

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 467**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/085** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2006 E 06701328 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1838341**

54 Título: **Composición de vacuna que comprende una proteína de unión a fibronectina o un péptido de unión a fibronectina**

30 Prioridad:

**20.01.2005 US 593504 P**

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

**11.12.2013**

73 Titular/es:

**ISCONOVA AB (100.0%)  
UPPSALA SCIENCE PARK, DAG  
HAMMARSKJÖLDS VAG 54 A  
751 83 UPPSALA, SE**

72 Inventor/es:

**MOREIN, BROR;  
LÖVGREN-BENGTSSON, KARIN;  
RANLUND, KATARINA;  
FROMGREN, BIRGITTA;  
EKSTRÖM, JILL y  
BASCHUNAN, CARLOS**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 433 467 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

Composición de vacuna que comprende una proteína de unión a fibronectina o un péptido de unión a fibronectina.

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos una proteína de unión a fibronectina, y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina, que comprenden todos al menos un dominio de unión a fibronectina; y al menos un complejo de matriz iscom para su uso como vacuna contra mastitis en seres humanos, ganado, oveja o cabra, en donde dicha vacuna se administra por vía parenteral.

**Antecedentes de la técnica**

10 SA es un patógeno, que provoca enfermedades en prácticamente todas las especies de mamíferos. SA es un patógeno importante en la especie bovina, ovina y caprina provocando sufrimiento y pérdidas económicas muy altas en las razas lecheras incluyendo ganado, oveja y cabras (reses) en todo el mundo. La mastitis inducida por SA puede ser el factor económico negativo más importante individual en medicina veterinaria debido a la patogenicidad incluyendo inflamación aguda y dolorosa grave, estados crónicos y persistentes y las dificultades con los  
15 tratamientos eficaces basados principalmente en antibióticos que pueden no funcionar debido a la resistencia que conduce a eliminación selectiva. La alternativa sería la vacunación, pero no existe ninguna vacuna eficaz hasta la fecha, que puede constituir la base para combatir el problema de mastitis provocado por SA.

Hay varios factores de patogenicidad para que una vacuna protectora prospectiva contra SA venza las infecciones. Por ejemplo SA "esconde" antígenos en la célula esenciales para la infección y para su supervivencia. Además, SA tiene la capacidad para manipular el sistema inmunitario del huésped para facilitar la existencia bacteriana. Esta  
20 situación compleja es uno de los motivos por los que no está disponible una vacuna frente a SA eficaz para la protección contra mastitis.

Los componentes de SA que manipulan y regulan por disminución la respuesta inmunitaria del huésped incluyen productos excretados tales como toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ , leucocidina. También están implicados componentes unidos a células como superantígenos y proteína A.

25 Los ejemplos de estructuras esenciales que las bacterias esconden al sistema inmunitario del huésped que infecta son proteínas de unión a fibronectina (FnBp) o factor de fibrina externo (Ebf) esenciales para la adherencia de SA al tejido por ejemplo en heridas.

Se han aislado y caracterizado varios componentes de la superficie microbiana de unión a fibronectina que reconocen moléculas adhesivas de la matriz a partir de diferentes bacterias Gram-positivas. Se han clonado y secuenciado genes que codifican para componentes de la superficie microbiana de unión a fibronectina que reconocen moléculas adhesivas de la matriz de *Staphylococcus aureus* (Signas *et al.*, "Nucleoside sequence of the gene for a fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus*: Use of this peptide sequence in synthesis of biologically active peptides", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:699-703, 1989.), *Streptococcus pyogenes* (Talay *et al.*, "Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: Sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells", Infect. Immun., 60:3837-3844, 1992.; Hansky *et al.*, Infect. Immun., 60:5119-5125, 1992) y *Streptococcus dysgalactiae* (Lindgren *et al.*, "Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from *Streptococcus dysgalactiae*--the complete nucleotide sequence and characterization of the binding domains", Eur. J. Biochem., 214:819-827, 1993). Las secuencias de aminoácidos deducidas revelaron proteínas de 60-100 kDa con organización estructural muy similar. La secuencia señal N-terminal va seguida por un tramo largo de secuencia única, que en algunos casos está interrumpida por dos copias de un segmento de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. El sitio de unión a ligando está ubicado justo en posición N-terminal de un dominio rico en prolina, que se cree que ancla las proteínas en la pared celular. Este dominio va seguido por la secuencia LPXTGX que es una señal de direccionamiento a la pared celular (Schneewind *et al.*, Science, 268:103-106, 1995. *et al.*, 1995), un tramo de residuos hidrófobos que representa una unidad transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal corto que contiene una agrupación de residuos cargados positivamente. *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa tienen dispositivos de unión a fibronectina similares y son de especial interés para mastitis en la especie bovina y ovina. Además, los estafilococos negativos para coagulasa tienen FnBp y provocan mastitis. Los sitios de unión a fibronectina primarios en estos componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz consisten en motivos de 30-42 aminoácidos de longitud repetidos 3-4 veces, y la mayoría de las unidades repetidas contienen una secuencia consenso (Lindgren *et al.*, 1993 en el lugar citado; McGavin *et al.*, "Fibronectin receptors from *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus*: Involvement of conserved residues in ligand binding", J. Biol. Chem. 268: 23946-23953, 1993). Este dominio está compuesto por una unidad de 37-40 aminoácidos, repetidos tres o cuatro veces (figura 1 del documento USP 6.685.943).

55 Por tanto, FnBp es una proteína de adhesión importante (antígeno) para la formulación de una vacuna protectora contra varias bacterias Gram-positivas incluyendo SA basándose en la función de adhesión e incluso más como diana para la fagocitosis que es el mecanismo protector principal contra SA. De manera importante, FnBp está presente en muchos aislados de bacterias Gram-positivas tales como *Streptococcus pyogenes* y/o *Streptococcus*

*dysgalactiae* y *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa, y *Staphylococcus* negativo para coagulasa. Casi el 100% de los aislados de SA. Una vacuna sería no sólo para la protección de vacas contra la mastitis provocada por infección por SA, sino también para prácticamente todas las especies animales afectadas por infecciones provocadas por SA incluyendo el hombre.

5 La composición de antígenos de vacuna puede variar en vacunas contra bacterias Gram-positivas, incluyendo infecciones por SA y enfermedad provocada por SA dependiendo de varios factores incluyendo cepas locales y cuadros clínicos. La adhesión a fibronectina media en un factor importante y común para el proceso de infección, y esta proteína está presente en prácticamente todos los aislados de SA. El bloqueo de la adhesión y neutralización es un efecto de IgG1 mediante anticuerpos, mientras que IgG2a es importante para la fagocitosis, el mecanismo protector inmunitario principal contra SA.

10 En vista del hecho de que SA es también un parásito intracelular, la rama mediada por células del sistema inmunitario (IMC) es un factor esencial. Está bien documentado que el sistema iscom potencia de manera potente la IMC y en particular a las células T citotóxicas que destruyen células infectadas, por ejemplo células infectadas por SA. Por tanto, las formulaciones de adyuvante basadas en la tecnología iscom tienen la capacidad para provocar varios mecanismos protectores inmunitarios.

15 Se han notificado iscom que contienen FnBp (Nickerson Nelson *et al.* 2000 (Symposium, Stresa Italia, Proceedings, 426-4319). Se incorporó una FnBp en la matriz iscom para formar un iscom con antígeno integrado. Sin embargo, la formulación de iscom de Nelson no era suficientemente inmunogénica y no era útil para vacunas debido parcialmente a la corta duración de la inmunidad que inducía. La presente invención basada en liposomas o matriz iscom como adyuvante proporciona una inmunidad mucho mejor (véase el presente ejemplo 5 para comparación). Además, la formulación de vacuna según esta invención se adecúa mucho mejor a la producción a gran escala, puesto que la tecnología iscom usada en esta invención requiere sólo la adición de matriz iscom a la suspensión de antígenos de vacuna.

20 Nelson *et al.* "Adhesins in Staphylococcal Mastitis as Vaccine Components", Flemisch Veterinary Journal, vol. 62, n.º 1, 1991, páginas 111-25 dan a conocer la inmunización de ratones con proteínas de fusión con dominios de unión a IgG y FnBp de proteína A de *Staphylococcus* integradas en Iscoms. La inmunización realizada dos veces y una tercera vez durante la lactancia proporciona sólo una respuesta inmunitaria corta. Hay sólo respuesta de anticuerpos en suero y no en la ubre.

25 Pearse *et al.*, "Iscomatrix® adjuvant for antigen delivery", Advanced drug delivery reviews, Elsevier BV Amsterdam, NL, vol. 57, n.º 3, 10 de enero de 2005 (10-01-2005), páginas 465-474, es un artículo de revisión referente a iscom y matriz iscom. D5 da a conocer experimentos llevados a cabo en seres humanos y ratones. No se ocupa de la inmunidad referente a la proteína de unión a fibronectina ni de la inducción de respuesta inmunitaria en la mama. Sólo se comentan respuestas de anticuerpos medidas en suero.

30 Ahora resulta que la tecnología iscom es muy adecuada para la preparación de composiciones de vacuna contra bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* SA y especialmente contra mastitis en la especie bovina.

### Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos una proteína de unión a fibronectina, y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina, que comprenden todos al menos un dominio de unión a fibronectina; y al menos un complejo de matriz iscom para su uso como vacuna contra mastitis en seres humanos, ganado, oveja o cabra, en donde dicha vacuna se administra por vía parenteral.

La invención se dilucida por medio de las siguientes tablas y figuras:

Tabla 1:1

45 Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con proteína de unión a fibronectina (FnBp). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los respectivos candidatos a vacuna.

Tabla2:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con toxoide tetánico (TT). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c con una separación de cuatro semanas con los respectivos candidatos a vacuna.

50 Tabla 3:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con toxoide diftérico (DT). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los respectivos candidatos a vacuna.

Tabla 3:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con toxoide diftérico (DT). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los respectivos candidatos a vacuna.

Figura 1:1

5 Respuestas de anticuerpos séricos en las subclases IgG1 e IgG2 a proteína de unión a fibronectina (FnBp) tras la segunda inmunización de ratones Balb/C con FnBp en diversas formulaciones de adyuvante.

Figura 2:1

Respuestas de anticuerpos séricos a toxoide tetánico (TT) tras la segunda inmunización de Balb/C con TT en diversas formulaciones de adyuvante medidas en las subclases IgG1 e IgG2.

Figura 3:1

10 Respuestas de anticuerpos séricos en las subclases IgG1 e IgG2 a toxoide diftérico (DT) tras la segunda inmunización de Balb/C con DT en diversas formulaciones de adyuvante.

Figuras 4:1 a 4:4

15 Se sensibilizaron diez novillas con FnBp con adyuvante de matriz iscom antes de que entraran en lactancia mediante la vía intravaginal (i. vag.) (4:1), se muestra 1 animal de 3; o mediante sensibilización intranasal (i.n.) (4:2), se muestra 1 animal de 3, o mediante administración s.c. (4:3), se muestra 1 animal de 4. La segunda inmunización se llevó a cabo para todos los grupos por vía s.c. de tres a cuatro semanas más tarde y después de que hubiese comenzado el periodo de lactancia. Se analizaron las respuestas anticuerpos en suero y suero lácteo mediante ELISA midiendo la Ig total, IgG1, IgG2 e IgA totales tal como se representa en las figuras.

Figura 5:1

20 Las respuestas de anticuerpos a proteína de unión a fibronectina (FnBp) de cinco terneros de 4 a 7 meses de edad vacunados con FnBp con adyuvante de matriz iscom dos veces con una separación de 6 semanas. Se registran las respuestas inmunitarias tras la primera inmunización en las subclases IgM e IgG total. Tras la segunda inmunización, se registran las respuestas de anticuerpos en las subclases IgG1 e IgG2.

Figura 5:2

25 Las respuestas de anticuerpos a toxinas  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) de terneros de 4 a 7 meses de edad vacunados dos veces con una separación de seis semanas con diversas formulaciones (véase a continuación). Se midieron las respuestas de anticuerpos mediante pruebas de neutralización de toxinas.

Se inmunizaron cinco terneros en cada grupo con:

Grupo A: FnBp con adyuvante de matriz iscom

30 Grupo B: FnBp más *Staphylococcus aureus* (SA) y toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  y con adyuvante de matriz iscom en la primera inmunización, después de eso con FnBp sólo.

Grupo C: FnBp con SA y más toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  y con adyuvante de matriz iscom en ambas inmunizaciones.

Grupo D: SA y toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  y con adyuvante de matriz iscom en ambas inmunizaciones

Grupo E: Controles no inmunizados.

35 Figura 6

Las respuestas de anticuerpos de terneros en la edad de 1 a 2 años de edad vacunados con proteína de unión a fibronectina (FnBp) complementada con células de *Staphylococcus aureus* (A) o toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  (B). Se adyugaron las vacunas experimentales con matriz iscom. Se midieron las respuestas de anticuerpos en las clases y subclases IgM, IgG total, IgG1 e IgG2.

40 **Descripción detallada de la invención**

45 La invención se refiere a una composición que comprende al menos una proteína de unión a fibronectina (FnBp), y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina, y al menos un complejo de matriz iscom para su uso como vacuna contra mastitis en seres humanos, ganado, oveja o cabra, en donde dicha vacuna se administra por vía parenteral.

La composición puede usarse para preparar una vacuna contra bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa.

5 Puede usarse una proteína de unión a fibronectina de longitud completa así como un péptido o una proteína truncada siempre que comprenda al menos un epítipo o dominio de unión a fibronectina. Por proteína truncada se entiende una proteína de longitud completa producida de manera sintética o que se produce de manera natural de la que se han delecionado uno o más aminoácidos. Pueden delecionarse uno o más aminoácidos en las regiones que no se unen a FnBp. También pueden delecionarse aminoácidos de la unión a FnBp. Sin embargo, al menos un epítipo o dominio de unión a FnBp debe permanecer sin verse afectado.

10 Preferiblemente, el péptido o la proteína truncada comprende uno o más dominios de unión a fibronectina de una bacteria Gram-positiva, especialmente de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa.

15 El dominio de unión a fibronectina puede seleccionarse de los dominios D de la proteína de unión a fibronectina A o B de *Staphylococcus aureus*, tales como los dominios DU y D1-D4; los dominios A de la proteína de unión a fibronectina A de *Streptococcus dysgalactiae*, tales como los dominios AU y A1-A3; los dominios B de la proteína de unión a fibronectina B de *Streptococcus dysgalactiae*, tales como los dominios B1-B3; y los dominios de la proteína de unión a fibronectina de *Streptococcus pyogenes* tales como los dominios P1-P4 (véase la figura 1 del documento USP 6.685.943). También se describen dominios de unión a FnBp de *Staphylococcus aureus* en Signäs *et al.*:  
 20 (1989) Nucleotide sequence of the gene fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: Use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol: 86 págs. 699 - 703.

El péptido o la proteína truncada puede comprender 1-200, preferiblemente 1-100 tal como 1-50, tal como 1-20 aminoácidos en el sentido de 5' o en el sentido de 3' de uno o más de los dominios de unión a FnBp, por ejemplo los dominios D, A, P mencionados anteriormente.

25 La proteína truncada y el péptido pueden ser una secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural o producirse de manera sintética, o producirse mediante tecnología de ADN híbrido. Pueden producirse uno o más de estos dominios de unión a FnBp o varias unidades de repetición que comprenden uno o más de los dominios de unión a FnBp mencionados anteriormente y usarse según la invención.

