para la energía requerida para transportar heme a lo largo de la membrana externa, parecido a los complejos hierro-sideróforo. Los portadores ABC especializados son entonces usados para transportar el heme por la membrana citoplasmática. Además, algunas bacterias segregan hemóforos, pequeñas moléculas que pueden ligar heme y lo presentan a receptores sobre la superficie celular bacteriana. Diversas especies patogénicas también producen hemolisinas, que son toxinas que lisan hematíes, liberando heme y hemoglobina para ingerirse por la bacteria.

45 **[0011]** Las proteínas de membrana externa de bacterias gram-negativas controlan la permeabilidad selectiva de muchos nutrientes esenciales para la supervivencia de las bacterias, incluyendo todas las bacterias patogénicas que causan enfermedad en animales y humanos. Esta permeabilidad selectiva de los nutrientes es controlada por una clase de proteínas de membrana llamadas porinas. Ahora parece que la mayoría de las proteínas de la membrana externa sobre la superficie de las bacterias gram-negativas son porinas, identificadas como las porinas generales (por ejemplo, OmpF), porinas monoméricas (por ejemplo, OmpA), las porinas específicas (por ejemplo, la porina LamB específica de maltosa) y las porinas de compuerta dependientes de TonB (por ejemplo, la FepA receptora de sideróforo). La clase porina de proteínas generalmente comparte características estructurales, incluyendo la presencia de barriles beta que abarcan la membrana exterior.

50 **[0012]** Se conoce poco acerca de la adquisición de hierro por *Campylobacter spp.* Los estudios indican que *C. jejuni* no sintetiza sideróforos (Field et al. Infect. Immun. 54:126-132 (1986) y Picket et al. Infect Immun. 60: 3872-3877 (1992)). Estos datos han sido confirmados por el análisis de secuencia del genoma de *C. jejuni* en el que no fueron identificados homólogos de los genes comunes de síntesis de sideróforos. *C. jejuni* está limitado en los compuestos de hierro que puede usar como se ha demostrado por diversos ensayos de alimentación. Estos ensayos demostraron que *C. jejuni* puede usar los sideróforos enteroquelina y ferricromo pero no aerobactina, desferal, ferritina, lactoferrina, o transferrina. Por tanto, se ha sugerido que se requieren otros compuestos de hierro para soportar el crecimiento de *Campylobacter spp.* tal como los compuestos heme como hemina y hemoglobina, hierro férrico, y hierro ferroso. El hecho de que *Campylobacter* tiene sistemas conocidos de transporte para sideróforos, aunque es incapaz de sintetizarlos, sugiere 60

que estas bacterias recuperan sideróforos producidos por otros patógenos entéricos (Arnoud et al. FEMS Microbiol. Rev. 26: 173-186 (2002)).

RESUMEN

5 [0013] La presente invención proporciona una composición de acuerdo a la reivindicación 1. La divulgación proporciona un polipéptido aislado regulado por metal obtenible a partir de una *Campylobacter spp.*, en el que el polipéptido está expresado por una *Campylobacter spp.* a un nivel detectable durante el crecimiento bajo condiciones metálicas bajas y no se expresa por la *Campylobacter spp.* a un nivel detectable durante el crecimiento en condiciones metálicas altas, y una composición incluyendo el polipéptido. El polipéptido aislado regulado por metal puede tener un peso molecular de entre 150 kDa y 152 kDa, entre 143 kDa y 145 kDa, entre 123kDa y 125 kDa, entre 92 kDa y 94 kDa, entre 88 kDa y 90 kDa, entre 73 kDa y 75 kDa, entre 69 kDa and 71 kDa, entre 51 kDa and 53 kDa, entre 50 kDa and 52 kDa, or entre 38 kDa y 40 kDa. La composición puede además incluir un segundo polipéptido regulado por metal con un peso molecular de entre 57 kDa y 59 kDa, entre 54 kDa, y 56 kDa, entre 47 kDa y 49 kDa, entre 42 kDa y 44 kDa, entre 37 kDa y 39 kDa, o entre 28 kDa y 30 kDa, en el que el segundo polipéptido se expresa por una *Campylobacter spp.* durante el crecimiento en condiciones metálicas altas y expresado en un nivel aumentado durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas.

10 [0014] La divulgación también proporciona un polipéptido aislado regulado por metal obtenible de una *Campylobacter spp.*, en el que el polipéptido se expresa por una *Campylobacter spp.* durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas, y una composición incluyendo el polipéptido. El polipéptido regulado por metal puede tener un peso molecular de entre 57 kDa y 59 kDa, entre 54 kDa y 56 kDa, entre 47 kDa y 49 kDa, entre 42 kDa y 44 kDa, entre 37 kDa y 39 kDa, o entre 28 kDa y 30 kDa.

15 [0015] La composición puede además incluir un segundo polipéptido regulado por metal con un peso molecular de entre 150 kDa y 152 kDa, entre 143 kDa y 145 kDa, entre 123kDa y 125 kDa, entre 92 kDa y 94 kDa, entre 88 kDa y 90 kDa, entre 73 kDa y 75 kDa, entre 69 kDa y 71 kDa, entre 51 kDa y 53 kDa, entre 50 kDa y 52 kDa, o entre 38 kDa y 40 kDa, en donde el segundo polipéptido se expresa por una *Campylobacter spp.* a un nivel detectable durante el crecimiento bajo condiciones metálicas bajas y no es expresado por la *Campylobacter spp.* a un nivel detectable durante el crecimiento en condiciones de metálicas altas.

20 [0016] La divulgación también incluye métodos para usar las composiciones aquí reveladas, incluyendo métodos para tratar una infección en un sujeto, para tratar una enfermedad causada por una *Campylobacter spp.*, para disminuir la colonización de un animal. Los métodos incluyen administrar una cantidad eficaz de una composición a un animal, donde la composición incluye un polipéptido aislado regulado por metal obtenible a partir de una *Campylobacter spp.*

25 [0017] La presente invención incluye una composición de acuerdo a la reivindicación 3.

30 [0018] La presente invención incluye una composición de acuerdo a la reivindicación 4.

35 [0019] También se incluye en esta divulgación una composición incluyendo una preparación aislada de células enteras de una *Campylobacter spp.*, donde las células incluyen bien un polipéptido regulado por metal expresado por *Campylobacter spp.* durante el crecimiento bajo condiciones metálicas bajas y no expresado durante el crecimiento en condiciones metálicas altas, un polipéptido regulado por metal expresado por la *Campylobacter spp.* durante el crecimiento en condiciones metálicas altas y expresado a un nivel aumentado durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas, o la combinación de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 [0020]

Figura 1. Imagen gel del perfil de proteína de membrana extraída de *Campylobacter jejuni* expresado bajo condiciones de crecimiento de saturación de hierro y déficit de hierro.

Figura 2. La diferencia en depósito fecal entre ratones vacunados y no vacunados tras exposición oral con *Campylobacter jejuni*. Log 10 CFU, número medio de bacterias en la muestra fecal.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

50 [0021] La divulgación proporciona polipéptidos y composiciones incluyendo polipéptidos. Como aquí se usa, "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos ligado por uniones de péptidos. Así, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína, y encima son incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término también incluye modificaciones de post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. El término polipéptido no connota una longitud específica de un polímero de aminoácidos. Un polipéptido puede ser obtenible directamente de un origen natural, o puede ser preparado con la ayuda de técnicas químicas, enzimáticas, o recombinantes. En el caso de un polipéptido o polinucleótido que ocurre naturalmente, tal polipéptido o polinucleótido es normalmente aislado. Un polipéptido "aislado" es uno que ha sido retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que ha sido retirado del citoplasma o de la membrana externa de una

célula, y muchos de los polipéptidos, ácidos nucleicos, y otras materias celulares de su entorno natural no están ya presentes. Un polipéptido "purificado" es uno que está al menos 60% libre, preferiblemente 75% libre, y más preferiblemente 90% libre de otros componentes con los cuales está naturalmente asociado. Los polipéptidos que son producidos fuera del organismo en el que ocurre naturalmente, por ejemplo, por medios recombinantes o químicos, se consideran aislados y purificados por definición, ya que no estuvieron nunca presentes en un entorno natural. A menos que se especifique de otro modo, "un", "el" y "al menos uno" son usados indistintamente y significa uno o más de uno.

[0022] Los polipéptidos de la divulgación son obtenibles de un miembro de la familia Campylobacteriaceae, (Vandamme et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 451-455 (1991)), preferiblemente el género *Campylobacter*. Un miembro del género *Campylobacter* es también referido aquí como *Campylobacter spp.* Ejemplos de *Campylobacter spp.* de los que pueden obtenerse polipéptidos de la divulgación incluyen *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. sputorum*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. hominis*, *C. fetus*, *C. intestinalis* y *C. doylei*. La *Campylobacter spp.* del cual se obtienen las composiciones de la presente invención es *C. jejuni*. Estos microbios están comercialmente disponibles desde un depositario tal como American Type Culture Collection (ATCC). Además, tales microbios son fácilmente obtenibles por técnicas de aislamiento conocidas y usadas en la técnica. Por ejemplo, un microbio puede derivarse de un animal infectado como un aislado de campo, y utilizado para obtener polipéptidos de la divulgación como aquí se ha descrito, o almacenados para uso futuro, por ejemplo, en un depósito congelado a unos -20°C hasta unos -95°C, en un medio bacteriológico apropiado conteniendo 20% de glicerol, y otros medios similares. Los métodos para obtener los polipéptidos de *Campylobacter spp.* se describen aquí.