Se describe en general cómo obtener dominios de unión a FnBp producidos de manera sintética y que se producen de manera natural en el documento USP 6.685.943

30 La identificación de epítipos o dominios de unión a Fn se conoce generalmente en la técnica. Por ejemplo, pueden emplearse los métodos de Hopp, tal como se enseña en la patente estadounidense n.º 4.554.101, que enseña la identificación y preparación de epítipos a partir de secuencias de aminoácidos basándose en la hidrofiliidad. También pueden usarse los métodos descritos en varios otros artículos, y programas de software basados en los mismos, para identificar secuencias de núcleos epitópicos (véase, por ejemplo, Jameson y Wolf, 1988; Wolf *et al.*,  
 35 1988; patente estadounidense n.º 4.554.101). La secuencia de aminoácidos de estas "secuencias de núcleos epitópicos" puede incorporarse entonces fácilmente en péptidos, a través de la aplicación de o bien síntesis de péptidos o bien tecnología recombinante.

40 En general, el tamaño del dominio o epítipo no es particularmente crucial, siempre que sea al menos lo suficientemente largo como para unirse a FnBp. La secuencia de núcleo útil más pequeña esperada por la presente descripción es generalmente del orden de aproximadamente al menos 5 aminoácidos de longitud, prefiriéndose más secuencias del orden de 10 ó 50. Pueden usarse uno o más epítipos o dominios de FnBp.

45 Los expertos en la técnica conocen la identificación de secuencias de núcleos epitópicos, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.554.101 que enseña la identificación y preparación de epítipos a partir de secuencias de aminoácidos basándose en la hidrofiliidad. Además, están disponibles numerosos programas informáticos para su uso en la predicción de partes antigénicas de proteínas (véanse por ejemplo, Jameson y Wolf, 1988; Wolf *et al.*, 1988). También pueden ser útiles programas informatizados de análisis de secuencias peptídicas (por ejemplo, software DNASTar 7, DNASTar, Inc., Madison, Wis.) en el diseño de FnBp sintéticos, y epítipos y análogos de epítipos derivados de FnBp según la presente descripción.

50 En este sentido, pueden realizarse ventajas particulares a través de la preparación de péptidos sintéticos que incluyen secuencias de núcleos epitópicos/inmunogénicos. Estas secuencias de núcleos epitópicos pueden identificarse como regiones hidrófilas y/o móviles de los polipéptidos o las que incluyen un motivo de células T.

55 Confirmar que una proteína o un péptido reacciona inmunológicamente de manera cruzada con, o tiene una función biológica equivalente de, uno o más epítipos de los péptidos dados a conocer, es también una cuestión sencilla. Esto puede determinarse fácilmente usando ensayos específicos, por ejemplo, de una única secuencia epitópica propuesta, o usando exámenes más generales, por ejemplo, de un conjunto de fragmentos de proteínas o péptidos sintéticos generados aleatoriamente. Los ensayos de examen pueden emplearse para identificar o bien antígenos equivalentes o bien anticuerpos que reaccionan de manera cruzada. En cualquier caso, el principio es el mismo, es

decir, basándose en competición para sitios de unión entre anticuerpos y antígenos.

- 5 Los ensayos de competición adecuados que pueden emplearse incluyen protocolos basados en ensayos inmunohistoquímicos, ELISA, RIA, inmunotransferencia de tipo Western o puntual y similares. En cualquiera de los ensayos competitivos, uno de los componentes de unión, generalmente el elemento conocido, tal como el péptido derivado de FnBp, o un anticuerpo conocido, se marcará con un marcador detectable y los componentes de prueba, que permanecen generalmente sin marcar, se someterán a prueba para determinar su capacidad para reducir la cantidad de marcador que se une al correspondiente antígeno o anticuerpo reactivo.
- Pueden obtenerse péptidos útiles para su uso según la invención tal como se describe en los ejemplos, información general antes del ejemplo 1 y en el ejemplo 1.
- 10 Con el fin de purificar mejor la proteína truncada o el péptido, estos pueden producirse mediante ingeniería de ADN y una secuencia insertada que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene afinidad por materiales que pueden usarse para la separación. Por ejemplo, pueden introducirse 6 histidinas; uno o más aminoácidos positivos; y/o la región zz(z) de proteína A que se une a material quelante (Ni- o Co-); un material de intercambio iónico y material de inmutafinidad respectivamente. Tales métodos se conocen generalmente en la técnica.
- 15 La proteína de unión a fibronectina, la proteína de unión a fibronectina truncada y el péptido de unión a fibronectina que comprenden al menos un dominio de unión a fibronectina pueden aislarse de la célula bacteriana de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente. También pueden aislarse de productos excretados por las bacterias.
- Además, los antígenos pueden producirse como productos de ADNr a partir de células bacterianas; células fúngicas o a partir de células de mamíferos según tecnología conocida.
- 20 También pueden producirse en sistemas de vectores; o *in vivo* tras inmunización con las denominadas vacunas de ADN o producirse como las denominadas vacunas de ARN tal como se conoce generalmente en la técnica.
- También pueden producirse como proteínas de fusión y ser por ejemplo productos de ADNr a partir de células bacterianas; producirse como proteínas de fusión y ser productos de ADNr a partir de células fúngicas; producirse como proteínas de fusión y ser productos de ADNr a partir de células de mamífero; o producirse como proteínas de fusión en sistemas de vectores a partir de células bacterianas; producirse como proteínas de fusión en sistemas de vectores a partir de células fúngicas; producirse como proteínas de fusión en sistemas de vectores a partir de células de mamífero.
- 25 Además, el producto de fusión puede ser un conjugado entre una proteína y un antígeno capsular de hidrato de carbono a partir de una bacteria Gram-positiva tal como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa, o el producto de proteína de fusión puede ser un conjugado entre dos proteínas en el que al menos una de las proteínas es una proteína bacteriana a partir de cualquiera de los microorganismos mencionados anteriormente tales como una proteína de *Staphylococcus aureus*.
- 30 La proteína de unión a fibronectina y/o la proteína de unión a fibronectina truncada y/o el péptido de unión a fibronectina puede integrarse en liposomas o mezclarse con matriz iscom o liposomas o acoplarse sobre liposomas o matriz iscom.
- El complejo de matriz iscom en las composiciones de la invención comprende al menos un glucósido y al menos un lípido. El lípido es al menos un esteroles tal como colesterol y opcionalmente también fosfatidilcolina. La matriz tiene un efecto inmunopotenciador sobre sustancias antigénicas administradas conjuntamente, véase el documento EP 0 436 620 B1 y puede producirse tal como se describe en esta patente.
- 40 La composición iscom, los complejos de matriz y/o los liposomas, también pueden contener una o más sustancias inmunomoduladoras (activas de adyuvante) distintas, no necesariamente una saponina, por ejemplo lipopolisacáridos (LPS), lípido A o derivados de lípido A, CT o LT y sus subfragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo, LTB, LTA, CTB, CTA o CTA1-DD.
- 45 La matriz iscom puede ser una o más partículas de matriz iscom o cualquier subfragmento de los anillos de 6 nanómetros de las mismas. Puede usarse cualquier mezcla de tal matriz iscom, partículas o subfragmentos. Puede usarse uno o más antígenos y puede usarse un antígeno pasajero o transporte tal como se describe en el documento EP 9600647-3 (PCT/SE97/00289).
- 50 Los lípidos usados son particularmente los descritos en la patente EP 0 109 942 B1 del solicitante en particular en la pág. 3 y en la patente EP 0 436 620 B1 en la pág. 7, líneas 7-24. Especialmente se usan esteroides tales como colesterol y fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Pueden usarse receptores que contienen lípidos que se unen a los componentes de unión celular, tales como glicolípidos incluyendo el receptor de la toxina del cólera, que es el gangliósido GM1, y el antígeno de grupo sanguíneo fucosado. Los componentes de unión celular pueden funcionar entonces como el moco de moléculas diana y unirse a las sustancias que contienen lípidos simplemente mezclándose con complejos que las contienen. Se describen complejos iscom que comprenden tales
- 55

receptores y receptores en el documento WO 97/30728.

Se describen glucósidos útiles en el documento EP 0 109 924 B1. Se prefieren saponinas y triterpenosaponinas. Pueden estar en forma de extracto sin procesar de *Quillaja Saponaria* Molina (Dalsgaard, K. (1974), Arch. Gesamte Virusforsch, 44, 243.), o cualquier subfracción del mismo tal como se describe en el documento PCT/US/88101842 concedido a Kensil *et al.*, Kensil, C.A. *et al.* (1991), J. Immunol., 146, 431, Kersten, G.F.A. *et al.* (1990). "Aspects of Iscoms. Analytical, Pharmaceutical and Adjuvant Properties; Thesis, University of Utrecht, documentos EP 0 362 279 B2 y EP 0 555 276 B1.

Según un aspecto de la invención, el complejo de matriz iscom comprende extracto sin procesar o bruto de Quil A que comprende una mezcla de saponinas o una forma semipurificada de la misma tal como Quillaja Powder Extract (Berghausen, EE.UU.), Quillaja Ultra Powder QP UF 300, Quillaja Ultra Powder QP UF 1000 o Vax-Sap (las tres de Natural Responses, Chile).

Según otro aspecto de la invención, el complejo de matriz iscom comprende al menos un glucósido purificado tal como una fracción de saponina de Quil A.

Las fracciones de saponina purificadas según la invención pueden ser las fracciones A, B y C descritas en el documento WO 96/11711, las fracciones B3, B4 y B4b descritas en el documento EP 0 436 620. Las fracciones QA1-22 descritas en el documento EP 0 3632 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Dinamarca), *Quillaja Saponaria* Molina Spikoside (Isconova AB, Uppsala Science Park, 751 83, Uppsala, Suecia).

Pueden usarse las fracciones QA-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21 y 22 del documento EP 0 3632 279 B2, especialmente QA-7, 17-18 y 21. Se obtienen tal como se describe en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente en la página 6 y en el ejemplo 1 en las páginas 8 y 9. Preferiblemente se usan las subfracciones A y C.

El término "una fracción de saponinas a partir de *Quillaja Saponaria* Molina" se usa a lo largo de toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones como una descripción genérica de una fracción de saponinas purificada o definida de *Quillaja Saponaria* o una fracción sustancialmente pura. Es importante que la fracción no contenga demasiado de cualquier otra fracción que afecte de manera negativa a los buenos resultados que se obtienen cuando se usan las mezclas de iscom o matriz iscom que comprenden esencialmente una fracción. La preparación de saponina puede incluir, si se desea, cantidades menores, por ejemplo hasta el 40% en peso, tal como hasta el 30% en peso, hasta el 25% en peso, hasta el 20% en peso, hasta el 15% en peso, hasta el 10% en peso, hasta el 7% en peso, hasta el 5% en peso, hasta el 2% en peso, hasta el 1% en peso, hasta el 0,5% en peso hasta el 0,1% en peso de otros compuestos tales como otras saponinas u otros materiales de adyuvante.

La composición según la invención puede comprender una mezcla de al menos dos complejos iscom, elegidos de complejos de matriz iscom, comprendiendo cada complejo esencialmente una fracción diferente de saponinas a partir de *Quillaja Saponaria* Molina tal como se describe en el documento WO 2004/004762 (PCT/SE03/01180).

Preferiblemente, se usan mezclas de matriz en las que la fracción *Quillaja Saponaria* Molina y la fracción Quil C se incorporan por separado en matriz o complejos iscom diferentes. Tal como se mencionó anteriormente, puede usarse cualquier combinación de % en peso de los diferentes complejos iscom basándose en su contenido de fracción A y C de *Quillaja Saponaria* Molina respectivamente. Las mezclas pueden comprender desde el 0,1 hasta el 99,9 en peso, del 5 al 95% en peso, del 10 al 90% en peso, del 15 al 85% en peso, del 20 al 80% en peso, del 25 al 75% en peso, del 30 al 70% en peso, del 35 al 65% en peso, del 40 al 60% en peso, del 45 al 55% en peso, del 50 al 60%, en peso, del 50 al 50% en peso, del 55 al 45% en peso, del 60 al 40% en peso, del 65 al 35% en peso, del 70 al 30% en peso, del 75 al 25% en peso, del 80 al 20% en peso, del 85 al 15% en peso, del 90 al 10% en peso, del 95 al 05% en peso, de complejos de matriz iscom que comprenden fracción A de *Quillaja Saponaria* Molina (tal como se define en el presente documento) y el resto hasta el 100% en cada caso de intervalo de complejos de matriz iscom que comprenden fracción C de *Quillaja Saponaria* Molina (tal como se define en el presente documento), contado en el contenido de las fracciones suma A y C de *Quillaja Saponaria* Molina en los complejos de matriz iscom.

La mezcla puede comprender desde el 75% hasta el 99,5% en peso de fracción A y del 0,5% al 25% en peso de fracción C. Preferiblemente, la mezcla comprende desde el 90% hasta el 99% en peso de fracción A y del 1% al 10% en peso de fracción C. Una preparación particularmente preferida comprende aproximadamente del 91% al 98% en peso de fracción A y aproximadamente del 2% al 9% en peso de fracción C, especialmente de aproximadamente el 92% al 96% en peso de fracción A y de aproximadamente el 4% al 8% en peso de complejos de fracción C contados en el contenido de las fracciones suma A y C de *Quillaja Saponaria* Molina en los complejos iscom.

Todos los intervalos mencionados anteriormente pueden usarse para cualquier combinación de cualquier fracción de *Quillaja Saponaria* Molina en formulaciones para administración a cualquier tipo de especie humana o animal. Los ejemplos de especies animales a las que pueden administrarse las formulaciones según la invención son animales de compañía tales como gatos, perros, caballos, aves tales como loros, especies importantes económicamente, tales como ganado, por ejemplo especies bovinas, porcinas, oveja, cabras. Preferiblemente, se usa más del 50% en

peso de fracción C en combinación con cualquiera de las otras fracciones y especialmente en combinación con fracción A. Por tanto, puede usarse desde el 50,5 - 99,5% en peso de C y el 0,5 - 49,5% en peso de A.

- 5 Según una realización de la invención, el complejo de matriz iscom comprende fracción A de Quil A junto con al menos otro adyuvante tal como se describe en el documento WO 2005/002620 (PCT/SE2004/001038). Tal complejo iscom y complejo de matriz iscom puede comprender el 50-99,9% de fragmento A de Quil A y el 0,1-50% de fragmento C y/o fracción B y/u otras fracciones o derivados de Quil A contadas en el peso total de las fracciones A y C, en las que pueden integrarse los diferentes componentes de glucósido, acoplados sobre o mezclados con la misma o diferente partícula de complejo o matriz iscom.
- 10 La proteína de unión a fibronectina truncada y/o un péptido de unión a fibronectina, que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina, también puede integrarse en, acoplarse a o mezclarse con liposomas. Pueden producirse liposomas tal como se describe en Gregoriadis, G., McCormack, Obrenovic, M., Perrie, Y. y Saffie, R. En *Vaccine Adjuvants, Preparation Methods and Reseach Protocols*. (2000) Ed. O'Hagan D., págs. 137-150. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers.
- 15 También pueden integrarse en, acoplarse a o mezclarse con y/o al menos un lípido y al menos una saponina, mediante lo cual el al menos un lípido y la al menos una saponina pueden estar en complejo, disolución o suspensión. Preferiblemente el complejo en este caso no está en la forma de iscom.
- 20 La proteína de unión a fibronectina, la proteína de unión a fibronectina truncada y el péptido de unión a fibronectina que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina pueden considerarse como antígenos. La composición según la invención puede comprender al menos un antígeno adicional.
- Según una realización de la invención, el al menos un antígeno adicional son antígenos en forma de células completas de bacterias Gram-positivas.
- En otra realización de la invención, los antígenos son componentes antigénicos tales como a partir de células bacterianas o productos excretados tales como hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  especialmente a partir de microorganismos Gram-positivos.
- 25 Las bacterias Gram-positivas a partir de las que se obtienen estas células completas y componentes antigénicos pueden ser *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa, y *Staphylococcus* negativo para coagulasa. Por células de *Staphylococcus aureus* quiere decirse el grupo *aureus* del género *Staphylococcus*. De manera correspondiente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa, y *Staphylococcus* negativo para coagulasa se refieren al grupo respectivo del género. Esto también se aplica a los microorganismos a partir de los que se obtiene el dominio, el péptido o la proteína de unión a FnBp.
- 30 Pueden elegirse adhesinas a partir de factor de aglutinación (clf), proteína de unión a fibrina externa (efb), adhesinas A y B a fibrinógeno, coagulasa (coa), proteína A de unión a fibrinógeno que se une a proteína de unión a fibronectina de fibrinógeno (FnBp) A y B; unión a fibrinógeno, proteína de unión a colágeno (cna); unión a colágeno, proteína de unión a elastina (ebpS); unión a elastina, proteína análoga a CMH (map o eap); unión a proteínas de matriz extracelular, adhesina intracelular de polisacárido (pia); formación de biopelícula o adhesión intracelular, proteína A (spa); posible evasión de la defensa del huésped, polisacáridos capsulares (por ejemplo los tipos 1, 5, 8 y 13) (cap); moléculas antifagocíticas o ácido teicoide.
- 35 Pueden excretarse factores de formación de poros y pueden elegirse alfa-hemolisina, beta-hemolisina, gamma-hemolisina, delta-hemolisina, fosfolipasa C (plc; lisis de célula huésped, elastasa de invasiión tisular (sepA) e hialuronidasa de invasiión tisular (hysA).
- 40 Todos los componentes mencionados pueden ser proteínas o hidratos de carbono aislados de las células bacterianas, productos excretados, productos de ADNr o productos de fusión expresados como productos de ADNr, productos o proteínas de fusión en sistemas de vectores, las denominadas vacunas de ADN o ARN siempre que usen el presente sistema de adyuvantes.
- 45 Todavía según otra realización de la invención, los antígenos pueden ser componentes antigénicos que regulan por disminución el sistema inmunitario tales como superantígenos, antígenos capsulares, endotoxinas, exotoxinas y enzimas extracelulares.
- 50 Tales exotoxinas y enzimas extracelulares pueden elegirse de enterotoxinas A a E, H (sea-e, h), toxina-1 del síndrome del choque tóxico (tst); evasión de la defensa del huésped con superantígeno, propiedades, toxinas de exfoliación AB (eta, efb, etb, evasión de las defensas del huésped, lipasa (geh); evasión de la defensa del huésped, leucocidina Pantón-Vallentine (lukF, lukS), lisis de fagocitos del huésped, evasión de la defensa del huésped, evasión por estafilocinasa (sak) de la defensa del huésped.
- 55 Los componentes antigénicos mencionados anteriormente pueden diferir entre especies de los grupos del género de



diferentes regiones del mundo.

La información anterior sobre el origen de la proteína de unión a fibronectina truncada y/o un péptido de unión a fibronectina también puede aplicarse a el al menos antígeno adicional que puede comprender la composición.

5 Las composiciones según la invención pueden comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, diluyentes, excipiente o aditivo.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida, usando los agentes de suspensión y los agentes dispersantes o humectantes adecuados, que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un disolvente o diluyente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como medio de suspensión o disolvente. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

15 Las disoluciones o suspensiones también podrían comprender al menos uno de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral podría incluirse en ampollas, jeringas desechables o recipientes de múltiples dosificaciones hechos de vidrio o plástico. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intradérmica de técnicas de infusión, para inyección sin aguja-inyección en chorro.

25 La composición puede estar en forma de una composición de vacuna para inyector en chorro que comprende algunos cientos de dosis para la vacunación de por ejemplo 200 vacas.

La composición según la invención puede comprender además una composición de antígeno que afecta a la ubre, tal como estafilococos negativo para coagulasa, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalacti*, *Streptococcus agalacti*, bacterias coliformes incluyendo *Klebsiella sp.* y *E. coli*.

30 La invención también se refiere al uso de las composiciones para preparar vacunas. Las vacunas están previstas para cualquier mamífero tales como seres humanos, animales tales como ganado, oveja o cabra. La invención se refiere especialmente a la vacunación de animales bovinos, ovinos y caprinos contra mastitis. La invención se refiere especialmente a una vacuna contra la mastitis para bovinos que comprende un antígeno de *Staphylococcus aureus* mezclado con matriz iscom. La matriz se produce preferiblemente a partir de Quil A bruta o Quil A semipurificada.

35 Pueden vacunarse los bovinos una vez antes del parto y con un refuerzo antes o después del parto, (preferiblemente después de) 1 mes. A las novillas se les puede administrar dos administraciones antes del parto, preferiblemente a ser posible, seguidas por una tercera administración tras el parto.

40 Una realización de la invención se refiere a una composición según la reivindicación 1 que comprende al menos un antígeno adicional elegido de toxinas y/o células completas a partir de microorganismos especialmente a partir de bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus* negativo para coagulasa, especialmente a partir de *Staphylococcus aureus*. Por tanto, la composición puede comprender toxinas o células completas o ambas.

Resulta que para novillas por encima de aproximadamente un año de edad se obtiene una mejor inmunización cuando se usa una composición según la invención complementada con células completas y/o toxinas de bacterias Gram-positivas, especialmente a partir de las mencionadas anteriormente tales como *Staphylococcus aureus*.

45 La invención se refiere además a un kit de partes en el que un compartimento comprende al menos una proteína de unión a fibronectina y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina, que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina, y otro compartimento comprende una instrucción para su uso y/o al menos un complejo de matriz iscom y/o un liposoma. Un compartimento puede comprender al menos un antígeno a partir de *Staphylococcus aureus* que se desarrolla local o regionalmente.

50 Las especies de microorganismos Gram-positivos mencionadas anteriormente, tales como la especie *Staphylococcus aureus* del grupo *aureus* del género *Staphylococcus*, pueden diferir en diferentes regiones del mundo. Un compartimento del kit puede comprender un complejo de matriz iscom o liposoma según la invención. Este compartimento puede comprender uno o más antígenos de un microorganismo Gram-positivo por ejemplo el grupo *aureus* del género *Staphylococcus*. El otro compartimento puede comprender un antígeno de un microorganismo Gram-positivo, por ejemplo la forma del grupo *aureus* del género *Staphylococcus* que puede ser específica para una determinada región por ejemplo basándose en antígenos capsulares. Ambos tipos de antígeno

pueden integrarse en liposomas, unirse a liposomas o complejo de matriz iscom o mezclarse con complejo de matriz iscom o liposomas.

5 Como las especies de microorganismos Gram positivos mencionadas anteriormente, tales como las especies *Staphylococcus aureus* del grupo *aureus* del género *Staphylococcus*, pueden producir antígenos que regulan por disminución el sistema inmunitario y antígenos que no regulan por disminución el sistema inmunitario, podría ser ventajoso administrar estos tipos diferentes de antígenos en diferentes formulaciones a diferentes partes del organismo animal para aumentar el efecto de cada componente tras la inmunización. Por tanto, los kits pueden comprender al menos un compartimento que comprende al menos un antígeno que regula por disminución (*down regulates*) el sistema inmunitario y otro compartimento que comprende al menos un antígeno que no regula por disminución el sistema inmunitario.

10 La composición y el kit también pueden comprender un antibiótico. Esto puede ser útil cuando el animal tiene una infección subclínica o clínica de los microorganismos mencionados anteriormente.

15 La cantidad de sustancia antigénica puede variar, dependiendo de la sustancia y los microorganismos usados y el individuo que va a tratarse. Para animales pequeños, la dosis baja es de 0,1 µg hasta 100 µg, para animales grandes la dosis baja oscila entre 10 µg y 1000 µg, especialmente de 10 µg hasta 300 µg que se dice que no son fronteras limitantes. En seres humanos los intervalos de dosis son de 1 µg hasta 200 µg sin ser la frontera limitante.

20 La invención también se refiere a un método para la vacunación de mamíferos tales como seres humanos y especialmente ganado, en el que se administra al animal una composición que comprende al menos una proteína de unión a fibronectina, y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina, que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina, y al menos un complejo de matriz iscom y/o liposoma.

El protocolo de inmunización para una vacuna contra la mastitis prospectiva puede ser tal como sigue:

25 Para novillas que entran en lactancia se llevan a cabo dos inmunizaciones por vía s.c. con un intervalo de 5 a 8 semanas. La última inmunización se realiza aproximadamente diez días antes del parto. Después de esto, se recomienda una inmunización anual de 10 a 14 días antes del parto esperado.

En el caso de una vaca que tiene mastitis por SA *aureus* subclínica o clínica, se recomendará vacunar dos veces con un intervalo de 2 a 3 semanas durante el periodo seco y conjuntamente tratar al vaca con antibiótico, es decir, un tratamiento inmunológico y antibiótico combinado.

30 Toda la información referente a la proteína de unión a fibronectina, la proteína de unión a fibronectina truncada y/o un péptido de unión a fibronectina, que comprende al menos un dominio de unión a fibronectina, los lípidos, glucósidos y otros antígenos añadidos además del péptido o la proteína de unión a fibronectina se refiere mutatis mutandis a todas las realizaciones de la invención.

La invención se dilucidará a continuación adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

35 Información general para los ejemplos

Materiales

Adyuvantes

40 Al(OH)<sub>3</sub> – Un adyuvante clásico para su uso en animales y en seres humanos. El efecto adyuvante todavía no se comprende completamente. Se potencian las respuestas de anticuerpos en comparación con sin adyuvante pero la respuesta está sesgada fuertemente hacia TH2. Ningún efecto o bajo efecto del adyuvante sobre respuestas celulares.

Al(OH)<sub>3</sub>, Allhidrogel era de Brenntag AG, Dinamarca.

Adyuvantes de matriz iscom

45 Matriz-Q - se produce a partir de saponina de *Quillaja* semipurificada que contiene una gama completa de diferentes moléculas de saponina de *Quillaja*. El efecto adyuvante es fuerte e incluye respuestas inmunitarias tanto humoral como celular.

Matriz-C se produce a partir de una fracción purificada de saponina de *Quillaja* (fracción-C). Tiene una actividad adyuvante potente (Johansson, M y Lövgren-Bengtsson, K Vaccine 17, 2894-2900). La toxicidad es considerablemente más baja que la de la matriz-Q.

50 Matriz-QWT se produce a partir de otra fracción purificada de saponina de *Quillaja* (fracción-A). El efecto adyuvante

se describe como más bajo que para la matriz-C (documento PCT/SE2004/001038) pero parece ser más fuerte para respuestas inmunitarias celulares. La matriz-QWT parece ser esencialmente no tóxica en dosis relevantes para la actividad adyuvante y se tolera muy bien en todas las especies animales sometidas a prueba.

- 5 Matriz-MIX – es una mezcla de matriz-QWT y matriz-C (que consiste en el 17% de matriz-C y el 83% de matriz-QWT). Se mostró que mezclas similares ejercen un efecto adyuvante sorprendentemente alto para antígenos individuales (documentos WO 2004/004762, PCT/SE2004/001038).

Todas las formulaciones de adyuvante de matriz eran de Isconova AB, Uppsala, Suecia.

#### Antígenos

- 10 El toxoide tetánico (TT) tratado con formalina era de The State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca. TT es un antígeno considerablemente inmunogénico. Se usaron una dosis superior (2,5 lf) y una dosis baja (0,5 Lf) en los ejemplos. Par este lote particular, 1 Lf de toxoide corresponde a x microgramos de proteína.

El toxoide diftérico (DT) recombinante era de Sigma. Se usó una dosis de 1 microgramo en los ejemplos.

- 15 La proteína de unión a fibronectina (FnBp) la fabricó Crosslink Ltd Budapest, Hungría y era una mezcla de FnBp A corta (396 pb con el 100% de conformidad de FnBp A de NC\_002951.2) y FnBp B corta (396 pb con el 95% de conformidad de FnBp B de NC\_002951.2 y de Biostapro AB Ulltunaallen 2B 756 51 Uppsala, Suecia y era un fragmento de ADN que incluía un dominio de unión a fibronectina de 16 kD que incluía 3 repeticiones DD incluyendo una cisteína en el extremo N terminal no esencial para el resultado de la inmunización. Se mezclaron 190 µg de este constructo con 1 mg de matriz iscom por dosis.

#### ELISA

- 20 Sueros de ratón. Se midieron anticuerpos específicos de antígeno en suero en muestras individuales mediante ELISA indirecto convencional. Se recubrieron placas de microtitulación (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante la noche a +4°C con los antígenos individuales a una concentración de 1 µg/ml en tampón carbonato 50 mM pH 9,6. Antes de la incubación con muestras, se bloquearon las placas durante 1 hora a t.a. con PBS-T (solución salina tamponada con fosfato con Tween al 0,05%) complementada con el 2% (p/v) de leche desnatada en polvo (PBS-T/M). Se incubaron las placas secuencialmente con diluciones en serie de sueros de prueba en PBS-T/M y anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Dakocytomation, Dinamarca). Para la medición de las subclases de IgG, se incubaron diluciones en serie de sueros de prueba con anticuerpo de cabra anti-IgG1HRP de ratón conjugado con HRP (Serotec, Noruega) o con anticuerpo de cabra anti-IgG2a HRP de ratón conjugado con HRP (Serotec, Noruega). Se visualizó la reacción enzimática mediante incubación con tampón de sustrato (K-blue, SVANOVA, Uppsala, Suecia), se detuvo la reacción tras 10 minutos mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. Se realizaron todos los lavados con PBS-T. Se diluyeron los conjugados según las instrucciones del fabricante en PBS-T/M. Se calcularon los títulos mediante interpolación de la parte lineal de la curva de titulación y se expresan como recíprocos de la dilución del suero que da una absorbancia de 1,0.

- 35 Sueros de vaca y leche. Se midieron anticuerpos específicos de antígeno en suero y leche en muestras de suero (leche) individuales mediante ELISA indirecto convencional. Se recubrieron placas de microtitulación (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante la noche a +4°C con FnBp a una concentración de 1 µg/ml en tampón carbonato 50 mM pH 9,6. Antes de la incubación con muestras, se bloquearon las placas durante 2 horas a t.a. con PBS-T (solución salina tamponada con fosfato con Tween al 0,05%) complementada con el 10% (p/v) de suero de caballo (PBS-T/H). Se incubaron las placas secuencialmente con diluciones en serie de sueros de prueba (leche) en PBS-T/H y anticuerpo de oveja anti-IgG bovina conjugado con HRP (Serotec, Noruega). Para la medición de las subclases de IgG, se incubaron diluciones en serie de sueros de prueba con anticuerpo de oveja anti-IgG1 bovina conjugado con HRP (Serotec, Noruega) o con anticuerpo de oveja anti-IgG2 bovina conjugado con HRP (Serotec, Noruega), con anticuerpo de oveja anti-IgA bovina conjugado con HRP (Serotec, Noruega) Se visualizó la reacción enzimática mediante incubación con tampón de sustrato (K-blue, SVANOVA, Uppsala, Suecia), se detuvo la reacción tras 10 minutos mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. Se realizaron todos los lavados con PBS-T. Se diluyeron los conjugados según las instrucciones del fabricante en PBS-T/H. Se calcularon los títulos mediante interpolación de la parte lineal de la curva de titulación y se expresan como recíprocos de la dilución del suero que da una absorbancia de 1,0.

- 50 Se midieron los anticuerpos frente a bacterias estafilocócicas en suero y leche usando un ELISA comercial (kit de prueba de anticuerpos frente a *Staphylococcus Aureus*, WMRD, Pullman, WA, EE.UU.).