[0023] Un polipéptido de la divulgación puede estar caracterizado por peso molecular. El peso molecular de un polipéptido, normalmente expresado en kilodaltons (kDa), puede ser determinado usando métodos de rutina incluyendo, por ejemplo, filtración de gel, electroforesis de gel incluyendo electroforesis de gel de poliácridamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), electroforesis capilar, espectrometría de masas, y cromatografía líquida incluyendo HPLC. Los polipéptidos de la divulgación puede ser polipéptidos regulados por metal. Como se usa aquí, un "polipéptido regulado por metal" es un polipéptido que está expresado por un miembro del género *Campylobacter* a un nivel mayor cuando el microbio crece en condiciones metálicas bajas en comparación con el crecimiento de los mismos microbios en condiciones metálicas altas. Los metales son los presentes en la tabla periódica en los Grupos 1 a 17 (notación IUPAC; también referidos como Grupos I-A, II-A, III-B, IV-B, V-B, VI-B, VII-B, VIII, I-B, II-B, III-A, IV-A, V-A, VI-A, y VII-A, respectivamente, bajo la notación CAS). Preferiblemente, los metales son aquellos en los Grupos 2 a 12, más preferiblemente, Grupos 3-12. Todavía más preferiblemente, el metal es hierro, cinc, cobre, magnesio, níquel, cobalto, manganeso, molibdeno, o selenio, más preferiblemente, hierro.

[0024] Por ejemplo, un tipo de polipéptido regulado para metal producido por *Campylobacter spp.* no se expresa a niveles detectables durante el crecimiento del microbio en condiciones metálicas altas pero expresado a niveles detectable durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas. Las condiciones metálicas bajas y las condiciones metálicas altas son descritas aquí en mayor detalle. Ejemplos de tales polipéptidos regulados por metal obtenibles de una *Campylobacter spp.* tienen pesos moleculares (como se determina por separación de los polipéptidos usando un gel apilador de cerca de 4% sobre un gel de resolución de cerca de 10% bajo condiciones reductoras y desnaturizantes de entre 150 kDa y 152 kDa, entre 143 kDa y 145 kDa, entre 123kDa y 125 kDa, entre 92 kDa y 94 kDa, entre 88 kDa y 90 kDa, entre 73 kDa y 75 kDa, entre 69 kDa y 71 kDa, entre 50 kDa y 53 kDa, o entre 38 kDa y 40 kDa. Preferiblemente, los polipéptidos regulados por metal tienen pesos moleculares de 151 kDa, 144 kDa, 124 kDa, 93 kDa, 89 kDa, 74 kDa, 70 kDa, 52 kDa, 51 kDa, o 39 kDa.

[0025] Otro tipo de polipéptido regulado por metal producido por *Campylobacter spp.* se expresa a niveles detectables durante el crecimiento de los microbios en condiciones metálicas altas pero se expresa a niveles elevados durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas. La expresión de tales polipéptidos se refiere aquí como "mejorada" durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas. Ejemplos de polipéptidos regulados por metal mostrando expresión mejorada y obtenibles a partir de *Campylobacter spp.* tienen pesos moleculares (determinados por separación de los polipéptidos utilizando un gel SDS-PAGE de cerca de 10 % bajo condiciones desnaturizantes y reductoras) de entre 57 kDa y 59 kDa, entre 54 kDa y 56 kDa, entre 47 kDa y 49 kDa, entre 42 kDa y 44 kDa, entre 37 kDa y 39 kDa, o entre 28 kDa y 30 kDa. Preferiblemente, los polipéptidos regulados por metal con expresión mejorada tienen pesos moleculares de 58 kDa, 55 kDa, 48 kDa, 43 kDa, 38 kDa, o 29 kDa.

[0026] Si un polipéptido regulado por metal se expresa a un nivel detectable o tiene una expresión mejorada durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas puede determinarse por métodos útiles para comparar la presencia de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, filtración de gel, electroforesis de gel incluyendo electroforesis de gel de poliácridamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), electroforesis capilar, espectrometría de masas, y cromatografía líquida incluyendo HPLC. Cultivos separados de una *Campylobacter spp.* son cultivados bajo condiciones metálicas altas y bajo condiciones metálicas bajas, polipéptidos de la divulgación se aíslan como aquí se describe, y los polipéptidos presentes en cada cultivo son resueltos y comparados. Normalmente, se usa una cantidad igual de polipéptido de cada cultivo. Por ejemplo, cuando se usa electroforesis de gel de poliácridamida SDS para comparar los polipéptidos, unos 30 µg microgramos de polipéptido de cada cultivo y se cargan en un pocillo. Tras correr el gel y teñir los polipéptidos, los dos carriles pueden ser comparados.

[0027] Preferiblemente, los polipéptidos de la divulgación tienen actividad innumogénica. "Actividad inmunogénica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para provocar una respuesta inmunológica en un animal. Una respuesta inmunológica a un polipéptido es el desarrollo en un animal de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos al polipéptido. Normalmente, una respuesta inmunológica incluye pero no está limitada a uno o más de los siguientes efectos: producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras, y/o células T citotóxicas, dirigidas a un epítipo o epítipos del polipéptido. "Epítipo" se refiere al sitio en un antígeno al cual responden células B y/o células T específicas de tal modo que se producen anticuerpos y/o una respuesta inmune celular.

[0028] También se proporcionan por la divulgación preparaciones de células enteras de un microbio, donde el microbio expresa uno o más de los polipéptidos de la divulgación. Las células presentes en una preparación de células enteras están preferiblemente desactivadas de forma que las células no pueden replicarse, pero la inmunogenicidad de los polipéptidos de la divulgación expresada por el microbio se mantiene. Típicamente, las células son matadas por exposición a agentes tales como glutaraldehído, formalina, o formaldehído. La presente invención incluye una composición de la reivindicación 3.

[0029] *Composiciones.* La divulgación también proporciona composiciones incluyendo al menos alrededor de 1 de los polipéptidos de la divulgación, más preferiblemente al menos unos 2, al menos unos 3, al menos unos 4, y así sucesivamente, hasta al menos unos 8 polipéptidos de la divulgación. Una composición puede incluir polipéptidos obtenibles a partir de 1 especie de *Campylobacter*, o pueden ser obtenibles a partir de una combinación de 2 o más especies de *Campylobacter*, por ejemplo, *C. jejuni* y una segunda *Campylobacter* distinta a *C. jejuni*. Además, una composición puede incluir polipéptidos obtenibles de 2 o más cepas de la misma especie de *Campylobacter*. Por ejemplo, una composición puede incluir polipéptidos obtenibles de 2 aislados diferentes de *C. jejuni*.

[0030] Opcionalmente, un polipéptido de la divulgación puede ser unido de forma covalente a un polipéptido portador para mejorar las propiedades inmunológicas del polipéptido. Polipéptidos portadores útiles son conocidos en la técnica. El acoplamiento químico de un polipéptido de la divulgación puede ser llevado a cabo utilizando métodos conocidos y rutinarios. Por ejemplo, pueden usarse diversos reactivos reticuladores homobifuncionales y/o heterobifuncionales tales como bis(sulfosuccinimidil) suberato, bis(diazobenzidina), dimetil adipimidato, dimetil pimelimidato, dDimetil superimidato, disuccinimidil suberato, glutaraldehído, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, sulfo-m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimido-fenil) butirato y (1-etilo-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, generally and Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY (1988)).

[0031] Preferiblemente, tales composiciones de la divulgación incluyen bajas concentraciones de lipopolisacárido (LPS). LPS es un componente de la membrana externa de la mayoría de los microbios gram-negativos (ver, por ejemplo, Nikaido and Vaara, Outer Membrane, In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt et al., (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 7-22 (1987)), y normalmente incluye polisacáridos (cadena específica O, el núcleo interno y externo) y la región A de lípido. El componente A de lípido de LPS es el componente activo más activo biológicamente de la estructura de LPS y junto induce un espectro amplio de efectos patofisiológicos en mamíferos. Los efectos más importantes son fiebre, coagulación intravascular diseminada, activación de complemento, shock hipotensivo, y muerte. La actividad inmunoestimuladora de LPS no específica puede potenciar la formación de un granuloma en el lugar de administración de las composiciones que incluyen LPS. Tales reacciones pueden resultar en estrés indebido del animal por el que el animal puede desistir de comida o agua durante un periodo de tiempo, y exasperar enfermedades infecciosas en el animal. Además, la formación de un granuloma en el lugar de inyección puede aumentar la probabilidad de degradación de la carcasa debido a la cicatrización o dañado del tejido en el lugar de inyección (ver, por ejemplo, Rae, Injection Site Reactions, disponible en www.animal.ufl.edu/short94/rae.htm).