Ejemplo 1 Preparación de dominios de unión a fibronectina.

Clonación de proteína de unión a fibronectina

Proyecto llevado a cabo por Crosslink Ltd Budapest, Hungría	Informe escrito por, Ferenc Felföldi Crosslink Ltd.	Ordenado por Prof. Bror Morein ISCONOVA, Uppsala, Suecia
---	---	--

Contenido		
Introducción		p1
A. Clonación de la versión de longitud completa con etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal		p1
B. Clonación de la versión corta con etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal		p3

Introducción

El objetivo del proyecto era clonar y expresar el gen FNBP a partir de *Staphylococcus aureus*

a.) versión de longitud completa con etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal para la preparación de proteínas;

5 b.) versión corta con etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal para la unión al adyuvante;

Se proporcionó la cepa que provoca mastitis en vacas por ISCONOVA Ltd., Uppsala, Suecia. Sin embargo, la información de secuencia de esta cepa no estaba disponible.

A. Clonación de la versión de longitud completa con etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal

10 En *S. aureus* dos tipos de gen codifican para la proteína de unión a fibronectina, es decir, gen FNBP A y FNBP B. Se investigó el NCBI Data Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para determinar FNBP y se encontraron secuencias para ocho cepas de *S. aureus*.

Solo había un 80% de similitud de las ocho cepas en los genes de FNBP. Con el fin de asegurarse de que el gen FNBP de las cepas podía amplificarse en la longitud completa (excluyendo la secuencia señal), se seleccionaron cebadores que amplifican ambos genes A y B.

15 Preparación de ADN diana a partir de *Staphylococcus aureus*.

Se preparó el ADN genómico a partir de suspensión de *S. aureus* mediante el método tradicional y se usó en la reacción de PCR como molde. Afortunadamente, la longitud de los genes A y B difiere en 200 bp. Por tanto, en un gel de electroforesis largo, fue posible la separación de los dos productos de PCR. Se separó el producto del gen A y se usó en las siguientes etapas.

20 1. Se centrifugaron cincuenta ml de cultivo de *S. aureus* (DO600=2) y se lavaron dos veces en 2x25 ml de tampón de lavado (NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM [pH: 7,5]).

2. Se resuspendieron las células en 5 ml de tampón de lisis A (EDTA 10 mM, Tris HCl 50 mM [pH: 7,5], lisozima 0,1 mg/ml) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min.

25 3. Se añadieron cinco ml de tampón de lisis B (SDS al 2%, Tris HCl 50 mM [pH:7,4], proteinasa K 0,025 mg/ml). Se incubó la suspensión a 55°C durante la noche.

4. Se extrajo la suspensión con un volumen de fenol seguido por extracción con un volumen de cloroformo + alcohol i-amílico.

5. Se precipitó el ADN con 2,5 volúmenes de etanol y se hizo girar sobre en una varilla de vidrio. Se lavó el ADN con etanol al 70% y se secó en un tubo Eppendorf.

30 6. Se resuspendió el ADN en 250 microlitros de tampón TE.

En la siguiente etapa se digirieron ambos productos de PCR con diferentes enzimas de restricción con el fin de seleccionar los que no tenían sitio de escisión en los productos de PCR. Puede garantizarse la clonación en los extremos sin dañar el inserto.

35 Se encontraron tres enzimas de restricción, BamHI, HindIII y XhoI que no escinden en FNBP A. Se decidió continuar con FNBP A, y usar BamHI y HindIII para la clonación, mientras que la XhoI para la adición de la etiqueta de His al extremo C-terminal.

Los cebadores usados para las amplificaciones tienen los sitios de escisión anteriores en su extremo 5' (texto en negrita):

**FnBpaF**

**CGGGATCCTGCAGCATCAGAACAAAAGACA**ACTACAGT

**FNBPaR**

**GTAAGCTTATGCTTTGTGATTCTTTTTATTTCTGCGTAA**

5 Amplificación del gen FNBP:

Se amplificó la longitud completa del gen FNBP A a partir de la cepa deseada, se clonó y se confirmó mediante secuenciación.

Con el fin de realizar una purificación posterior más eficaz, se eliminó el dominio de unión a membrana (M) y la parte repetitiva y no repetitiva del dominio que abarcaba la pared celular (W1 y W2) del gen.

10 Para las descripciones del dominio véase el artículo Signäs *et al.*: (1989 en el lugar citado).

NcoI y las enzimas de restricción XhoI mencionadas anteriormente eran apropiadas para este objetivo.

Los cebadores diseñados fueron:

**FnBpNco**

**CGGGATCCATGGCATCAGAACAAAAGACA**ACTACAGT

15 (el cebador comienza en la posición 2572388 DE >[ref|NC002951.2|](#) *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* COL, longitud de genoma completo=2809422)

**FnBpD4**

**GAGCTCGAGTGGCACGATTGGAGGTGTTGTATCTTCT**

20 (el cebador comienza en la posición 2569863 DE >[ref|NC002951.2|](#) *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* COL, longitud de genoma completo=2809422)

Se usaron las siguientes etapas

1. Cien microlitros de disolución de amplificación contenían 10 microlitros de tampón 10XPCR, 10 microlitros de cada cebador (10 pmol/microlitro de disolución madre), 400 micromoles de dNTP y 5 U de enzima Pfu.

25 2. Se llevó a cabo la amplificación en 30 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 s), hibridación (65°C durante 1 min.) y polimerización (72°C durante 2 min.).

3. Se comprobaron los productos de PCR en gel de agarosa y se purificaron mediante unidades de filtro de PCR Single Sample PCR Cleanup Montage® (Millipore).

Clonación del producto de PCR

30 Se clonó el gen FNBP en vectores pET21d. Se sitúa un codón para la etiqueta de 6-His, seguido por un codón de terminación, detrás del sitio de escisión de XhoI del vector pET21d. Como consecuencia, la proteína expresada contendrá una etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal.

Se llevó a cabo la expresión 8 horas tras la inducción. Se sonicaron las células y se centrifugaron tras la expresión. Se sometieron a prueba los productos sobre SDS-PAGE y tinción con azul de Commassie con o sin preparación sobre una columna de agarosa Ni-NTA. La expresión era clara en comparación con el cultivo no inducido.

35 Se usaron las siguientes etapas

1. Se resuspendió el producto de PCR en 40 microlitros de tampón NEB2 y se digirió a 37°C durante 2 horas mediante las enzimas de restricción NcoI y XhoI.

2. Se purificó el fragmento digerido del gel mediante el kit de extracción de gel Montage (Millipore).

40 3. Se clonó el ADN purificado en los vectores pET21d en el sitio de NcoI/XhoI en 50 microlitros de disolución de reacción. Se ligaron el vector y el inserto durante la noche mediante 11 U de la enzima ligasa.

4. Se precipitó el plásmido con 2,5 vol. de etanol, se resuspendió y se usó para la electroporación (Bio-Rad) en la

## ES 2 433 467 T3

cepa BL21 de *E. coli* según las instrucciones del proveedor.

5. Se cultivaron los clones en medio LB y se comprobó la inserción del gen FNBPA en el vector mediante digestión con NcoI/XhoI, seguido por electroforesis en gel.

5 6. Se transformó el vector apropiado en la cepa BL21 de *E. coli* de nuevo, se hizo crecer 20 veces en 30 ml de cultivo en paralelo en medio LB. Se indujeron las células con IPTG 1 mM a DO600=1.

B. Clonación de la versión corta con cola de 6-His en el extremo C-terminal

Se clonó la versión corta con los siguientes cebadores. Los sitios de escisión de la enzima de restricción NcoI y la enzima de restricción XhoI se indican mediante letras en negrita.

BGF

10 CGGGATCCATGGAAGGTGGCCAAAATAGCGGTAACCACT

(el cebador comienza en la pos. 2570270 DE >[ref|NC002951.2|](#) *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* COL, longitud de genoma completo=2809422)

BGR

GAGCTCGAGAGGTGTTGTATCTTCTTCAATCGTTTGTG

15 (el cebador comienza en la pos. 2569875 DE >[ref|NC002951.2|](#) *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* COL, longitud de genoma completo=2809422 )

Se clonaron los productos de PCR preparados con estos cebadores en el vector pET21d y se expresaron en células BL21 (DE3) Star. Un codón para la etiqueta de 6-His, seguido por un codón de terminación, está situado detrás del sitio de escisión XhoI del vector pET21d. Como consecuencia, la proteína expresada contendrá una etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal.

20 Se llevó a cabo la expresión durante 8 horas tras la inducción y se purificó el producto expresado sobre una columna de Ni-NTA y se visualizó en gel de SDS-PAGE. La expresión era clara en comparación con el cultivo no inducido.

Se preparó una mayor cantidad de proteína tal como sigue.

Producción de FNBP con la cepa FNBP(AB)BL21 (DE3) Star

25 Cultivo:

Medio: Cuatro litros de LB + glucosa 2 g/l + Amp 100 ug/ml, a 37°C hasta DO 1,5, reducir la temp. hasta 30°C, inducción con IPTG 1 mM a DO 2-2,5 durante 5 horas

Posteriormente:

Sedimentar el cultivo mediante centrifugación.

30 Resuspender en tampón: Tris 10 mM, pH8, NaCl 150 mM.

Sedimentar mediante centrifugación, resuspender en 40 ml de Tris 25 mM pH8.

Sonicar 10x30 s con pausa de 1 min. entremedias.

Añadir PMFS para una concentración final de 5 mM.

Sedimentar con 20000 g. durante 25 min. Guardar el sobrenadante.

35 Resuspender el sedimento en 40 ml de Tris 25 mM pH8.

Sonicar como anteriormente.

Añadir PMFS para una concentración final de 5 mM.

Mezclar el sobrenadante con el sobrenadante anterior. Volumen total de aproximadamente 90 ml.

40 Aplicar el sobrenadante sobre una columna de Ni-NTA agarosa de 10 ml (con capacidad de unión de 5-10 mg proteína/ml de gel) equilibrada con tampón de sonicación (Tris 25 mM pH8).

Lavar con 1 volumen de tampón de sonicación.



Ejemplo 2

## Introducción

Staphylococcus aureus (SA) es un patógeno para la mayoría de las especies de mamíferos provocando infecciones agudas y crónicas en heridas incluyendo las provocadas por tratamientos quirúrgicos, en las glándulas mamarias o en el hombre también infecciones nosocomiales. SA a menudo es resistente a antibióticos y la alternativa sería una vacuna al menos para uso profiláctico pero, hasta la fecha, no hay ninguna vacuna eficaz aunque se han hecho muchos intentos para formular vacunas incluyendo células completas, toxinas, polisacáridos y factores de adhesión. Para tener éxito con una formulación de vacuna contra un patógeno con la propensión para causar infecciones crónicas, es esencial la ayuda de un sistema de adyuvante cuando se usan antígenos que no se replican. Por tanto, el fallo de los diversos componentes de SA que son de interés y se someten a prueba como antígenos de vacuna incluyendo factores de adhesión, hidratos de carbono (polisacáridos) y toxinas podría ser debido a la falta de un adyuvante apropiado que sea aceptable para la especie implicada. En este ejemplo, se ha elegido un factor de adhesión, es decir, proteína de unión a fibronectina (FnBp), que se considera que bloquea la adhesión pero probablemente de manera más importante es una diana para la fagocitosis si se generan anticuerpos adecuados (anticuerpos opsonizantes) frente a FnBp que promueve esta actividad. Además, se ha complementado la FnBp con diversas formulaciones de adyuvante basadas en la tecnología iscom incluyendo las que son aceptables para especies sensibles.

Por tanto, especies animales diferentes requieren formulaciones de adyuvantes diferentes incluyendo saponinas diferentes. Las especies bovinas responden por ejemplo muy bien a una saponina semipurificada de los tipos QuilA o Q-WAC, que puede ser tóxica para otras especies. Otras especies animales, por ejemplo gato o ratones o el hombre, son sensibles en diversos grados y requieren una formulación prácticamente no tóxica como por ejemplo formulaciones de QMIX (QV-MIX solicitud de patente sueca: 0202110-3 - QV - MIX PCT / SE 03 / 001180) o QWT (QWT solicitud de patente sueca: 0301998-1 PCT / SE 03 / 00586), o una fracción de formulación de C-matriz (ref). Esta última se usa en medicina veterinaria y en pruebas clínicas para el hombre. El objetivo es una respuesta inmunitaria equilibrada que promueva anticuerpos neutralizantes así como una clase de anticuerpos que promuevan la fagocitosis, es decir, en la especie murina IgG2a, mientras que IgG1 es probable que promueva efectos de adhesión y neutralización. En este ejemplo se analizan estas propiedades inmunológicas.

Debe indicarse que SA es un patógeno importante para la mayoría si no todas las especies de mamífero y que los resultados de una vacuna contra la mastitis han tenido que ver con enfermedades provocadas por SA en otras especies incluyendo el hombre.

La composición de antígenos de vacuna puede variar en vacunas contra infecciones por SA y enfermedad provocada por SA dependiendo de varios factores incluyendo cepas locales, cuadros clínicos. La adhesión a fibronectina media en un importante factor para el proceso de infección, y esta proteína está presente en prácticamente todos los aislados de SA. El bloqueo de la adhesión y neutralización es un efecto de IgG1 mediante anticuerpos, mientras que IgG2a es importante para la fagocitosis, el mecanismo protector inmunitario principal contra SA. Las subclases mencionadas reflejan el sistema de inmunoglobulinas murinas, mientras que por ejemplo IgG2a corresponde a IgG3 en el ser humano. La respuesta inmunitaria en ratones frente al candidato a vacuna fuerte FnBp con adyuvante de la formulación de matriz QWT se analiza en este sentido con el equilibrio entre las clases de inmunoglobulinas IgG reflejando las respuestas de células T auxiliares 1 y 2.

## Diseño experimental

Se inmunizaron ratones Balb/c hembra de 18 g tal como se indica en la tabla 1:1. Se determinó que la dosis de antígeno era inmunogénica a partir de experimentos anteriores. Se seleccionó una dosis baja, que no inducía respuestas altas, con el fin de observar la influencia del adyuvante añadido. Se inmunizaron los ratones con cualquiera de las formulaciones de adyuvantes de FnBp con una separación de 4 semanas por vía subcutánea (s.c.) en la raíz de la cola. Se tomaron muestras de sangre para pruebas de suero en las semanas 3 y 6. Todos los animales recibieron 1 µg de FnBp y el componente adyuvante estaba en el mismo; gr. 1 sin adyuvante, gr. 2 Al(OH)<sub>3</sub>; gr. 3 6 µg de matriz-Q; gr. 4 2 µg de matrix-Q. Se muestran en las figuras 1:1 las respuestas de anticuerpos específicos de antígenos en las subclases IgG1 e IgG2 en la semana 6. Se midieron los niveles de anticuerpos en ELISA y se expresaron como la dilución (10log) a la DO 450 que es la parte empinada de la curva de dilución leyendo en el eje Y (figura 1:1).

50 Resultados

Tras la primera inmunización, la FnBp sin adyuvante y con adyuvante de hidróxido de aluminio apenas indujo respuesta de anticuerpos séricos detectable. Las diversas formulaciones de FnBp con adyuvante de cualquiera de las formulaciones con adyuvante iscom indujeron respuestas detectables frente a FnBp.

Tras la segunda inmunización (figura 1:1), la respuesta de IgG1 era alta (>10log 4) en grupos de ratones de ratones inmunizados con FnBp con adyuvante de matriz iscom. En grupos de ratones a los que se les administraron matriz-Q alta o matrizMIX había poca diseminación de títulos entre ratones individuales mientras que era alta en el grupo en el que se les administró a los ratones FnBp en la formulación de matrizC. Los ratones inmunizados con FnBp con



adyuvante de hidróxido de aluminio respondieron con niveles de anticuerpos séricos de IgG1 significativamente inferiores que otras formulaciones de FnBp con adyuvante y con mayor diseminación de títulos de ELISA entre los animales individuales. Los ratones inmunizados con la formulación sin adyuvante respondieron con una respuesta de IgG1 baja.