[0032] La concentración de LPS puede ser determinada utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica. Tales métodos normalmente incluyen la medición del ligado de colorante por LPS (ver, por ejemplo, Keler and Nowotny, Analyt. Biochem., 156, 189 (1986)) o el uso de un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (ver, por ejemplo, Endotoxins and Their Detection With the *Limulus* Amebocyte Lystate Test, Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY (1982)). Existen cuatro métodos básicos comercialmente disponibles que son normalmente utilizado con un ensayo de LAL: el ensayo de gel clot; el ensayo turbidimétrico (espectrofotométrico); el ensayo colorimétrico; y el ensayo cromogénico. Un ejemplo de un ensayo de gel clot está disponible bajo la marca E-TOXATE (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; ver Sigma Technical Bulletin No. 210), y PYROTELL (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA). Normalmente, las condiciones de ensayo incluyen poner en contacto la composición con una preparación conteniendo un lisado de los amebocitos circulantes del cangrejo caderola, *Limulus polyphemus*. Cuando se expone a LPS, el lisado aumenta en opacidad así como en viscosidad y puede gelificar. Alrededor de 0.1 mililitros de la composición se añaden al lisado. Normalmente, el pH de la composición es entre 6 y 8, preferiblemente, entre 6.8 y 7.5. La mezcla de la composición y lisado es incubada durante cerca de 1 hora ininterrumpida a unos 37°C. Tras la incubación, la mezcla es observada para determinar si había gelación de la mezcla. La gelación indica la presencia de endotoxina. Para determinar la cantidad de endotoxina presente en la composición, se hacen y ensayan diluciones de una solución normalizada de endotoxina al mismo tiempo que la composición se ensaya. Las soluciones estandarizadas

- de endotoxina están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Sigma Chemical (Catalog No. 210-SE), U.S. Pharmacopeia (Rockville, MD, Catalog No. 235503), y Associates of Cape Cod, Inc., (Catalog No. E0005). En general, cuando una composición de la divulgación es preparada aislando polipéptidos de un microbio por un método como se describe aquí (por ejemplo, un método que incluye romper y solubilizar las células, y recoger los polipéptidos insolubles), la cantidad de LPS en una composición de la presente invención es menor que la cantidad de LPS presente en una mezcla de la misma cantidad del microbio que ha sido afectada bajo las mismas pero no solubilizada. Normalmente, el nivel de LPS en una composición de la divulgación se reduce en, en orden creciente de preferencia, al menos cerca de 50%, al menos cerca de 60%, al menos cerca de 70%, al menos cerca de 80%, o al menos cerca de 90% respecto al nivel de LPS en una composición preparada rompiendo, pero no solubilizando, el mismo microbio.
- 5
- 10 **[0033]** La divulgación también proporciona composiciones que incluyen una preparación de célula entera de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o 6 *Campylobacter* spp.
- [0034]** Las composiciones de la presente invención y divulgación opcionalmente incluyen además un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, portador, excipiente, sal, etc., que es compatible con los otros ingredientes de la composición, y no deletéreo para el recipiente del mismo. Normalmente, la composición incluye un portador farmacéuticamente aceptable cuando la composición es utilizada como aquí se describe. Las composiciones de la presente invención y divulgación pueden ser formuladas en preparaciones farmacéuticas en una variedad de formas adaptadas a la vía elegida de administración, incluyendo vías adecuadas para estimular una respuesta inmune a un antígeno. Así, una composición de la presente invención y divulgación puede ser administrada por medio de vías incluyendo, por ejemplo, oral; parental incluyendo intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc., y tópicamente, tal como, intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, y rectalmente etc. Se prevé que una composición puede ser administrada a una superficie mucosa, tal como por administración a la mucosa respiratoria o nasal (por ejemplo spray o aerosol), para estimular la inmunidad mucosa, tal como la producción de anticuerpos secretores de IgA, por todo el cuerpo del animal.
- 15
- 20
- 25 **[0035]** Una composición de la presente invención y divulgación puede ser también administrada por medio de un implante de liberación sostenida o retardada. Los implantes adecuados para usar de acuerdo a la invención son conocidos e incluyen, por ejemplo, los divulgados en Emery and Straub (WO 01/37810 (2001)), y Emery et al. (WO 96/01620 (1996)). Los implantes pueden ser producidos en tamaños suficientemente pequeños para ser administrados por aerosol o spray. Los implantes también incluyen nanoesferas y microesferas.
- 30
- 35 **[0036]** Una composición de la presente invención y divulgación es administrada en una cantidad suficiente para tratar ciertas enfermedades como aquí se describe. La cantidad de polipéptidos o células enteras presentes en una composición de la presente invención y divulgación puede variar. Por ejemplo, la dosis de polipéptidos puede estar entre 0.01 microgramos (μg) y 300 mg, normalmente entre 0.1 mg y 10 mg. Cuando la composición es una preparación de célula entera, las células pueden estar presentes en una concentración de, por ejemplo, 10^6 bacterias/ml, 10^7 bacterias/ml, 10^8 bacterias/ml, o 10^9 bacterias/ml. Para una composición inyectable (por ejemplo subcutánea, intramuscular, etc.) los polipéptidos pueden estar presentes en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición administrada sea 0.5 ml a 5.0 ml, normalmente 1.0-2.0 ml. Cuando la composición es una preparación de células enteras, las células están preferiblemente presentes en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición administrada es 0.5 ml a 5.0 ml, normalmente 1.0-2.0 ml. La cantidad administrada varían dependiendo de diversos factores incluyendo, pero no limitados a, los polipéptidos específicos elegidos, el peso, la condición física y edad del animal, y la vía de administración. Así, el peso absoluto del polipéptido incluido en forma de dosis unitaria dada puede variar ampliamente, y depende de factores tales como la especie, edad, peso y condición física del animal, así como el método de administración. Tales factores pueden determinarse por un experto en la técnica. Otros ejemplos de dosis adecuadas para la invención son divulgados en Emery et al. (Patente U.S. 6.027.736).
- 40
- 45 **[0037]** Las formulaciones pueden estar convenientemente presentadas en formas de dosis unitarias y pueden ser preparada por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos para preparar una composición incluyendo un portador farmacéuticamente aceptable incluyen el paso de asociar el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o célula entera de la presente invención) con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones son preparadas asociando uniformemente e íntimamente el compuesto activo con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto en las formulaciones deseadas.
- 50
- 55 **[0038]** Una composición que incluye un portador farmacéuticamente aceptable puede incluir también un adyuvante. Un "adyuvante" se refiere a un agente que puede actuar en un modo no específico para mejorar una respuesta inmune a un antígeno particular, reduciendo así potencialmente la cantidad de antígeno necesaria en una composición inmunizadora dada, y/o la frecuencia de inyección necesaria con el fin de generar una respuesta inmune adecuada al antígeno de interés. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, IL-1, IL-2, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, bromuro de dimetildiocradecilamonio (DDA), avridina, hidróxido de aluminio, aceites, saponinas, alfa-tocoferol, polisacáridos, parafinas emulsionadas (incluyendo por ejemplo, los disponibles bajo la marca EMULSIGEN de MVP Laboratories, Ralston, Nebraska), ISA-70, RIBI y otras sustancias conocidas en la técnica.

[0039] En otra realización, una composición de la invención o divulgación incluyendo un portador farmacéuticamente aceptable puede además incluir un modificador de respuesta biológica, tal como, por ejemplo, IL-2, IL-4 y/o IL-6, TNF, IFN-alfa, IFN-gama, y otras citoquinas que afectan células inmunes. Una composición inmunizadora puede también incluir otros componentes conocidos en la técnica tales como un antibiótico, un conservante, un antioxidante, o un agente quelante.

Métodos de Elaboración

[0040] Los polipéptidos y las preparaciones de células enteras de la divulgación pueden ser obtenidas incubando un miembro del género *Campylobacter* bajo condiciones que promuevan la expresión de uno o más de los polipéptidos aquí descritos. La divulgación también incluye composiciones preparadas por los procesos aquí divulgados. Normalmente, tales condiciones son condiciones metálicas bajas. Como aquí se usa, la frase "condiciones metálicas bajas" se refiere a un entorno, normalmente medios bacteriológicos, que contiene cantidades de un metal libre que causa que un microbio exprese polipéptidos regulados por metal. Como aquí se usa, la frase "condiciones metálicas altas" se refiere a un entorno que contiene cantidades de un metal libre que causa que un microbio o bien no exprese uno o más de los polipéptidos regulados por metales aquí descritos, o reducir la expresión de tal polipéptido. Las condiciones metálicas bajas son generalmente el resultado de la adición de un compuesto quelante de metal a un medio bacteriológico. Condiciones metálicas altas están generalmente presentes cuando un quelante no está presente en el medio, y/o un metal es añadido al medio. Los ejemplos de quelantes de metal incluyen compuestos sintéticos y naturales. Los ejemplos de compuestos naturales incluyen compuestos fenólicos de plantas, tales como flavonoides. Los ejemplos de flavonoides incluyen los quelantes de cobre catequina y naringenina, y los quelantes de hierro miricetina y quercetina. Los ejemplos de quelantes de cobre sintéticos incluyen, por ejemplo, tetratiomolibdato, y ejemplos de quelantes de cinc sintéticos incluyen, por ejemplo, N,N,N',N'- Tetrakis (2-piridilmetil)-etileno diamina. Los ejemplos de quelantes de hierro sintéticos incluyen 2,2'-dipiridil (también referido en la técnica como α,α' -bipiridil), 8-bidroxiquinolina, etilendiamina-di-O- ácido hidroxifenilacético (EDDHA), desferrioxamina metanosulfonato (desferol), transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, sideróforos biológicos, tal como, los catecolatos e hidroxamatos, y citrato. Preferiblemente, se usa 2,2'-dipiridil para la quelación de hierro. Normalmente, se añade 2,2'-dipiridil al medio en una concentración de al menos 0.0025 microgramos/mililitro ($\mu\text{g/ml}$), al menos 0.025 $\mu\text{g/ml}$, o al menos 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Niveles altos de 2,2'-dipiridil pueden ser 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, o 30 $\mu\text{g/ml}$.

[0041] Se espera que una *Campylobacter* spp. con una mutación en un gen fur resultará en la expresión constitutiva de muchos, si no todos, de los polipéptidos regulados por metal de la divulgación. Un gen fur ha sido identificado en un *C. jejuni* (van Vliet et al., J. Bacteriol., 180, 5291-5298, (1998)). La producción de una mutación fur en una *Campylobacter* spp. puede ser producida utilizando métodos rutinarios incluyendo, por ejemplo, electroporación y constructos genéticos útiles para el bloqueo de genes en bacterias gran negativas.

[0042] Muchas *Campylobacter* spp. son capaces de crecer en condiciones metálicas bajas in vitro en medios artificiales solamente tras adaptación. Por ejemplo, una *Campylobacter* spp. puede ser adaptada a condiciones bajas de hierro in vitro por crecimiento en presencia de bajas concentraciones de un quelante de hierro y, tras el crecimiento en un medio conteniendo el quelante, aumentando gradualmente la concentración del quelante. Por ejemplo, una *Campylobacter* spp. puede ser adaptada al crecimiento en condiciones de hierro bajas añadiendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de 2,2'-dipiridil a un medio, y gradualmente incrementando la concentración del quelante a una concentración mayor, por ejemplo, 20 $\mu\text{g/ml}$.

[0043] El medio utilizado para incubar el microbio y el volumen de los medios utilizados para incubar el microbio pueden variar. Cuando un microbio de *Campylobacter* spp. está siendo evaluado sobre la capacidad de producir los polipéptidos aquí descritos, el microbio puede ser cultivado en un volumen adecuado, por ejemplo, 10 mililitros a 1 litro del medio. Cuando un microbio está siendo cultivado para obtener polipéptidos para usar en, por ejemplo, administración a animales, el microbio puede ser cultivado en un medio de fermentación para permitir el aislamiento de cantidades mayores de polipéptidos. Los métodos para cultivar microbios en un medio de fermentación son rutinarios y conocidos en la técnica. Las condiciones usadas para cultivar un microbio preferiblemente incluyen un quelante de metal, más preferiblemente un quelante de hierro, por ejemplo 2,2'-dipiridil, un pH de entre unos 6.5 y casi 7.5, preferiblemente entre unos 6.9 y 7.1, y una temperatura de unos 37°C. Cuando un medio de fermentación es utilizado, el cultivo puede ser purgado con un gas apropiado, por ejemplo, dióxido de carbono, para mantener condiciones microaerofílicas. Los elementos del género *Campylobacter* son organismos microaerofílicos, por lo que las condiciones de crecimiento no incluyen niveles de oxígeno que impidan el crecimiento.

[0044] Una *Campylobacter* spp. puede ser recolectada tras el crecimiento. La recolección incluye concentrar el microbio a un volumen menor y suspender en un medio diferente de los medios de cultivo. Los métodos para concentrar un microbio son rutinarios y conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, filtración y/o centrifugación. Normalmente, el microbio concentrado es suspendido en cantidades decrecientes de buffer. Preferiblemente, el buffer final incluye un quelante de metal, preferiblemente, ácido etilendiamintetraacético (EDTA). Un ejemplo de un buffer que puede ser utilizado contiene Tris-base (7.3 gramos /litro) y EDTA (0.9 gramos/litro), a un pH de 8.5. Opcionalmente, el buffer final también minimiza la degradación proteolítica. Esta puede ser lograda con el buffer final a un pH mayor que 8.0, preferiblemente, 8.5, y/o incluyendo uno o más inhibidores de proteínasa (por ejemplo, fenilmetanosulfonil fluoruro). Opcionalmente y preferiblemente, el microbio concentrado es congelado a -20°C o por debajo hasta ser roto.

5 **[0045]** Cuando la *Campylobacter* spp. Debe usarse como una preparación de células enteras, las células recolectadas pueden ser procesadas utilizando métodos conocidos y rutinarios para desactivar las células. Alternativamente, cuando una *Campylobacter* spp. va ser usado para preparar polipéptidos de la divulgación, la *Campylobacter* spp. puede ser rota usando métodos mecánicos, físicos, o químicos rutinarios y conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, french press, sonicación, u homogeneización. Preferiblemente, se usa la homogeneización. Como aquí se usa, "rotura" se refiere a la rotura de la célula. La rotura de un microbio puede ser medida por métodos que son rutinarios y conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, un microbio es sometido a rotura hasta que el porcentaje de transmitancia se incrementa en 20% cuando se mide un 1:100 de dilución. La temperatura durante la rotura es normalmente mantenida baja, preferiblemente a 4°C, para minimizar más la degradación proteolítica.

10 **[0046]** El microbio roto es solubilizado en un detergente, por ejemplo, un detergente aniónico, zwitteriónico, no-iónico, o catiónico. Preferiblemente, el detergente es sarcosina, más preferiblemente, lauroil sarcosinato de sodio. Como aquí se usa, el término "solubilizar" se refiere a disolver materias celulares (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos) en la fase acuosa del buffer en la que el microbio se rompía, y la formación de agregados de materias celulares insolubles. Las condiciones para la solubilización preferiblemente resultan en la agregación de polipéptidos de la presente invención en agregados solubles que son lo suficiente grandes para permitir fácil aislamiento por, por ejemplo, centrifugación.

15 **[0047]** Preferiblemente, la sarcosina se añade de tal modo que la proporción final de sarcosina al peso en gramos del microbio roto está entre 1.0 gramos de sarcosina por 4.5 gramos de masa granulada y 6.0 gramos de sarcosina por 4.5 gramos de masa granulada, preferiblemente, 4.5 gramos de sarcosina por 4.5 gramos de masa granulada. La solubilización del microbio puede ser medida por métodos que son rutinarios y conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, se permite que la solubilización tenga lugar por al menos 24 horas, más preferiblemente, al menos 48 horas, todavía más preferiblemente, al menos 60 horas. La temperatura durante la rotura es normalmente mantenida baja, preferiblemente a 4°C.

20 **[0048]** Los agregados insolubles que incluyen los polipéptidos de la divulgación pueden ser aislados por métodos que son rutinarios y conocidos en la técnica. Preferiblemente, los agregados insolubles son aislados por centrifugación. Normalmente, la centrifugación de polipéptidos de la membrana externa que son insolubles en detergentes requieren fuerzas centrifugas de al menos 50,000 x g, normalmente 100,000 x g. El uso de tales fuerzas centrifugas requiere el uso de ultracentrifugas, y escalar para procesar volúmenes grandes de muestra es a menudo difícil y no económico con estos tipos de centrifugas. Los métodos aquí descritos proporcionan la producción de agregados insolubles suficientemente grandes para permitir el uso de fuerzas centrifugas significativamente menores (por ejemplo, 46,000 x g). Los métodos para procesar grandes volúmenes a estas fuerzas centrifugas menores están disponibles y son conocidos en la técnica. Así, los agregados insolubles pueden ser aislados a un coste significativamente inferior.

25 **[0049]** Opcionalmente y preferiblemente, la sarcosina es extraída de los polipéptidos aislados. Los métodos para extraer sarcosina de los polipéptidos aislados son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, diafiltración, precipitación, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio de iones, y/o cromatografía de afinidad, y ultra filtración y lavar los polipéptidos en alcohol por diafiltración. Tras el aislamiento, los polipéptidos son suspendidos en buffer y almacenados a baja temperatura, -20°C o menor.

30 **[0050]** Los polipéptidos de la divulgación pueden ser también aislados de la *Campylobacter* spp. utilizando métodos que son conocidos en la técnica. El aislamiento de los polipéptidos puede ser logrado como se describe en, por ejemplo, Emery et al., (Patente U.S. 5.830.479) y Emery et al., (Solicitud de Patente U.S. 20030036639 A1).

35 **[0051]** En aquellos aspectos de la presente invención donde debe hacerse una preparación de células enteras, tras el cultivo de una *Campylobacter jejuni* el microbio puede ser matado con la adición de un agente tal como glutaraldehído, formalina, o formaldehído, en una concentración suficiente para desactivar las células en el cultivo. Por ejemplo, la formalina puede ser añadida en una concentración de casi el 3% (vol:vol). Tras un período de tiempo suficiente para desactivar las células, las células pueden ser recolectadas por, por ejemplo, diafiltración y/o centrifugación, y lavadas.