5 Tras la segunda inmunización (figura 1:1), la respuesta de IgG2a era alta ( $>10\log 4$ ) en grupos de ratones de ratones inmunizados con FnBp con adyuvante de matriz iscom. En grupos de ratones a los que se les administraron matriz-Q alta o matrizMIX había poca diseminación de títulos entre ratones individuales mientras que la diseminación era alta en el grupo en el que se les administró a los ratones FnBp en la formulación de matrizC. Los ratones  
10 inmunizados con FnBp sin adyuvante o FnBp con adyuvante de hidróxido de aluminio respondieron con niveles de anticuerpos séricos de IgG2a apenas detectables.

#### Discusión

Se muestra claramente que las formulaciones de iscom tienen la capacidad para modular una respuesta inmunitaria equilibrada que incluye los tipos tanto TH1 como TH2 de respuestas inmunitarias, lo que es esencial para inducir  
15 protección contra infecciones crónicas y persistentes. Hasta la fecha las formulaciones de adyuvante usadas en vacunas contra SA han carecido de esta capacidad.

#### Conclusión

Dos formulaciones interesantes para SA y FnBp son la matrizQ adecuada para los animales grandes como los bovinos y la matrizC y matrizA Low-Tox en diferentes partículas prácticamente libres de efectos secundarios y adecuadas por ejemplo para gatos y seres humanos. Estas dos formulaciones indujeron respuestas de IgG1 e IgG2  
20 altas y equilibradas.

#### Ejemplo 3

##### Introducción

Una vacuna contra SA puede incluir o incluso requerir diversos componentes de vacunas incluyendo células completas, toxinas, polisacáridos y factores de adhesión, contribuyendo cada uno a la protección inmunitaria. En el  
25 presente ejemplo se somete a prueba toxoide tetánico (TT) con las diferentes formulaciones de adyuvante como en el ejemplo 2 para explorar su efecto de potenciación inmunitaria sobre una toxina.

##### Diseño experimental

Se inmunizaron ratones Balb/c hembra de 18 g tal como se indica en la tabla 2:1. Se determinó que la dosis de antígeno era inmunogénica a partir de experimentos previos pero no inducía respuestas muy altas con el fin de  
30 observar la influencia del adyuvante añadido. Se inmunizaron los ratones con cualquiera de las formulaciones de adyuvante TT con una separación de 4 semanas por vía subcutánea (s.c.) en la raíz de la cola. Se tomaron muestras de sangre para las pruebas de suero en las semanas 3 y 6. Todos los animales recibieron 0,5 Lf/dosis y el componente adyuvante estaba en el mismo; gr. 1 sin adyuvante, gr. 2 Al(OH)<sub>3</sub>; gr. 3 6 µg de matriz-Q; gr. 4 2 µg de matriz-Q. Se muestran en las figuras 2:1 las respuestas de anticuerpos específicos de antígenos en las subclases  
35 IgG1 e IgG2 en la semana 6. Se midieron los niveles de anticuerpos en ELISA y se expresaron como la dilución (10log) a la DO 450 que era la parte empinada la curva de dilución leyendo en el eje Y (figura 2:1).

#### Resultados

Tras la primera inmunización, el TT sin adyuvante y con adyuvante de hidróxido de aluminio indujo una respuesta de anticuerpos séricos detectable como las diversas formulaciones de TT con adyuvante de cualquiera de las  
40 formulaciones iscom.

Tras la segunda inmunización (figura 2:1), la respuesta de IgG1 era alta ( $>10\log 4$ ) en todos los grupos de ratones incluyendo TT sin adyuvante. Se observaron niveles de anticuerpos contra TT ligeramente superiores en grupos de ratones a los que se les administraron TT con adyuvante de las formulaciones de matriz iscom y había poca  
45 diseminación de títulos entre ratones individuales.

Tras la segunda inmunización (figura 2:1), la respuesta de IgG2a era alta ( $>10\log 5$ ) en grupos de ratones de ratones inmunizados con TT con adyuvante de matriz iscom. Los ratones en los grupos a los que se les administraron TT con adyuvante de matriz-Q o de matriz MIX respondieron con los niveles de IgG2a más altos y había poca  
50 diseminación de títulos entre los ratones individuales. Los ratones inmunizados con TT sin adyuvante o con TT con adyuvante de hidróxido de aluminio respondieron sin niveles de anticuerpos séricos de IgG2a o apenas detectables.

#### Discusión

TT tiene una fuerte capacidad antigénica hacia un tipo de respuesta Th2. El hidróxido de aluminio también modula hacia el tipo de respuesta inmunitaria Th2. Este ejemplo muestra que las formulaciones iscom superan el fuerte efecto inmunomodulador de TT y pueden inducir una respuesta Th1-Th2 equilibrada frente a esta toxina. Es

importante que una vacuna contra un patógeno que induce una infección crónica o persistente anule la capacidad intrínseca de este patógeno para modular la respuesta inmunitaria en el huésped, lo que el adyuvante débil no puede hacer.

#### Conclusión

- 5 Este ejemplo muestra que las formulaciones iscom tienen la capacidad para modular la respuesta inmunitaria de "antígenos de toxinas fuertes" para dar una respuesta inmunitaria equilibrada, lo que puede requerirse para lograr protección inmunitaria. Las toxinas son factores de patogenicidad importantes para SA así como para otros patógenos y por tanto pueden requerirse para obtener una vacuna potente.

#### Ejemplo 4

- 10 SA produce varias toxinas algunas de las cuales son fuertemente inmunogénicas, comparativamente otras son débilmente inmunogénicas. Cualquiera de esas puede requerirse como antígenos de vacuna para obtener una vacuna que tenga una capacidad protectora muy amplia. El toxoide diftérico (DT) es un antígeno relativamente débil en contraposición a TT. En este ejemplo, se somete a prueba un antígeno débil con las diferentes formulaciones de adyuvante como en el ejemplo 2 y 3 para explorar su efecto de potenciación inmunitaria sobre un tipo de toxina DT.

#### 15 Diseño experimental

- Se inmunizaron ratones Balb/c hembra de 18 g tal como se indica en la tabla 3:1. Se determinó que la dosis de antígeno era inmunogénica a partir de experimentos anteriores pero no inducía respuestas muy altas con el fin de observar la influencia del adyuvante añadido. Se inmunizaron los ratones con cualquiera de las formulaciones de adyuvantes de DT con una separación de 4 semanas por vía subcutánea (s.c.) en la raíz de la cola. Se tomaron muestras de sangre para pruebas de suero en las semanas 3 y 6. Todos los animales recibieron 1 µg de DT y el componente adyuvante estaba en el mismo; gr. 1 sin adyuvante, gr. 2 Al(OH)<sub>3</sub>; gr. 3 6 µg de matriz-Q; gr. 4 2 µg de matriz-Q. Se muestra en las figuras 3:1 las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno en las subclases IgG1 e IgG2 en la semana 6. Se midieron los niveles de anticuerpos en ELISA y se expresaron como la dilución (10log) a la DO 450 que era la parte empinada de la curva de dilución leyendo sobre el eje Y (figura 3:1).

#### 25 Resultados

Tras la primera inmunización, sólo los ratones inmunizados con el DT con adyuvante de formulación de matriz-MIX respondieron con respuesta de anticuerpos séricos detectables.

Tras la segunda inmunización (figura 3:1), la respuesta de IgG1 era la más alta (> 10log 3,5) en ratones inmunizados con DT con adyuvante de hidróxido de aluminio y matriz mezclados.

- 30 Tras la segunda inmunización (figura 3:1), la respuesta de IgG2a era alta (aproximadamente 10log 4) en ratones en el grupo inmunizado con DT con adyuvante de matriz MIX respondieron con los niveles de anticuerpos más altos, es decir, títulos casi 50 veces superiores o más que ratones en otros grupos y la diseminación de los títulos era inferior. Los ratones inmunizados con DT sin adyuvante o con DT con adyuvante de hidróxido de aluminio respondieron sin niveles de anticuerpos séricos de IgG2a o apenas detectables.

#### 35 Discusión

- DT es un antígeno más débil que TT (ejemplo 3) y DT sin adyuvante no indujo incluso tras dos inmunizaciones IgG1 o IgG2 detectable, es decir ni un tipo de respuesta Th2 ni un tipo Th1. El hidróxido de aluminio que modula hacia el tipo de respuesta inmunitaria Th2 potenció la respuesta de DT a niveles fácilmente detectables de IgG1. Este ejemplo muestra que las formulaciones iscom potencian y también modulan la respuesta inmunitaria frente a DT dando una respuesta equilibrada entre Th1 y 2. Particularmente, la matriz-MIX "low-tox" era eficaz para la estimulación de tanto IgG1 como IgG2, es decir, una respuesta inmunitaria potente y equilibrada. Por tanto, las formulaciones iscom pueden modular eficazmente respuestas inmunitarias para antígenos tanto fuertes como débiles.

#### Conclusión

- 45 Los ejemplos 2 y 3 muestran que las formulaciones iscom potencian y modulan eficazmente las respuestas inmunitarias de toxinas independientemente de si son antígenos débiles y fuertes y dirigen por ejemplo un antígeno de toxina sesgado hacia Th2 hacia una respuesta Th1 - Th2 equilibrada. Tal capacidad es importante en un sistema complejo de antígenos que puede constituir una formulación de antígenos de SA.

#### Ejemplo 5

- 50 Experimento de inmunización de ensayo de campo a pequeña escala con factor de adhesión FnBp de *Staphylococcus Aureus* con adyuvante de matriz iscom

El experimento de vacunación en Kungsängen (KÄ), una granja perteneciente a la Universidad de Agricultura de

5 Uppsala, se llevó a cabo para someter a prueba una posible vacuna contra *Staphylococcus aureus* (SA) en un huésped natural, es decir, la especie bovina. La mastitis es un grave problema en el ganado lechero y también en las especies relacionadas oveja y cabras cuando se usan éstas para la producción de leche. El problema de la mastitis se reconoce bien por cualquiera con experiencia en la producción y ciencia lecheras incluyendo el producto en la granja lechera, el veterinario responsable de la salud animal y la fábrica que produce diferentes productos lácteos que requieren leche de alta calidad.

10 Para controlar la situación de mastitis, una ganadería de granja mejorada es la primera alternativa complementada con el tratamiento principalmente mediante el uso de antibióticos. SA es el patógeno más importante para la ubre provocando sufrimiento y problemas económicos. Particularmente, es problemático que SA es a menudo resistente a antibióticos, y los animales afectados tienen que eliminarse selectivamente puesto que no hay tratamiento. La alternativa para el tratamiento de la mastitis con antibióticos son productos profilácticos inmunitarios, es decir, el uso de una vacuna. A pesar de muchos intentos, ninguna vacuna contra la mastitis eficaz está en el mercado. Los intentos de desarrollar una vacuna de SA contra la mastitis han sido en vano y ese ha sido también el caso con intentos por desarrollar vacunas de SA para otras especies en otras situaciones, por ejemplo contra furunculosis en perros o contra infecciones nosocomiales en seres humanos. Por tanto, una vacuna eficaz contra mastitis por SA rescataría a los animales afectados del sufrimiento y tiene efectos económicos extremadamente buenos para las granjas lecheras, para la industria láctea y para sus clientes.

20 Se eligió un factor de adhesión, proteína de unión a fibronectina (FnBp), porque está presente en casi el 100% de aislados de SA. En experimentos anteriores (Nelson *et al.* 1991), se incorporó la FnBp en iscom. Se obtuvieron resultados prometedores con esta vacuna experimental contra la mastitis por SA. A la inversa, experimentos continuados no proporcionaron el desenlace deseado y se interrumpió el proyecto. Los motivos de este fracaso fueron una inmunidad de corta duración y probablemente también respuestas inmunitarias insuficientes en la glándula mamaria.

25 El objetivo de este experimento de vacunación era explorar la posibilidad de desarrollar adicionalmente la vacuna frente a FnBp con adyuvante de una formulación basada en la tecnología iscom. Un foco era un modo de administración óptimo para generar respuestas inmunitarias tanto de manera sistémica, medidas en suero sanguíneo, como localmente en la glándula mamaria. Por tanto, para obtener un mejor pronóstico del potencial del candidato a vacuna, también se llevaron a cabo análisis inmunológicos sobre la secreción local (suero lácteo) a partir de la ubre. La evaluación de las respuestas inmunitarias incluyó las respuestas de anticuerpos en suero y suero lácteo incluyendo IgG1, IgG2 e IgA y también considera la potenciación por anticuerpos de la fagocitosis de células de SA. IgG2 promueve la fagocitosis, que es el mecanismo de defensa más importante contra SA. Los anticuerpos de IgA producidos localmente son también un factor de defensa importante contra invasores en superficies mucosas. Debe indicarse que los experimentos previos no han analizado las respuestas inmunitarias en la glándula mamaria lo más probablemente debido a que la vacuna previa no inducía respuestas inmunitarias claramente detectables en el suero lácteo que apoyasen convincentemente el ensayo. Se ha pensado que la dilución de altos volúmenes de leche escondería la respuesta inmunitaria generada en la glándula mamaria.

#### El diseño del ensayo de vacuna y materiales y métodos

40 La proteína de unión a fibronectina (FnBp) de fragmento de 16 kD de una proteína más grande incluye la región DD responsable de la adhesión a fibronectina. Se expresó el polipéptido en *E. coli* y se obtuvo de Biostapro AB. Difiere del producto previo (Nelson *et al.* 1991) que se basaba en una proteína de 69 a 80 kD más corta. Además, en el producto previo, la FnBp se incorporó en la matriz iscom para formar un iscom. En la presente vacuna experimental, la preparación de la vacuna no abarcó una etapa para incluir la FnBp en una matriz para formar un iscom. Evitar la incorporación proporciona la ventaja de un sistema de producción más sencillo y más económico. Por tanto, la presente formulación difiere en dos aspectos del candidato a vacuna iscom de FnBp sometido a prueba previo.

45 Se suministró la matriz iscom por Isconova AB.

Se realizaron los exámenes bacteriológicos de muestras de leche en el laboratorio de mastitis en el *National Veterinary Institute (SVA)*.

#### Rendimiento experimental

50 Se seleccionó el antígeno FnBp, un producto de ADNr producido en *E. coli*, debido a la experiencia positiva previa (Nelson *et al.*), pero el constructo era más corto. La evaluación inmunológica se facilita de manera óptima con un antígeno definido.

Se utilizaron diez novillas que entraban en su primera lactancia como animales experimentales para evitar en lo posible experiencia previa con infecciones por SA, más probable en vacas más viejas, lo que provocaría dificultades para la evaluación inmunológica de la vacunación.