Métodos de Uso

40 **[0052]** La divulgación se dirige además a métodos para utilizar las composiciones de la presente invención y divulgación. Los métodos incluyen administrar a un animal una cantidad eficaz de una composición de la presente invención y divulgación. Preferiblemente, la composición además incluye un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede ser administrada en un momento en que el anticuerpo materno pueda estar presente, por ejemplo, tan pronto como un día de edad, o en un momento posterior durante la vida del animal. El animal puede ser por ejemplo, un ungulado, un pájaro, un humano, o un animal de compañía. Ejemplos de pájaros incluyen aves de corral tales como pavos, pollos, patos, faisanes, y avestruces. Ejemplos de ungulados incluyen animales que son bovinos (incluyendo, por ejemplo, ganado bovino), caprino (incluyendo, por ejemplo, cabras), ovino (incluyendo, por ejemplo, ovejas), porcino (incluyendo, por ejemplo, aviar cerdos), equino (incluyendo, por ejemplo, caballos), miembros de la familia Cervidae (incluyendo, por ejemplo, corzo, alce, ciervo, caribú y reno), y Bison (incluyendo, por ejemplo, búfalo). Ejemplos de animales de compañía incluyen perros y gatos.

- 5 **[0053]** Los métodos pueden además incluir administraciones adicionales (por ejemplo, una o más administraciones reforzadoras) de la composición al animal para aumentar o estimular una respuesta inmune secundaria. Un refuerzo puede ser administrado en un momento después de la primera administración, por ejemplo, 1 a 8 semanas, preferiblemente 2 a 4 semanas, tras la primera administración de la composición. Los refuerzos posteriores pueden ser administrados una, dos, tres, cuatro, o más veces anualmente. Sin intentar limitarse por la teoría, se espera que los refuerzos anuales no serán necesarios, ya que un animal será afectado en el campo por exposición a miembros del género *Campylobacter* que expresan polipéptidos con epítomos que son idénticos o estructuralmente relacionados a epítomos presentes en los polipéptidos presentes en la composición administrada al animal.
- 10 **[0054]** La divulgación está dirigida a métodos para inducir la producción de anticuerpos en un animal o por técnicas recombinantes. El anticuerpo producido incluye anticuerpos que específicamente ligan al menos un polipéptido presente en la composición. En esta parte de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para dar como resultado la producción de anticuerpos en el animal. Los métodos para determinar si un animal ha producido anticuerpos o no que específicamente ligan polipéptidos presentes en una composición de la divulgación pueden ser determinados como aquí se describe.
- 15 **[0055]** El método puede ser usado para producir anticuerpos que específicamente ligan polipéptidos expresados por un microbio distinto al microbio del cual los polipéptidos de la composición fueron aislados. Como aquí se usa, un anticuerpo que puede "específicamente ligar" un polipéptido es un anticuerpo que interactúa con el epítomo del antígeno que indujo la síntesis del anticuerpo, o interactúa con un epítomo relacionado estructuralmente. Al menos algunos de los polipéptidos presentes en las composiciones de la presente invención normalmente incluyen epítomos que son conservados en los polipéptidos de diferentes especies y diferentes géneros de microbios. Por lo tanto, se espera que los anticuerpos producidos utilizando una composición derivada de un microbio ligan a los polipéptidos expresados por otros microbios y proporcionen protección de amplio espectro contra organismos gram negativos. Ejemplos de microbios gram negativos a los que los anticuerpos específicamente se unen son enteropatógenos, por ejemplo, los miembros de la familia Enterobacteriaceae.
- 20 **[0056]** La divulgación también se dirige a tratar una infección en un animal causada por un miembro del género *Campylobacter*. El método incluye administrar una cantidad eficaz de la composición de la presente invención o divulgación a un animal con una infección causada por un miembro del género *Campylobacter*, y determinar si la *Campylobacter* spp. que causa la infección ha decrecido o no. Los métodos para determinar si una infección es causada o no por un miembro del género *Campylobacter* son rutinarios y conocidos en la técnica.
- 25 **[0057]** La divulgación se dirige también a métodos para tratar uno o más síntomas de ciertas enfermedades en animales, preferiblemente humanos, que pueden ser causados por, o asociados con, infección por un miembro del género *Campylobacter*. Ejemplos de enfermedades causadas por infecciones por *Campylobacter* spp. incluyen diarrea, fiebre, y calambres abdominales, así como síntomas tales como bacteremia, artritis séptica, síndrome de Guillain-Barre síndrome Reiter (Peterson et al. *Wes. J. Med.* 161:148-152 (1994) y Allos et al. *J. Infect Dis.* 176: S125-128 (1997)). El tratamiento de estas enfermedades puede ser profiláctico o, alternativamente, puede iniciarse tras el desarrollo de una enfermedad aquí descrita. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, iniciado antes que un sujeto manifieste síntomas de una enfermedad causada por *Campylobacter* spp., es referido aquí como el tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la enfermedad. Normalmente, un animal "en riesgo" de desarrollar una enfermedad es un animal con exposición probable a una *Campylobacter* spp. que causa la enfermedad. Por ejemplo, el animal está presente en una zona donde la enfermedad ha sido diagnosticada en al menos algún otro animal, o está siendo transportado a una zona donde una *Campylobacter* spp. es endémica, y/o donde las enfermedades causadas por *Campylobacter* spp. son prevalentes. Por lo tanto, la administración de una composición puede ser realizada antes, durante o después de la aparición de las enfermedades aquí descritas. El tratamiento iniciado tras el desarrollo de una enfermedad puede hacer disminuir la gravedad de los síntomas de una de las enfermedades, o eliminar completamente los síntomas. En esta parte de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para evitar la manifestación de los síntomas de una enfermedad, decrecer la gravedad de los síntomas de una enfermedad, y/o eliminar completamente los síntomas. La potencia de una composición de la presente invención o divulgación puede ser ensayada conforme a métodos rutinarios (ver, por ejemplo, Stanfield et al., *Microb Pathog.*, 3:155-165 (1987), Fox et al., *Am. J. Vet. Res.*, 48:85-90 (1987), Ruiz-Palacios, *Infect. Immun.*, 34:250-255 (1981), y Humphrey et al., *J. Infect. Dis.*, 151:485-493 (1985)). Los métodos para determinar si un animal tiene las enfermedades aquí divulgadas y los síntomas asociados con las enfermedades son rutinarios y conocidos en la técnica.
- 30 **[0058]** La divulgación se dirige también para reducir la colonización del tracto intestinal o tracto reproductor de un animal por una *Campylobacter* spp. El método incluye administrar una cantidad eficaz de una composición de la presente invención o divulgación a un animal colonizado por, o en riesgo de ser colonizado por un microbio gram-negativo, preferiblemente, una *Campylobacter* spp. En esta parte de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para disminuir la colonización del animal por el microbio. La colonización del tracto intestinal de un animal por un microbio puede ser determinada midiendo la presencia del microbio en las heces del animal. Los métodos para evaluar la colonización de un tracto reproductor del animal por un microbio son rutinarios y conocidos en la técnica. Se espera que reducir la colonización de un animal por una *Campylobacter* spp. reducirá la transmisión de la *Campylobacter* spp. a los humanos.
- 35
40
45
50
55
60

5 [0059] Una composición de la invención y la divulgación puede ser usada para proporcionar inmunización pasiva contra infección por *Campylobacter* spp. Por ejemplo, la composición puede ser administrada a un animal para inducir la producción de productos inmunes, tales como anticuerpos, que pueden ser recogidos del animal productor y ser administrados a otro animal para proporcionar inmunidad pasiva. Los componentes inmunes, tal como anticuerpos, pueden ser recogidos para preparar composiciones de anticuerpos de serum, plasma, sangre, calostro, etc. para terapias pasivas de inmunización. Las composiciones de anticuerpos incluyendo anticuerpos monoclonales, anti-idiotipos, y/o anticuerpos recombinantes pueden también ser preparadas utilizando métodos conocidos. Las composiciones pasivas de anticuerpos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, scfv, Fab, F(ab')₂ o Fv o otras formas modificadas de los mismos, pueden ser administradas a un receptor en forma de serum, plasma, sangre, calostro, y similares. Sin embargo, los anticuerpos pueden ser aislados del serum, plasma, sangre, calostro y similares, utilizando métodos conocidos y secados por pulverización o liofilizados para uso posterior en forma reconstituida o concentrada. Las preparaciones inmunizadoras pasivas pueden ser particularmente ventajosas para el tratamiento de enfermedad sistémica aguda, o inmunización pasiva de animales jóvenes que no consiguieron recibir niveles adecuados de inmunidad pasiva por medio del calostro materno.