55 Se sometieron a prueba tres modos de administración diferentes. Puesto que la ubre es un órgano con una gran área mucosa, se consideró que la inmunidad mucosa en la glándula mamaria es importante. En contraposición a, por ejemplo, el hombre y el cerdo, no hay ningún vínculo intestino-mamas en los bovinos (comunicación personal de

- Holmberg), es decir, la administración oral de antígenos de vacuna (es decir, en el tracto digestivo) generará respuesta inmunitaria en la glándula mamaria en el cerdo pero no en vacas. En este experimento, se emplearon dos modos mucosos de administraciones, es decir, la dosis primaria se administró mediante la vía intranasal (i.n.) o mediante la vía intravaginal (i. vag.). Se comparó el efecto de estos modos de sensibilización con la sensibilización mediante una inmunización s.c. en la región supramamaria. Se administró la segunda dosis a todos los animales mediante la vía s.c. de tres a cuatro semanas más tarde. Con este régimen de inmunización, se pretendía explorar si existe un vínculo entre la región respiratoria superior o el tracto genital y la glándula mamaria. Importante para la protección inmunitaria es la respuesta inmunitaria mucosa (local) y que se genere el tipo adecuado de clase de anticuerpo en la glándula mamaria.
- El protocolo de inmunización incluyó una inmunización primaria de dos a cuatro semanas antes del parto. Se sensibilizaron tres animales mediante administración i.n., tres animales mediante el modo de administración i. vag. y se inmunizaron cuatro animales mediante la vía s.c. en la región supramamaria. Se realizó la segunda inmunización para todos los animales tras el parto mediante el modo s.c. en la región supramamaria en la que están ubicados los ganglios linfáticos que drenan la glándula mamaria.
- Toma de muestras. Se recogió sangre para obtener suero y para análisis inmunológicos en el momento de la primera inmunización y luego regularmente comenzando tal como se indica en las figuras (4:1 a 4:2). La recogida de leche para análisis bacteriológicos e inmunológicos del suero comenzó tras el parto y luego tal como se describe para la sangre.
- Se llevaron a cabo análisis bacteriológicos en SVA y sólo en una ocasión se aisló SA de una muestra de leche de un animal sensibilizado mediante la vía i.n. Fue justo antes de la segunda inmunización.
- Los análisis inmunológicos incluyeron la medición de las respuestas de anticuerpos en ELISA (véase anteriormente). Se muestran los resultados en detalle en las figuras 4:1 a 4:4.
- Fagocitosis
- Se llevó a cabo el aislamiento y purificación de leucocitos de sangre bovina mediante el método de centrifugación en Ficoll tal como se describe por Guidry *et al* 1993 J Dairy Sci 76:1285-1289 y Lee *et al* 2005 Can J Vet Res 69:11-18. Se resuspendieron las células en disolución básica de Hanks (HBSS), se comprobó su viabilidad y se ajustó la concentración a  $10 \times 10^6$  células/ml. Se cultivó en primer lugar la cepa seleccionada de *S. aureus* sobre placas de agar y posteriormente se hizo crecer en caldo de tripticasa-soja (TSB) (mín. 100 ml) en 37°C durante 18 h. Se destruyeron las bacterias mediante incubación durante 30 min. a 60°C en baño de agua. Tras 3 lavados con solución salina, se ajustó la suspensión bacteriana en dilución 1:10 a una densidad óptica de 2,0 a 540 nm.
- Se llevó a cabo el marcaje con FITC de las bacterias tal como se describe por Lee *et al* 2005 Can J Vet Res 69:11-18. Se lavaron las bacterias marcadas con FITC 3 veces en solución salina tamponada con Veronal con calcio 0,15 mM, magnesio 1 mM y gelatina al 0,1% (GVBS), se determinó que la concentración a una dilución 1:10 era de DO 1,350 a 540 nm y finalmente se mantuvo en GVBS en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta su uso.
- Fagocitosis; se descongelaron las bacterias marcadas con FITC y se sonicaron durante 30 s a 2,4 A y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^9$ /ml. Se incubaron 50 µl de los sueros de prueba recogidos antes y después de dos inmunizaciones no diluidos o diluidos en HBSS con la suspensión bacteriana y las células tal como se describe por Lee *et al* 2005 Can J Vet Res 69:11-18. Los controles incluían una suspensión bacteriana incubada en HBSS y una suspensión bacteriana incubada con la suspensión de células sin suero. Se realizó la incubación durante 30 min. a 37°C bajo agitación cuidadosa. Se detuvo la fagocitosis añadiendo solución salina enfriada con hielo con EDTA al 0,02%. Antes de leer en el microscopio, se trataron las células con azul de metileno al 1% para extinguir la fluorescencia extracelular. Se llevó a cabo la lectura en microscopio de fluorescencia sobre un mínimo de 200 células y se determinó la proporción de células con bacterias.
- Resultados
- Los animales sensibilizados mediante la vía i. vag. (figura 4:1) mostraron una baja respuesta de anticuerpos séricos o ninguna. En suero lácteo, se registraron anticuerpos frente a FnBp tras la primera inmunización dominados por las subclases IgG2 e IgA. No se recogieron muestras de leche tras el refuerzo, puesto que no hay producción de leche antes del parto. Tras el refuerzo por vía s.c., las respuestas de anticuerpos frente a FnBp en suero y leche eran de corta duración y estaban dominadas por IgG2 e IgA.
- No se detectaron o no se detectaron prácticamente respuestas en suero sanguíneo de animales sensibilizados mediante la vía i.n. (figura 4:2). Se registraron principalmente anticuerpos contra FnBp en suero lácteo en las subclases IgG2 e IgA. Todos los animales a los que se les administró la inmunización primaria mediante el modo i.n respondieron. Tras el refuerzo por vía s.c., los animales respondieron con elevaciones de anticuerpos bien definidas en suero y en suero lácteo. Las respuestas más altas eran en las clases IgG2 e IgA. Los niveles de anticuerpos disminuyeron hacia el final del periodo experimental.
- Los animales sensibilizados y reforzados mediante el modo de administración s.c. obtuvieron IgG1 y niveles incluso

superiores de IgG2 y también IgA alta en suero y suero lácteo (figura 4:3). Tras el refuerzo, altos niveles de IgG1 y niveles incluso superiores de IgG2 y también alta IgA en suero y suero lácteo, lo que indica la calidad de la inmunidad protectora localmente en la ubre y circulante en la sangre. De manera importante, los anticuerpos séricos duraron durante todo el periodo experimental, es decir, de 7 a 10 meses. También los niveles de anticuerpos de suero lácteo duraron el periodo experimental, es decir, hasta 8 meses, lo que indica que la vacunación experimental cubrirá el periodo de lactancia completo, lo que es importante para una vacuna contra la mastitis prospectiva.

Se midió la fagocitosis en suero de una vaca en el grupo inmunizado dos veces mediante la vía s.c. El 30% de las células PMN mostraron fagocitosis tras la incubación durante 30 min. con bacterias y suero recogido antes de la primera inmunización. Un aumento hasta del 51% de células PMN incubadas durante 30 min. con bacterias y suero recogido tras la segunda inmunización mostraron fagocitosis. Un 4% de células PMN incubadas con bacterias y sin suero mostraron fagocitosis. Un 2% de células PMN sin tiempo de incubación con bacterias y suero recogido tras la segunda inmunización mostraron fagocitosis.

#### Discusión

La distribución de respuestas de anticuerpos en clases y subclases es de gran importancia para obtener un efecto protector inmunitario óptimo. Generalmente, los anticuerpos de IgG2 son de la mayor importancia para combatir la infección por SA puesto que esta subclase promueve la fagocitosis de las bacterias. Todos los modos de inmunización promovían anticuerpos específicos frente a FnBp de IgG2 y IgA tanto en suero lácteo como en suero sanguíneo. Las respuestas de anticuerpos eran considerablemente inferiores en suero y suero lácteo de animales que se sensibilizaron por vía i. vag e i.n. Inesperadamente, se indujeron altos niveles de anticuerpos mediante dos inmunizaciones s.c. tanto en suero como en secreción de glándulas mamarias con FnBp con adyuvante de matriz iscom incluyendo las subclases IgG1, IgG2 e IgA. No se habían mostrado antes respuestas inmunitarias de estas magnitudes y calidad en la glándula mamaria bovina con vacunas frente a SA o cualquier otra vacuna. Además, se registraron estas subclases de Ig en suero sanguíneo. El modo de administración s.c. inducía una respuesta inmunitaria de larga duración y superior que la vacuna experimental sometida a prueba anteriormente (figura 4D), que era de corta duración (Nelson *et al.* 1991). De particular interés y valor es la potente respuesta inmunitaria en la glándula mamaria, que no se describió con candidatos a vacuna sometidos a prueba previos contra SA. El resultado de la prueba de fagocitosis funcional subraya las propiedades protectoras inmunitarias importantes que se generan. El potente efecto de potenciación inmunitaria de la matriz iscom no se esperaba y facilita una producción de vacunas eficaz evitando la etapa de conjugación de los polipéptidos de FnBp a la matriz iscom.

Hay dos proteínas de unión a fibronectina FnBpA y FnBpB que están organizadas de manera similar. El constructo usado por Nelson *et al* consistía en una proteína de 60-65 kD conjugada con dos dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica para formar la proteína de fusión zzFnBpA conteniendo otra parte los presuntos epítopos de células T para formar zz-FnBpA-T y una zz-FnBpB, que contiene un presunto epítopo de células T. Se conjugaron estos polipéptidos con iscom (Lövgren, K., Lindmark, J., Pipkorn, R. y Morein, B (1987) J. Immunol. Methods 98. Se han usado estos polipéptidos y se encontró que se fragmentan. Se consideró que un motivo de la limitación del constructo de Nelson estaba provocado por la tendencia a esta fragmentación. El presente fragmento de FnBp de 16 kD es más estable y contiene las repeticiones de la región DD importante que facilita la unión a fibronectina.

#### Conclusión

Un constructo de FnBp truncado complementado con una formulación de matriz iscom induce tras dos inmunizaciones por vía s.c. altos niveles de respuestas inmunitarias de alta calidad en la glándula mamaria y el suero. Hay fuertes criterios inmunológicos de que la vacuna prospectiva inducirá protección inmunitaria contra la infección por SA en la glándula mamaria bovina. Esta tecnología permite un sistema de producción eficaz que es de importancia para una vacuna prospectiva.

#### Ejemplo 6

El efecto de la célula de SA completa y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  sobre las respuestas inmunitarias frente a FnBp y las toxinas

SA provoca infecciones crónicas y persistentes, lo que se facilita mediante las propiedades intrínsecas del patógeno basadas en la capacidad para "esconder" componentes esenciales para la infección y supervivencia para el sistema inmunitario del huésped. Además, patógenos que provocan infecciones persistentes y crónicas tienen la capacidad para guiar las reacciones inmunitarias del huésped para permitir su persistencia. SA alberga varios componentes diferentes de propiedades reguladoras inmunitarias y una composición errónea puede provocar respuestas inmunitarias bajas frente a uno o todos los antígenos incluidos en la composición de vacuna. Tal como se describió anteriormente, hay muchos componentes que son candidatos para una vacuna contra SA. La primera estrategia es usar componentes que se aíslan del patógeno o se producen como antígenos de vacuna aislados expresados por una célula, en este caso *E. coli*. El segundo enfoque es usar un adyuvante potente, en este caso la matriz iscom. Una clase prospectiva de componentes de vacuna son las toxinas. El hecho de que se identifiquen muy frecuentemente hemolisinas tanto  $\alpha$  como  $\beta$  (para la hemolisina  $\beta$  en el 100% de los casos) de SA en aislados de SA

de casos de mastitis las convierte en fuertes candidatos a vacuna. Ambas toxinas son productos excretados y pueden recogerse del fluido de cultivo en el que está haciéndose crecer SA. En este experimento, se mezclaron las células de SA y el fluido de cultivo que contiene las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  con FnBp en una composición de vacuna tal como se diseña en materiales y métodos para explorar la inmunogenicidad de FnBp y las toxinas en esta composición.

5

#### Materiales y métodos

Diseño experimental. Se inmunizaron veinticinco terneros estacionados en Öveds Kloster en el sur de Suecia con una edad de 4 a 7 meses tres veces con intervalos de 4 semanas según el programa de inmunización a continuación.

10 Se produjeron y se suministraron amablemente bacterias de SA y el fluido de cultivo que contenía las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  por el Karolinska Institutet MTC, sección de bacteriología encabezado por el profesor Roland Möllby.

Se llevaron a cabo las inmunizaciones por vía s.c. preescapular en el lado del cuello con 200  $\mu$ g de FnBp o la mezcla de FnBp y 10 exp 8/dosis de células de *Staphylococcus aureus* y 50  $\mu$ g cada una de las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  tal como se describe en la tabla a continuación. Se adyuvaron todas las formulaciones de vacuna con 1 mg de matriz iscom por dosis. El volumen de dosis fue de 2 ml.

15

#### ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

A/	FnBp	FnBp	FnBp	5
B/	SA	FnBp	FnBp	5
C/	SA	SA	SA	5
D/	SA+Fn	SA+Fn	SA+Fn	5
E/	PBS	PBS	PBS	5

#### Prueba contra grupos de animales

FnBp y toxinas
FnBp y toxinas
FnBp y toxinas
FnBp y toxinas
FnBp y toxinas

Fn: FnBp, S: células de *Staphylococcus aureus* y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , PBS: disolución tamponada con fosfato

Las terceras inmunizaciones se realizan para obtener información adicional sobre la consecución del techo de la respuesta inmunitaria, e información sobre una posible supresión tras inmunizaciones repetidas.

20 Se llevó a cabo la evaluación de las respuestas de anticuerpos frente a FnBp en suero mediante ELISA tal como se describió anteriormente. Se necesita saber si SA como célula completa + toxinas tienen un efecto dominante sobre FnBp, es decir, inhiben la respuesta inmunitaria contra FnBp.

Se llevaron a cabo pruebas de neutralización contra las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  en el Karolinska Institutet MTC sección de bacteriología encabezada por el profesor Roland Möllby.

#### Resultados

25 Los terneros en este ejemplo tienen menos de un año de edad y no respondieron o respondieron con títulos de anticuerpos muy bajos a FnBp complementada con células de SA y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ .

Se presenta la respuesta inmunitaria frente a FnBp mediante ELISA del grupo 1 en la figura 5:1. Tras la primera inmunización, sólo los animales en el grupo 1 inmunizados con FnBp sólo y con adyuvante de matriz iscom respondieron con anticuerpos tanto de IgM como IgG.

30 Tras los primeros aumentos bien definidos de la IgM, se registraron respuestas de IgG1 e IgG2 en los animales vacunados con FnBp sola. Ningún animal sensibilizado con una composición que contenía FnBp y las células de *Staphylococcus aureus* y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  mostró respuesta inmunitaria frente a FnBp (no mostrado).

Tras la tercera inmunización deben realizarse pruebas.

35 Se midió la respuesta inmunitaria a hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  en una prueba funcional, es decir, pruebas de neutralización de toxinas. Los resultados se muestran en la figura 5:2. Tras la primera inmunización, se registró una baja respuesta de IgG en animales en grupos de vacunas que contenían células de SA y toxinas, es decir, B, C y D. Los niveles de anticuerpos disminuyeron en el momento de la segunda inmunización. Tras la segunda inmunización, los animales que han recibido dos dosis de toxinas respondieron con altos títulos de neutralización, es decir, los animales en los grupos C y D.

40 Discusión

Este experimento muestra que una mezcla de células de *Staphylococcus aureus* y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  suprime la respuesta inmunitaria a FnBp. En contraposición, todos los animales respondieron con altos anticuerpos neutralizantes contra las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ . No está claro si las toxinas u otros productos en fluido de cultivo o las células completas o la combinación de ambos provocan la regulación por disminución. Los animales en este

experimento tenían menos de un año de edad. En un experimento posterior, los animales tenían más de un año hasta dos años y estos animales, que recibieron FnBp complementada o bien con células de SA o bien las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , respondieron con altos títulos de anticuerpos a FnBp (véase el ejemplo 7).

5 La supresión observada en este experimento parece basarse en una respuesta inmunitaria activa, es decir, con memoria, puesto que los animales en el grupo B no responden a la segunda dosis.