15 [0060] La divulgación también proporciona métodos para detectar anticuerpos que específicamente ligan polipéptidos de la divulgación. Estos métodos son útiles en, por ejemplo, detectar si un animal tiene anticuerpos que específicamente ligan polipéptidos de la divulgación, y diagnosticar si un animal puede tener una infección causada por *Campylobacter* spp. Preferiblemente, tales sistemas diagnósticos están en forma de kit. Los métodos incluyen poner en contacto un anticuerpo con una preparación que incluye al menos un polipéptido del resultado de la divulgación en una mezcla. Preferiblemente, el anticuerpo está presente en una muestra biológica, más preferiblemente sangre, serum, leche, secreciones mucosas, o calostro. El método además incluye incubar la mezcla bajo condiciones que permitan al anticuerpo ligar específicamente un polipéptido para formar un complejo polipéptido:anticuerpo. Como aquí se usa, el termino " complejo polipéptido: anticuerpo" se refiere al complejo que resulta cuando un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido. La preparación que incluye los polipéptidos presentes en una composición de la presente invención o divulgación puede también incluir reactivos, por ejemplo un buffer, que proporcionan condiciones apropiadas para la formación del complejo polipéptido:anticuerpo. El complejo polipéptido:anticuerpo es entonces detectado. La detección de anticuerpos se conoce en la técnica y puede incluir, por ejemplo, inmunofluorescencia y peroxidasa. Los métodos para detectar la presencia de anticuerpos que específicamente ligan polipéptidos de la divulgación pueden ser usados en diversos formatos que se han usado para detectar anticuerpos, incluyendo radioinmuneensayo y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.

25 [0061] La divulgación también proporciona un kit para detectar anticuerpos que específicamente ligan polipéptidos de la divulgación. El kit incluye al menos un polipéptido de la divulgación en un material de envase adecuado en una cantidad suficiente para al menos un ensayo. Opcionalmente, también se incluyen otros reactivos tal como buffers y soluciones necesitados para practicar la invención. Normalmente también se incluyen instrucciones para el uso de los polipéptidos envasados.

35 [0062] Como aquí se usa, la frase "material de envase" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para albergar el contenido del kit. El material de envase esta construido por métodos conocidos, preferiblemente para proporcionar un entorno estéril libre de contaminantes. El material de envase tiene una etiqueta que indica que los polipéptidos pueden ser usados para detectar los anticuerpos inducidos por infección con *Campylobacter* spp. Además, el material de envase contiene instrucciones indicando cómo se emplean los materiales dentro del kit para detectar tales anticuerpos. Como aquí se usa, el término "envasar" se refiere a una matriz o materia sólida tal como vidrio, plástico, papel, aluminio, y similares, capaz de mantener los polipéptidos dentro de límites fijos. Así, for ejemplo, un envase puede ser un pocillo de placas de microtitulación a las que se han pegado cantidades de microgramos de polipéptidos. "Instrucciones de uso" normalmente incluyen una expresión tangible que describe la concentración del reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra a mezclar, períodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas de reactivo/muestra, temperatura, condiciones de buffer, y similares.

EJEMPLO

Ejemplo 1

Producción y Aislamiento de Proteínas Reguladas por Metal

40 [0063] *Campylobacter* spp. *jejuni* puede ser cultivada bajo condiciones controladas de fermentación de modo que exprese proteínas, incluyendo proteínas asociadas con la membrana exterior. Las bacterias pueden ser recolectadas y las proteínas pueden luego ser aisladas y utilizadas como inmunogenes en una composición descrita en detalle en el siguiente ejemplo. Las condiciones microaerofílicas para el cultivo de *C. jejuni* sobre placas y en pequeños cultivos líquidos fueron establecidas por incubación en un frasco anaeróbico conteniendo un sistema generador de gas Campy-Pak (BBL, Sparks, MD). Una reserva de semillas maestra de *Campylobacter jejuni* originada de un pavo fue preparada inoculando el aislado en 200 ml de Caldo de Infusión de Corazón Cerebro de Porcino (P-BHI, Difco) conteniendo metabisulfito 0.025 % (Sigma) y conteniendo 10 a 20 microgramos por mililitro (µg/ml) de 2,2-dipiridilo (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). El cultivo se prosiguió sin agitar en 16 horas a 37°C bajo condiciones microaerofílicas. Antes del desarrollo en un cultivo iniciador, el *C. jejuni* fue adaptado para crecer en el quelante de hierro 2,2-dipiridilo

subcultivando repetidamente el aislado en concentraciones crecientes del quelante de hierro, comenzando en 10 µg/ml, y aumentando a 20 µg/ml. La bacteria fue recogida por centrifugación a 10,000 x g. El gránulo bacteriano fue resuspendido en 20 ml P-BHI conteniendo glicerol 20%, y dispensado de forma estéril en viales criogénicas de 2 ml (1 ml por vial) y almacenado a -90°C. Al aislado se dió la identificación Campy-1, y se estableció como una semilla maestra. La semilla maestra fue expandida en una semilla activa que fue entonces utilizada para la producción de proteínas reguladas por metal. Esta cepa fue depositada con la American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, Va., 20108, USA, en Septiembre 20, 2004. El depósito fue hecho bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento de Patentes.

Ejemplo 2

10 Producción de proteínas reguladas por metal

[0064] Fermentación: Un vial criogénico de la semilla activa (1 ml a 10⁹ CFU/ml) se usó para inocular 130 ml de P-BHI o Soja T a 37°C conteniendo 15-20 microgramos (µg) de 2,2-dipiridilo y metabisulfito 0.025% (Sigma) y se incubó en un frasco anaeróbico conteniendo un sistema generador de gas Campy-Pak (BBL, Sparks, MD). El cultivo fue incubado a 37°C durante 12-24 horas en cuyo punto fue estérilmente trasferido a 1.3 litros del medio anterior. Se permitió crecer este segundo cultivo durante unas 10 horas adicionales a 37°C. Este cultivo fue usado para inocular un fermentador de 20-litro Bioflo IV benchtop, (New Brunswick Scientific Co, Edison NJ) cargado con 13 litros del medio antes descrito. El pH fue mantenido constante entre 6.9 and 7.1 por titulación automática con NaOH 30% y HCL 10%. La velocidad de agitación fue ajustada a 100 revoluciones por minuto (rev/minuto), y el cultivo fue mantenido bajo condiciones microaerofílicas. Se permitió al cultivo desarrollarse continuamente en estas condiciones durante 24 horas en cuyo punto la fermentación fue finalizada reduciendo la temperatura de la fermentación a 10°C.

[0065] Cosecha: La fermentación bacteriana fue concentrada y lavada usando un conjunto de Millipore Pellicon Tangential Flow Filter (Millipore Corporation, Bedford, MA), equipado con un filtro Centrasette serie Alpha 300K de canal pantalla de 25 ft² (Pall Filtron). El volumen original del cultivo de 13 litros fue reducido a 2.5 litros. El concentrado bacteriano fue entonces ajustado a 25 litros utilizando solución salina fisiológica (0.85%) y luego concentrado de nuevo a 2.5 litros para ayudar a eliminar cualquier contaminado no asociado con las células, por ejemplo, proteínas secretadas. El concentrado (2.5 litros) fue ajustado a 15 litros utilizando Osmotic Shock Buffer (OMS) conteniendo 7.26 gramos/litro Tris-base y 0.93 gramos/litro EDTA ajustado a un pH de 8.5. El concentrado se mezcló minuciosamente y dispensó equitativamente (3.0 litros cada uno) en 5 recipientes estériles Nalgene de cuatro litros y se colocó en un congelador a -20°C para almacenaje. La masa granulada fue calculada por centrifugación de muestras de 30 ml del cultivo fermentado y recolección final. En resumen, tubos cónicos Nalgene de 50 ml pesados previamente fueron centrifugados a 39,000 x g durante 90 minutos en una centrifuga Beckman J2-21 utilizando un rotor 21-JA (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Al final del funcionamiento, el supernatante fue vertido fuera y los tubos fueron pesados de nuevo. La masa granulada fue calculada para cada etapa.

[0066] Rotura (Homogenización): Tres litros de suspensión celular bacteriana congelada en OMS se descongelaron a 4°C (180g de masa granulada) La suspensión de cultivo líquido fue asépticamente transferida a un tanque de proceso encamisado de 50 litros conteniendo 44 litros de OMS pH 8.5 conteniendo 0.1 gramos timerosal/litro como conservante. La suspensión bacteriana a granel fue enfriada a 4°C con mezclado continuo durante 18 horas a 200 rpm en cuyo momento fue rota por homogeneización. Brevemente, el tanque de 50 litros que contiene la suspensión bacteriana fue conectado a un Rannie Homogenizer modelo 12.51 H, (APV Systems, Rosemont, IL). Un segundo tanque de proceso encamisado de 50 litros (vacío) fue conectado al hogeneizador de tal modo que el fluido en el tanque de proceso podía ser pasado a través del homogeneizador, dentro del tanque vacío y de vuelta otra vez, permitiendo multiples pases homogeneizadores mientras manteniendo aún un sistema cerrado. La temperatura durante la homogeneización fue mantenida a 4°C. Al comienzo de cada pasada, se circuló fluido a 70 psi a través del homogeneizador y de vuelta al tanque de origen, mientras que la presión del homogeneizador fue ajustada a 13,500 psi. Antes de la primera pasada, dos muestras pre-homogeneización fueron retiradas del homogeneizador para establecer una línea base para determinar el grado de rotura y vigilancia de pH. El grado de rotura fue vigilado por transmitancia (%T a 540nm en 1:100 de dilución) comparado con la muestra no homogeneizada. La suspensión bacteriana fue pasada 3 veces por el homogeneizador para dar un porcentaje final de transmitancia entre 78-83%T a una dilución de 1:100.

[0067] Después de la homogeneización, fue añadido asépticamente sarcosinato lauroil sódico (Hamptosyl L-30, Chem/Serv, Minneapolis, MN) a la suspensión bacteriana homogeneizada para solubilización. La cantidad de Sarcosina (30%) añadida fue de 0.0664 veces el volumen de solubilización, en litros, (1.0 gramo de sarcosina/4.5 gramos de masa granulada). El tanque de proceso fue eliminado del homogeneizador y conservado a 4°C mientras se agitaba a 240 rpm durante 60-70 horas.

[0068] Recolección de proteínas: Las proteínas dentro del fluido de proceso solubilizado fueron recogidas por centrifugación utilizando T-1 Sharples, (Alfa Laval Separations, Warminster, PA). Brevemente, el homogeneizado fue alimentado a 6 Sharples con una velocidad de alimentación de 250 ml/minuto a 17 psi a una fuerza centrifuga de 60,000 x g. La temperatura durante la centrifugación fue mantenida a 4°C. el homogeneizado solubilizado fue pasado 2 veces por las centrifugas. La proteína fue recogida, resuspendida y dispensada en 10 litros de Tris-buffer pH 8.5 conteniendo formalina 0.3% (Sigma) como conservante.

5 [0069] Diafiltración: La suspensión de proteína (10 litros) fue ajustada a 60 litros utilizando Tris-buffer estéril, pH 8.5. La suspensión fue lavada y dializada utilizando un conjunto Millipore Pellicon Tangential Flow Filter (Millipore Corporation), equipado con un filtro Centrasette serie Alpha 300K de canal pantalla de 25 ft² (Pall Filtron) para extraer la sarcosina residual. La solución de proteína fue concentrada por filtración a un volumen objetivo de 10 litros en cuyo punto se añadieron lentamente 50 litros de Tris-litro pH 7.4 conteniendo alcohol isopropílico 5% al concentrado desde un segundo tanque del proceso. Se piensa que el alcohol isopropílico causa un ligero desdoble de la estructura proteínica permitiendo la eliminación de la sarcosina unida sin comprometer la inmunogenicidad de las proteínas. La diafiltración continuó hasta que el pH se estabilizó a 7.4 en cuyo punto 50 litros de Tris-litro pH 7.4 fueron lentamente añadidos por diafiltración para eliminar el alcohol residual. La suspensión de proteína fue entonces concentrado igualmente a aproximadamente 5 litros. El concentrado de proteína fue dispensado por igual (500 ml) dentro de diez contenedores estériles Nalgene de 1 litro y almacenado a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 3

Análisis de Proteínas.

15 [0070] El perfil proteínico del *C. jejuni* aislado desarrollado en medios de saturación de hierro y/o déficit de hierro fue examinado por SDS-PAGE. Brevemente, el organismo fue desarrollado a partir de una reserva de semillas maestras congeladas subcultivándose en 25 ml de P-BHI conteniendo metabisulfito 0.025% y 15 a 20 microgramos por mililitro (µg/ml) de 2,2-dipiridilo (Sigma-Aldrich St Louis, MO) y/o P-BHI con metabisulfito conteniendo 200 µM de cloruro férrico incubado durante 18 horas a 37°C mientras se agitaba a 100 rpm. A las 18 horas de incubación, 5 ml de cada cultivo fueron transferidos a 500 ml de medios preincubados (37°C) con saturación de hierro y/o déficit de hierro. Se dejó a los cultivos desarrollarse durante 18 horas a 37°C mientras se agitaban a 100 rpm. A las 18 horas tras la incubación cada cultivo fue centrifugado a 10.000 x g durante 20 minutos. El gránulo bacteriano fue resuspendido en unos 100 ml de solución salina tris-tamponada y centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos para eliminar cualquier proteína contaminante del medio. El gránulo bacteriano de los medios con saturación de hierro y/o déficit de hierro fue resuspendido en 40 ml solución salina tris-tamponada de pH 7.2 y rota por sonicación. La suspensión bacteriana rota fue aclarada por centrifugación a 32.000 x g durante 12 minutos. El supernatante fue recogido y solubilizado por la adición de sarcosinato lauroil sódico 4% vol/vol a 4°C durante 24 horas. La fracción enriquecida en OMP insoluble en detergente fue recogida por centrifugación a 32.000 x g durante 2.5 horas a 4°C. El gránulo de OMP fue resuspendido en 200 µl tris-tampón a pH 7.2 y almacenado a -90°C. Una muestra de cada extracto fue redisuelta en un gel SDS-PAGE 10% para comparar el perfil proteínico obtenido de las células desarrolladas en medios con saturación de hierro y/o déficit de hierro. El gel fue escaneado utilizando un densitómetro BioRad GS-800 para comparar la diferencia en el perfil proteínico de *C. jejuni* desarrollada bajo condiciones de saturación de hierro y/o déficit de hierro.

Ejemplo 4

Preparación de las composiciones inmunizadoras derivadas de *C. jejuni*

35 [0071] La composición hecha de *C. jejuni* como se describe en el ejemplo 2 fue utilizada para preparar una vacuna. Una vacuna de reserva fue preparada a partir de la composición diluyendo el antígeno en solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo 8.0 g/l de NaCl, 0.2 g/l de KCl, 1.44g/l de Na₂HPO₄ y 0.24g/l de KH₂HPO₄ pH 7.4 conteniendo hidroxido de aluminio 10% (Rehydrogel, Reheis Chemical Company Berkeley Heights, NJ). La suspensión de hidróxido de aluminio (500 µg proteína total/ml) fue entonces emulsionada en el adyuvante comercial, EMULSIGEN, (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) utilizando un recipiente homogenizante IKA Ultra Turrax T-50 (IKA, Cincinnati, OH). Una dosis de ratón fue administrada para dar una dosis final de 50 µg de proteína total en un volumen inyectable de 0.1 ml con una concentración de adyuvante de 22.5% vol/vol. Un placebo fue preparado sustituyendo el antígeno con solución salina fisiológica en la formulación anterior y emulsionando la suspensión en EMULSIGEN para dar una concentración de adyuvante de 22.5%.

Ejemplo 5

45 Preparation del organismo de afectación

50 [0072] El aislado de *C. jejuni* como antes se describe fue usado para la afectación. Brevemente, el aislado de una reserva congelada (ejemplo 1) fue pasado rápidamente sobre una placa de agar sangre e incubado a 37°C durante 18 horas. Diversas colonias fueron sucultivadas en 50 ml P-BHI conteniendo 15 µg/ml de 2,2' dipiridill y metabisulfito 0.025%. El cultivo fue incubado a 37°C durante 16 horas, y entonces centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C para granular la bacteria. El gránulo bacteriano fue lavado una vez por centrifugación (10.000 x g durante 15 minutos) a 4°C. El gránulo final fue resuspendido en 25 ml de P-BHI sin dipiridilo. Justo antes de la afectación, 1 ml de la anterior suspensión bacteriana fue diluída en serie diez veces para enumerar el número de CFU/dosis.

Ejemplo 6

Vacunación de ratones y estudio de desafío oral con *Campylobacter jejuni*. (Evaluación de Deposition Fecal)

5 **[0073]** En este experimento la eficacia de la vacuna de *C. jejuni* fue llevada a cabo contra una afectación oral viva en ratones. Los parámetros de resultado utilizados para evaluar la eficacia de la vacuna en este experimento fueron 1) mortalidad individual de los ratones, y 2) diferencias en la concentración de *Campylobacter* depositada entre grupos de tratamiento tras la afectación. Veinte (N=20) ratones CF-1 hembra obtenidos de Harlan Breeding Laboratories (Indianapolis, IN) pesando 16-22 gramos fueron distribuidos por igual en dos grupos (10 ratones/grupo). Los ratones fueron alojados en jaulas de policarbonato para ratones (Ancore Corporation, Bellmore, NY). Fueron usadas dos jaulas, una para cada crupo de tratamiento. Los grupos fueron designados como placebo, sin vacunar (Grupo 1) y vacunados (Grupo 2). La comida y el agua fueron suministrados a discreción a todos los ratones.

10 **[0074]** Los ratones fueron vacunados tres veces en intervalos de 14 días subcutáneamente con el placebo y/o las vacunas de *C. jejuni* descritas en el Ejemplo 4. El volumen de vacuna administrado fue 0.1 ml/ratón. Catorce días tras la tercera vacunación, los ratones de los grupos 1 y 2 fueron afectados oralmente con *C. jejuni* con $4,05 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia (CFU) en un volumen de 0.2 cc. El organismo de afectación fue preparado como se describe en el ejemplo 5.

15 **[0075]** Para enumerar la diferencia en deposición fecal entre los grupos de control y vacunados, los droppings de ratón fueron recogidas en 12 horas tras el desafío. Los excrementos fueron recogidos colocando una almohadilla estéril sobre el suelo de cada jaula 1 hora antes de la recogida. En cada período de tiempo la almohadilla fue retirada y colocada en un cubierta laminar de flujo. Utilizando unos fórceps esterilizados con fuego, veinte excrementos individuales fueron recogidos al azar. Los forceps fueron flameados entre cada recogida para no contaminar cruzadamente las muestras. Excrementos individuales fueron colocados en mantas estériles de dilución de solución salina (0.9 ml), dos excrementos por tubo, para dar diez tubos. Cada muestra fue macerada utilizando una pipeta estéril de 1 ml y diluida en serie 10 veces. Las diluciones fueron puestas en placas sobre *Campylobacter* Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) incubadas a 37 C CO2 5% durante 72 horas. El número de bacterias fue enumerado para cada muestra y el log10 de las unidades formadoras de colonia se promedió para cada grupo de tratamiento en cada período de tiempo.

20 **[0076]** La Tabla 1 muestra la diferencia en la deposición fecal entre ratones vacunados y sin vacunar después de la afectación oral con *C. jejuni* en cada período de tiempo. Había una gran diferencia entre grupos de tratamiento en la cantidad de deposición de *Campylobacter* en heces tras la afectación. La dosis de afectación representada como momento 0 en la Tabla 1 muestra el inóculo inicial dado a cada ratón. En doce horas tras la afectación había una disminución drástica en la cantidad de *Campylobacter* depositada del grupo de vacunados comparado con el grupo de Placebo. Hecho el promedio a lo largo del período de estudio y contando con estimaciones repetidas, los vacunados depositaron menos *Campylobacter* en cada período de muestreo cuando en comparación con los no vacunados, con un grado de importancia de $P=0,005$. La cantidad de *Campylobacter* depositada en el grupo de los vacunados disminuyó drásticamente con cada período de muestreo en comparación con el grupo de Placebo no-vacunado (Figura 2). En 12 horas posteriores a la afectación la diferencia en la cantidad de *Campylobacter* depositada entre el grupo de vacunados y no vacunados fue mayor que 3 logs (Tabla 1, Figura 2).

35 TABLA 1

Tabla 1. La Diferencia en Deposición de <i>Campylobacter jejuni</i> Entre los Grupos de Tratamiento de No vacunados y Vacunados tras la Afectación Oral.		
Tiempos de Muestreo	Media log10 Unidades Formadoras de Colonias	
	Grupo 1 (no vacunados)	Grupo 2 (vacunados)
Dosis de afectación (momento 0)	9.607	9.607
12 horas	3.6	0(a)
(a) El límite de detección del ensayo fue 10^{-1}		

40 **[0077]** El experimento fue finalizado a las 12 horas debido a una contaminación con una *Pseudomonas aeruginosa* que se desarrolló por los antibióticos selectivos en la *Campylobacter* agar en todos los muestreos posteriores. No se observó mortalidad en ningún ratón tras la afectación. Los resultados claramente demuestran que la vacunación subcutánea con la composición resultan en una diferencia significativa ($P=0.005$) en la colonización de *Campylobacter* comparada con un grupo Placebo no vacunado.

45 **[0078]** La anterior descripción detallada y los ejemplos han sido proporcionados para claridad de comprensión únicamente. No deben entenderse de ello limitaciones innecesarias. La invención no está limitada a los detalles exactos mostrados y descritos, ya que variaciones obvias para un experto en la técnica estarán incluidas dentro de la invención definida por las reivindicaciones.

[0079] Todos los títulos son para la conveniencia del lector y no deberían ser utilizados para limitar el significado del texto que sigue al titular, a menos que así se especifique.

REIVINDICACIONES

1. Una composición obtenible por un proceso que comprende:

5 proporcionar un cultivo comprendiendo un *Campylobacter jejuni*, en donde la *Campylobacter jejuni* ha sido adaptada para desarrollo en condiciones bajas de hierro añadiendo 10 µg/ml de 2,2'-dipiridilo al medio, y aumentando gradualmente la concentración a 20 µg/ml e incubada en condiciones bajas de hierro;

romper la *Campylobacter* spp. para dar como resultado una mezcla comprendiendo membranas celulares rotas;

10 solubilizar la mezcla añadiendo a la mezcla un detergente biológico para dar como resultado una preparación comprendiendo proteínas solubilizadas y no solubilizadas; y

aislar los polipéptidos insolubilizados regulados por hierro.

2. La composición de la reivindicación 1 para uso en medicina.

15 3. Una composición comprendiendo una preparación aislada de células enteras de una *Campylobacter jejuni*, en donde las células comprenden polipéptidos expresables por la *Campylobacter jejuni* durante el desarrollo en condiciones bajas de hierro y no expresados durante el desarrollo en condiciones altas de hierro, en donde la *Campylobacter jejuni* ha sido adaptado para desarrollo en condiciones bajas de hierro añadiendo 10 µg/ml de 2,2'-dipiridilo al medio, e incrementando gradualmente la concentración a 20 µg/ml.

4. Una composición obtenible por un proceso que comprende:

20 proporcionar un cultivo comprendiendo una *Campylobacter jejuni*, en donde la *Campylobacter jejuni* ha sido adaptada para desarrollo en condiciones bajas de hierro añadiendo 10 µg/ml de 2,2'-de dipiridilo al medio, e incrementando gradualmente la concentración a 20 µg/ml e incubada en condiciones bajas de hierro;

inactivar la *Campylobacter* spp. para dar como resultado una composición que comprende células de *Campylobacter* spp. desactivadas, en donde la desactivación sucede bajo condiciones que no rompen las células; y

recolectar las células desactivadas.

25

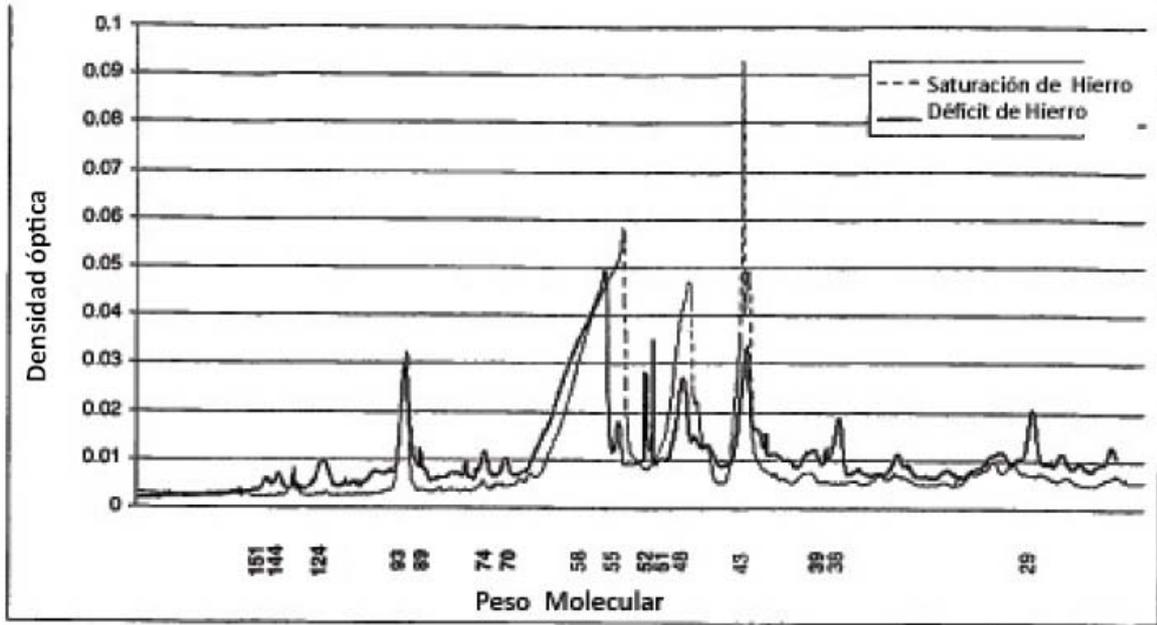


FIGURA 1

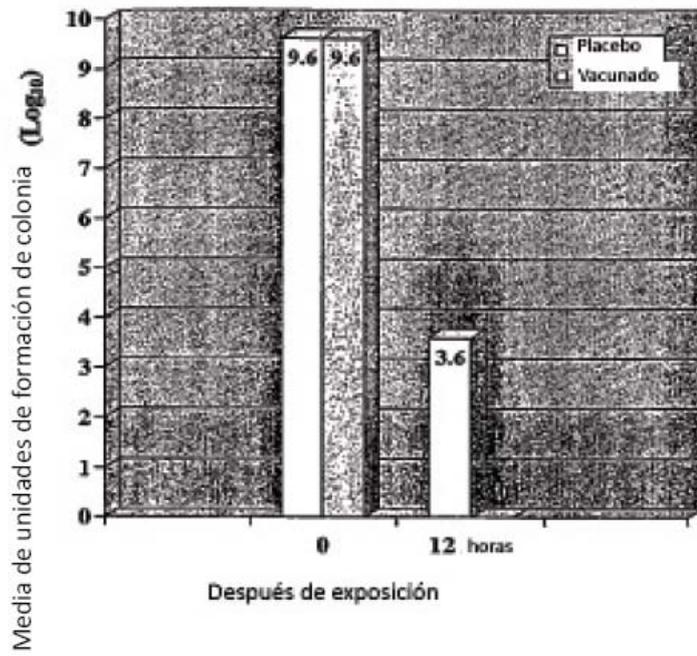


Figura 2