10 En contraposición, las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  indujeron fuertes respuestas inmunitarias en todas las combinaciones de antígenos de vacuna sometidas a prueba, lo que sugiere que la combinación de toxinas y FnBp es una composición de vacuna compatible y viable. El posible uso de células de SA completas en una composición de vacuna necesita investigación adicional. Los resultados del ejemplo 7 indican que terneros o vacas más viejos podrían no reaccionar con una supresión a un antígeno de vacuna cuando se incluyen células de SA o las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  en la formulación de vacuna.

#### Conclusión

15 Experimentos previos han mostrado que FnBp con adyuvante de matriz iscom es altamente inmunogénica en la especie bovina, lo que se confirma en este ejemplo. En el presente ejemplo, la respuesta inmunitaria frente a FnBp se regula por disminución cuando se complementa FnBp tanto con células de SA como con hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Puede concluirse a partir del ejemplo 7 que una composición de vacuna que combina FnBp y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  es altamente inmunogénica y también lo es una combinación de vacuna FnBp-células de SA, cuando la respuesta de anticuerpos se mide contra FnBp. Puede concebirse que, ganado de más de un año de edad, no reacciona con la supresión observada en animales más jóvenes inmunizados con FnBp complementada con células de SA en combinación con las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ .

#### Ejemplo 7

25 En el ejemplo 6, se ha observado que una mezcla de hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  y células de SA completas en una vacuna experimental regulaba por disminución la respuesta inmunitaria al tercer componente, es decir, FnBp. Puesto que se incluían tanto hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  como células de SA completas, no está claro si unas o las otras o la combinación de tanto toxinas como células eran responsables del efecto de supresión. En este ejemplo, se investigan adicionalmente los efectos supresores, respectivamente los efectos compatibles o de potenciación combinando FnBp con o bien las toxinas o bien las células de SA completas. Para ese fin, se estableció un experimento tal como se describe en materiales y métodos. Todas las vacunas experimentales se adyuvan con matriz iscom.

#### Materiales y métodos

30 Diseño experimental. Se inmunizaron 15 terneros, estacionados en la granja Mosta al este de Uppsala en Suecia, con una edad de 1 a 2 años, dos veces con intervalos de 6 semanas según el programa de inmunización a continuación.

Se produjeron y se suministraron amablemente bacterias de SA y el fluido de cultivo que contenía las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  por el Karolinska Institutet MTC, sección de bacteriología encabezado por el profesor Roland Möllby.

35 Se llevaron a cabo las inmunizaciones por vía s.c. preescapular en el lado del cuello con 200  $\mu$ g de FnBp o la mezcla de FnBp y 10 exp 8/dosis de células de *Staphylococcus aureus* o la mezcla de FnBp con 50  $\mu$ g cada una de las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  tal como se describe en la tabla a continuación. Se adyuvan todas las formulaciones de vacuna con 1 mg de matriz iscom por dosis. El volumen de dosis fue de 2 ml.

PROGRAMA DE INMUNIZACIÓN				Pruebas contra grupos de animales
A/	FnBp	FnBp	5	FnBp y toxinas
B/	SA+Fn	SA+Fn	5	FnBp y toxinas
C/	Tox+Fn	Tox+Fn	5	FnBp y toxinas
D/	PBS	PBS	5	FnBp y toxinas

40 Fn: FnBp, SA: *Staphylococcus aureus*, Tox: las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , PBS: disolución tamponada con fosfato

#### Resultados

Se presenta la respuesta inmunitaria frente a FnBp medida mediante ELISA en la figura 6:1. Tres semanas tras la primera inmunización, todos los animales respondieron con títulos de anticuerpos comparativamente altos contra FnBp incluyendo todas las clases de inmunoglobulinas sometidas a prueba, es decir, IgM, IgG1 e IgG2.

45 Con una respuesta inmunitaria primera de este tipo, toda la experiencia acumulada indica que tras la segunda inmunización se producirá un aumento sustancial de la respuesta de la subclase de IgG. Los datos de la segunda inmunización están pendientes.

Discusión

5 Este experimento muestra que una mezcla de células de *Staphylococcus aureus* y las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  por separado no suprimen la respuesta inmunitaria a FnBp. En el ejemplo 6 se mostró claramente que el componente de toxina u otros productos en el fluido de cultivo y las células completas en combinación regulaban por disminución la respuesta inmunitaria en todas las clases de inmunoglobulinas sometidas a prueba. La supresión demostrada en el ejemplo 6 parecía basarse en una respuesta inmunitaria activa que incluía células de memoria inmunitaria.

10 En el ejemplo 6, se mostró también que las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  inducían fuertes respuestas inmunitarias en todas las combinaciones de antígenos de vacuna, lo que sugiere que la combinación de toxinas y FnBp es una composición de vacuna compatible y viable. Los resultados de este ejemplo muestran que el uso de células de SA completas en una composición de vacuna es posible siempre que se identifique(n) el/los factor(es) que provoca(n) la supresión en la composición de antígenos de vacuna sometida a prueba en algunos grupos en el ejemplo 6 y se excluya(n) de la vacuna prospectiva que contiene células completas. Debe indicarse que la respuesta de anticuerpos a FnBp complementada tanto con células de SA como con hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  es baja, lo que indica una supresión de la respuesta inmunitaria a FnBp. Debe indicarse que los terneros en el ejemplo 6 tienen menos de un año de edad, mientras que los animales en este ejemplo 7 eran más viejos, es decir, de 1 a 2 años. Los animales más jóvenes podrían tener todavía un sistema inmunitario no completamente desarrollado o anticuerpos maternos no reflejados por anticuerpos frente a FnBp.

20 En varias de las formulaciones, las vacunas experimentales con adyuvante de matriz iscom han incluido FnBp y toxinas (véanse los ejemplos 3 y 4). En modelos de ratón, se generaron respuestas inmunitarias muy potentes frente a tanto FnBp como a las toxinas incluidas. Por tanto, los resultados acumulados muestran fuertemente que se inducen respuestas inmunitarias fuertes mediante formulaciones de vacunas prospectivas que incluyen un factor de adhesión y otros componentes con adyuvante de formulaciones de iscom.

Conclusión

25 Se indujeron altos niveles de anticuerpos en animales en la edad de entrar en lactancia contra FnBp cuando se mezclaron o bien con toxinas o bien con células bacterianas de SA completas. Por tanto, es viable una vacuna contra SA basada en varios componentes de antígenos.

Tabla 1:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con proteína de unión a fibronectina (FnBp). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los candidatos a vacuna respectivos.

Grupo	Antígeno	Adyuvante	N.º de animales
1	FnBp (2 ug/dosis)	sin adyuvante	8
2		Al(OH)3 al 1%	8
3		6 ug de matriz-Q	8
4		6 ug de matriz-C	8
5		4 ug de matriz-LowTox*	8

30 La formulación LowTox consiste en una mezcla de 0,6 ug de matriz-C + 3,4 ug de matriz-A en partículas separadas.

Tabla 2:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con toxoide tetánico (TT). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los candidatos a vacuna respectivos.

Grupo	Antígeno	Adyuvante	N.º de animales
1	TT (0,5 Lf/dosis)	sin adyuvante	8
2		Al(OH)3 al 1%	8
3		6 ug de matriz-Q	8
4		6 ug de matriz-C	8
5		4 ug de matriz-LowTox*	8

La formulación LowTox consiste en una mezcla de 0,6 ug de matriz-C + 3,4 ug de matriz-A en partículas separadas.



Tabla 3:1

Diseño de la inmunización de ratones Balb/C con toxoide diftérico (DT). Se inmunizaron los ratones dos veces por vía s.c. con una separación de cuatro semanas con los candidatos a vacuna respectivos.

1	DT (1 ug /dosis)	sin adyuvante	8
2		Al(OH) <sub>3</sub> al 1%	8
3		6 ug de matriz-Q	8
4		6 ug de matriz-C	8
5		4 ug de matriz-LowTox*	8

La formulación LowTox consiste en una mezcla de 0,6 ug de matriz-C + 3,4 ug de matriz-A en partículas separadas.

**Lista de secuencias**

- 5 <110> Isconova AB
- <120> Nueva composición
- <130> 78432-82569
- 10 <140> PCT/SE2006/000082
- <141> 20-01-2006
- <150> US 60/593.504
- 15 <151> 20-01-2005
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.2
- 20 <210> 1
- <211> 38
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Cebador directo
- <400> 1
- 30 cgggatcctg cagcatcaga acaaaagaca actacagt 38
- <210> 2
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <223> Cebador inverso
- <400> 2
- 40 gtaagcttat gctttgat tcttttatt tctgcgtaa 39
- <210> 3
- <211> 37
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 45 <220>
- <223> cebador directo
- <400> 3
- 50 cgggatccat ggcatcagaa caaaagacaa ctacagt 37
- <210> 4
- <211> 37
- <212> ADN
- 55

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
5	<400> 4	
	gagctcgagt ggcacgattg gaggtgtgt atcttct	37
10	<210> 5	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador directo	
	<400> 5	
	cgggatccat ggaaggtggc caaaatagcg gtaaccagt	39
20	<210> 6	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso	
	<400> 6	
	gagctcgaga ggtgtgtat ctcttcaat cgttgttg	39
30	<210> 7	
	<211> 141	
	<212> PRT	
	<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> FnBpA	
	<400> 7	

ES 2 433 467 T3

Met Glu Gly Gly Gln Asn Ser Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu Asp Thr  
1 5 10 15  
Glu Glu Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val Asp Ile  
20 25 30  
Asp Phe Asp Ser Val Pro Gln Ile His Gly Gln Asn Lys Gly Asn Gln  
35 40 45  
Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Glu His Gly  
50 55 60  
Gly Asn Ile Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val Pro His Ile His Gly  
65 70 75 80  
Phe Asn Lys His Thr Glu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Asn Lys Asp Lys  
85 90 95  
Pro Ser Tyr Gln Phe Gly Gly His Asn Ser Val Asp Phe Glu Glu Asp  
100 105 110  
Thr Leu Pro Lys Val Ser Gly Gln Asn Glu Gly Gln Gln Thr Ile Glu  
115 120 125  
Glu Asp Thr Thr Pro Leu Glu His His His His His His  
130 135 140

<210> 8  
<211> 141  
5 <212> PRT  
<213> *Staphylococcus aureus*

<220>  
10 <221> misc\_feature  
<223> FnBpB

<400> 8

ES 2 433 467 T3

Met Glu Gly Gly Gln Asn Ser Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu Asp Thr  
1 5 10 15

Glu Glu Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val Asp Ile  
20 25 30

Asp Phe Asp Ser Val Pro Gln Ile His Gly Gln Asn Asn Gly Asn Gln  
35 40 45

Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly  
50 55 60

Gly Asn Ile Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val Pro His Ile His Gly  
65 70 75 80

Phe Asn Lys His Thr Glu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Asn Lys Asp Lys  
85 90 95

Pro Asn Tyr Gln Phe Gly Gly His Asn Ser Val Asp Phe Glu Glu Asp  
100 105 110

Thr Leu Pro Gln Val Ser Gly His Asn Glu Gly Gln Gln Thr Ile Glu  
115 120 125

Glu Asp Thr Thr Pro Leu Glu His His His His His His  
130 135 140

<210> 9  
<211> 136  
5 <212> PRT  
<213> *Staphylococcus aureus*

<220>  
10 <221> misc\_feature  
<223> FnBpA Cys-N

<400> 9  
Met Ala Cys Glu Gly Gly Gln Asn Ser Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu  
1 5 10 15

Asp Thr Glu Glu Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val  
20 25 30

ES 2 433 467 T3

Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val Pro Gln Ile His Gly Gln Asn Lys Gly  
 35 40 45

Asn Gln Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Glu  
 50 55 60

His Gly Gly Asn Ile Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val Pro His Ile  
 65 70 75 80

His Gly Phe Asn Lys His Thr Glu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Asn Lys  
 85 90 95

Asp Lys Pro Ser Tyr Gln Phe Gly Gly His Asn Ser Val Asp Phe Glu  
 100 105 110

Glu Asp Thr Leu Pro Lys Val Ser Gly Gln Asn Glu Gly Gln Gln Thr  
 115 120 125

Ile Glu Glu Asp Thr Thr Pro Gly  
 130 135

<210> 10  
 <211> 135  
 5 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <223> FnBpA Cys-C

<400> 10  
 Met Glu Gly Gly Gln Asn Ser Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu Asp Thr  
 1 5 10 15

Glu Glu Asp Lys Pro Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val Asp Ile  
 20 25 30

Asp Phe Asp Ser Val Pro Gln Ile His Gly Gln Asn Lys Gly Asn Gln  
 35 40 45

Ser Phe Glu Glu Asp Thr Glu Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Glu His Gly  
 50 55 60

Gly Asn Ile Ile Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val Pro His Ile His Gly  
 65 70 75 80

Phe Asn Lys His Thr Glu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Asn Lys Asp Lys  
 85 90 95

Pro Ser Tyr Gln Phe Gly Gly His Asn Ser Val Asp Phe Glu Glu Asp  
 100 105 110

ES 2 433 467 T3

Thr Leu Pro Lys Val Ser Gly Gln Asn Glu Gly Gln Gln Thr Ile Glu  
115 120 125

Glu Asp Thr Thr Pro Cys Gly  
130 135

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende
  - (a) al menos una proteína de unión a fibronectina, y/o al menos una proteína de unión a fibronectina truncada y/o al menos un péptido de unión a fibronectina, que comprenden al menos un dominio de unión a fibronectina; y
  - (b) al menos un complejo de matriz iscom;

para su uso como vacuna contra mastitis en seres humanos, ganado, oveja o cabra, en donde dicha vacuna se administra por vía parenteral.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína de unión a fibronectina, la proteína truncada y/o el péptido comprende uno o más dominios de unión a fibronectina de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, o *Staphylococcus* negativo para coagulasa.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el dominio de unión a fibronectina se selecciona del grupo que consiste en los dominios D de proteína de unión a fibronectina A o B de *Staphylococcus aureus*, los dominios A de proteína de unión a fibronectina A de *Streptococcus dysgalactiae*, los dominios B de proteína de unión a fibronectina B de *Streptococcus dysgalactiae* y los dominios P de proteína de unión a fibronectina de *Streptococcus pyogenes*.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de unión a fibronectina y/o proteína de unión a fibronectina truncada y/o péptido de unión a fibronectina se mezcla con matriz iscom o se acopla sobre matriz iscom.
5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además al menos otro antígeno.
6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde los antígenos están en forma de células completas de y/o componentes antigénicos de microorganismos.
7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en donde las células completas son células de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, o *Staphylococcus* negativo para coagulasa.
8. La composición para su uso según la reivindicación 6, en donde los componentes antigénicos se eligen de componentes que no regulan por disminución el sistema inmunitario, y componentes que regulan por disminución el sistema inmunitario.
9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en donde el componente que no regula por disminución el sistema inmunitario se elige del grupo que consiste en adhesinas y factores de formación de poros.
10. La composición para su uso según la reivindicación 8, en donde el componente que regula por disminución el sistema inmunitario se elige del grupo que consiste en superantígenos, antígenos capsulares, endotoxinas, exotoxinas y enzimas extracelulares.
11. La composición para su uso según la reivindicación 9, en donde los factores de formación de poros se eligen del grupo que consiste en alfa-hemolisina, beta-hemolisina, gamma-hemolisina, delta-hemolisina, fosfolipasa C, elastasa de invasión tisular e hialuronidasa de invasión tisular.
12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el complejo de matriz iscom comprende uno o más fragmentos de glucósido de Quil A.
13. La composición para su uso según la reivindicación 12, en donde al menos dos fragmentos de glucósido de Quil A se complejan uniéndose en diferentes partícula de matriz iscom.
14. La composición para su uso según la reivindicación 12 ó 13, en donde el complejo de matriz iscom comprende el subfragmento A y/o el subfragmento C de Quil A.
15. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el complejo de matriz iscom comprende Quil A bruto.

16. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además al menos un antígeno que afecta a la glándula mamaria.
17. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende además un antibiótico, un portador farmacéuticamente aceptable, diluyentes, un excipiente o un aditivo.



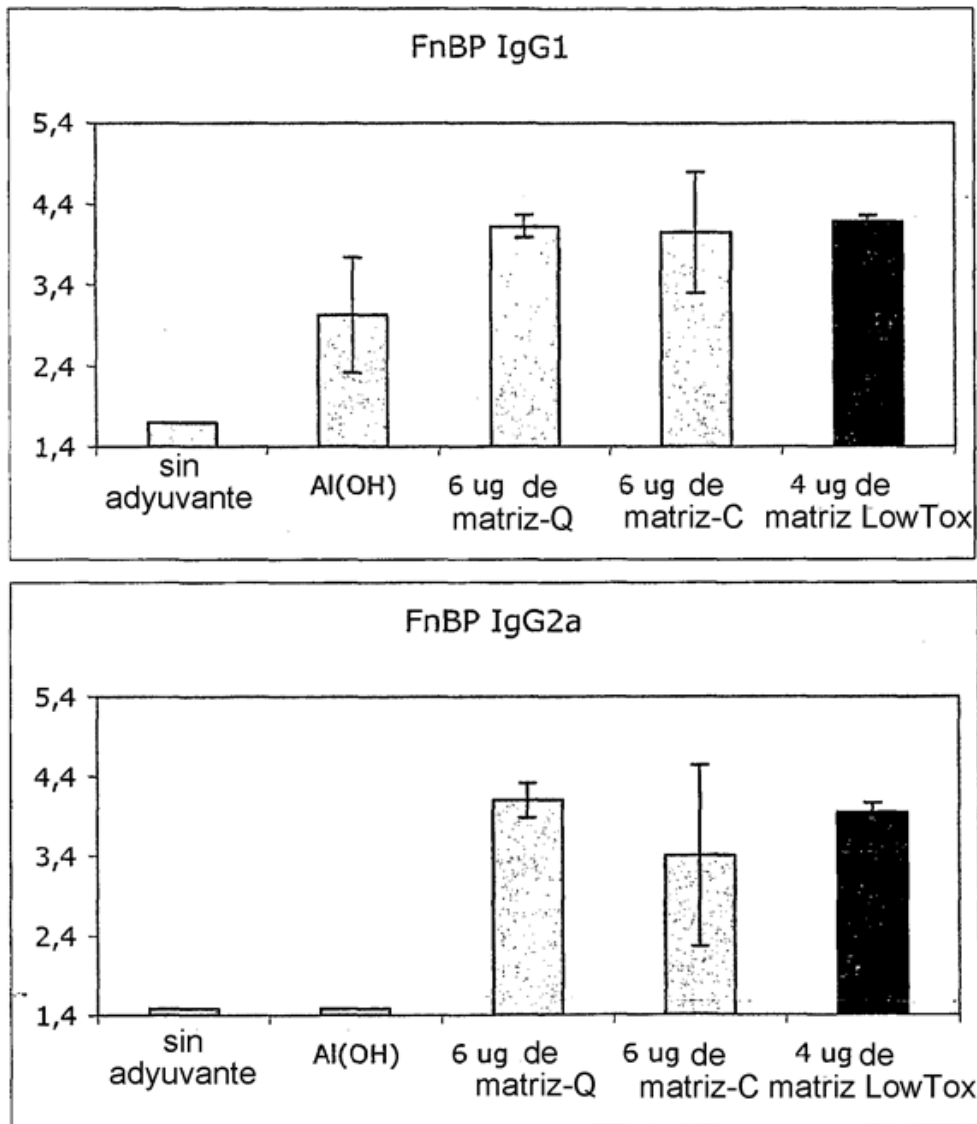


Fig 1:1  
 Respuestas de anticuerpos séricos a proteína de unión a fibronectina (FnBP) tras la segunda inmunización con FnBP en diversas formulaciones de adyuvante

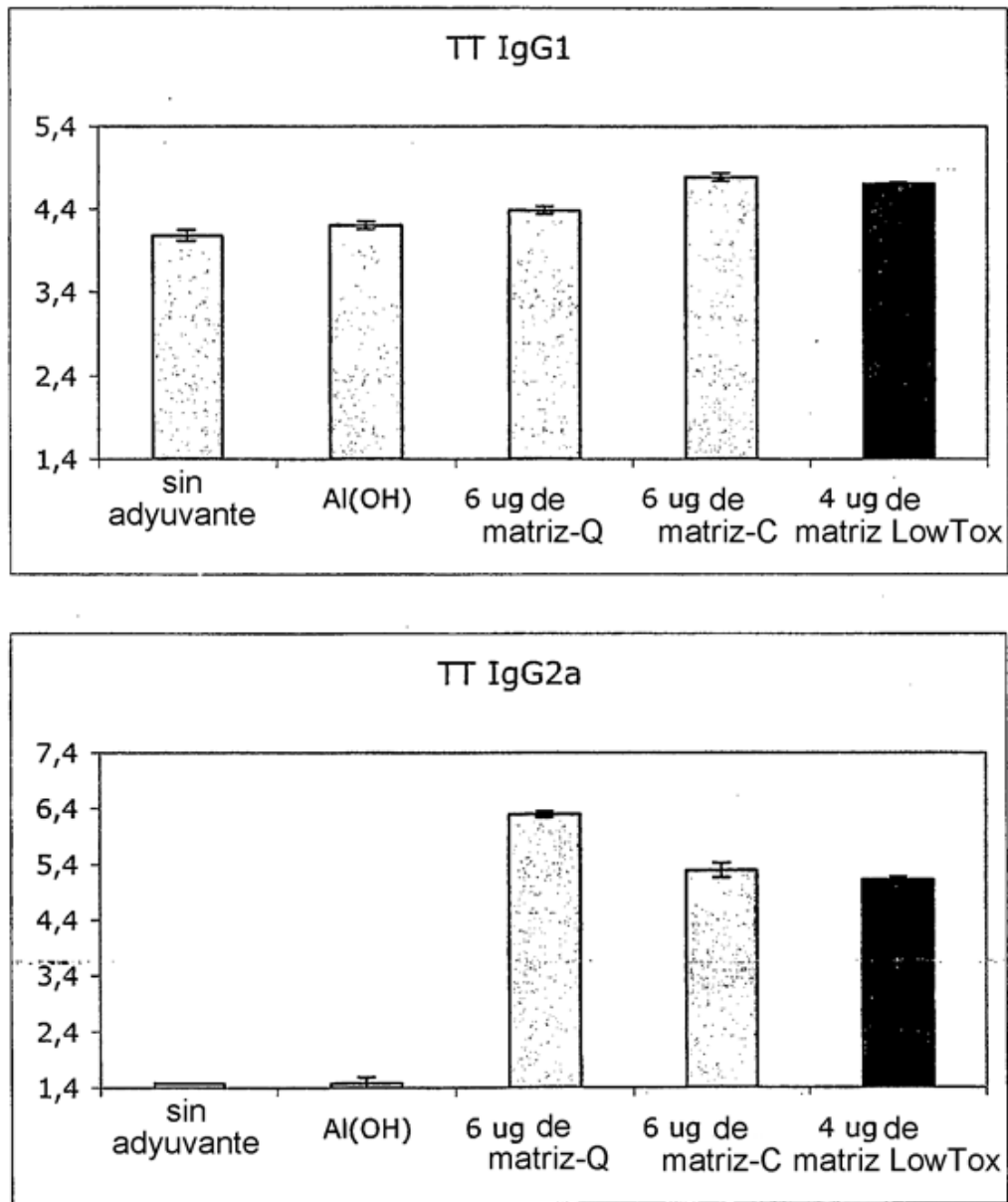


Fig 2:1  
 Respuestas de anticuerpo séricos a toxoide tetánico (TT)  
 tras la segunda inmunización con TT en diversas  
 formulaciones de adyuvante

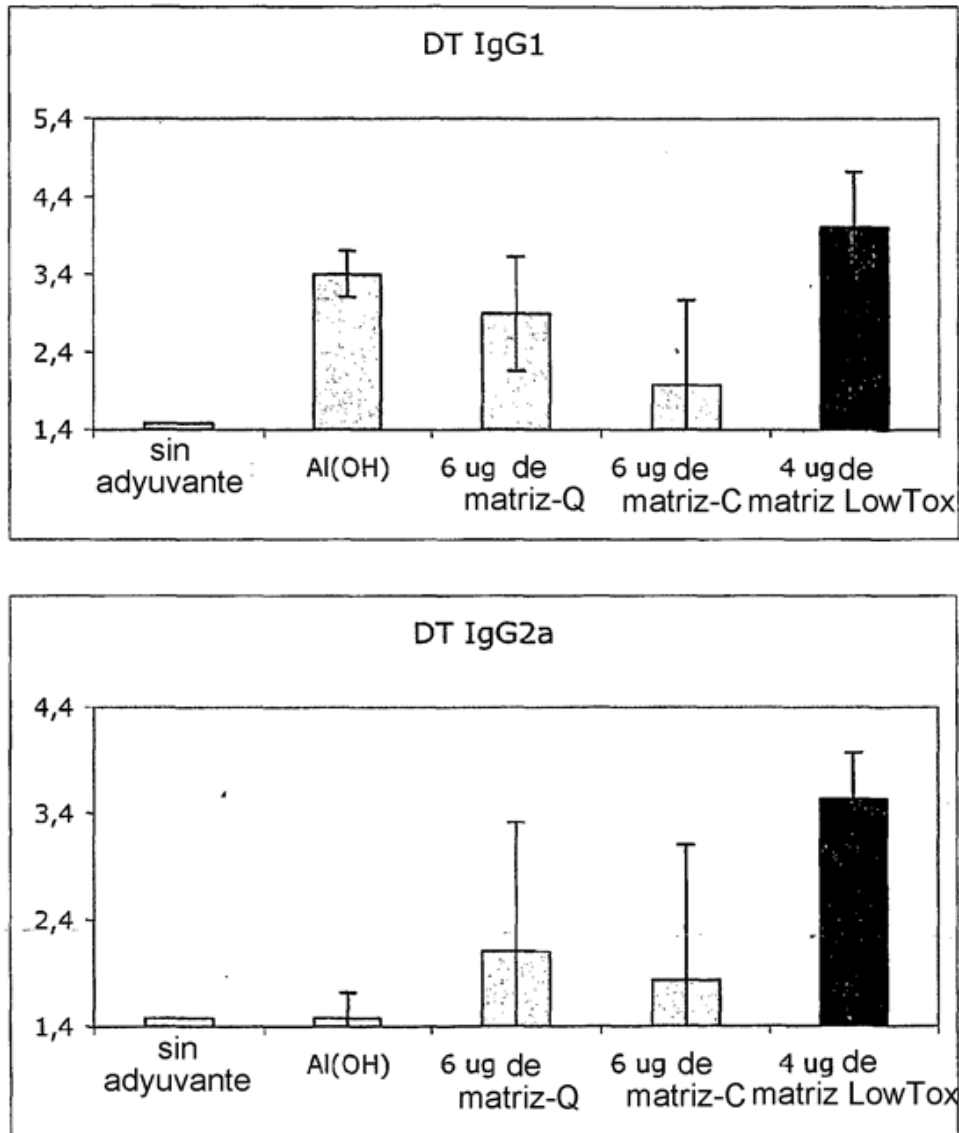
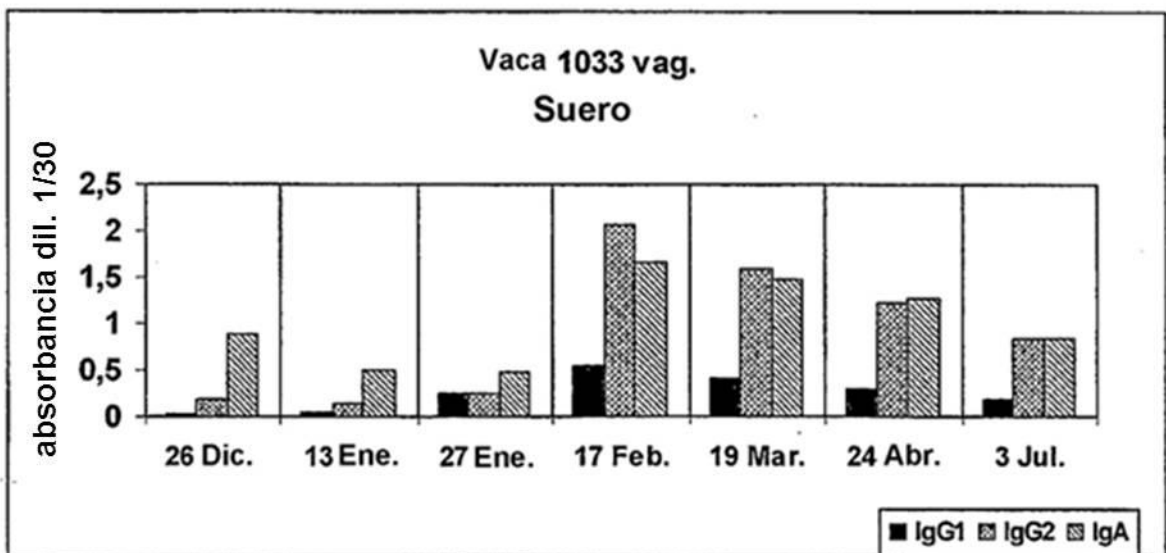
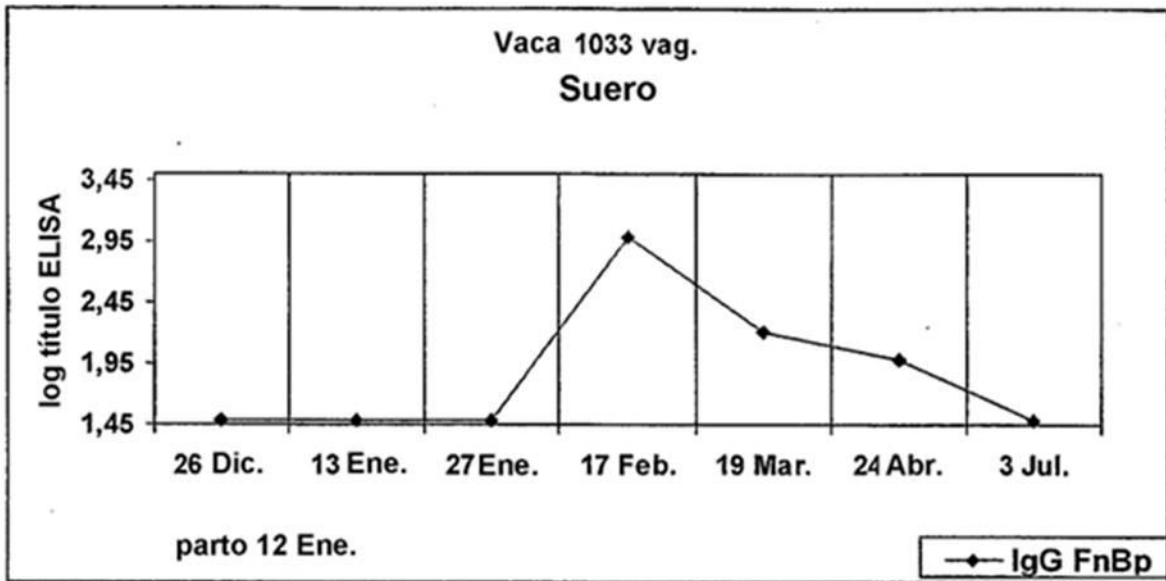


Fig 3:1  
 Respuestas de anticuerpo séricos a toxoide diftérico (DT)  
 tras la segunda inmunización con DT en diversas  
 formulaciones de adyuvante



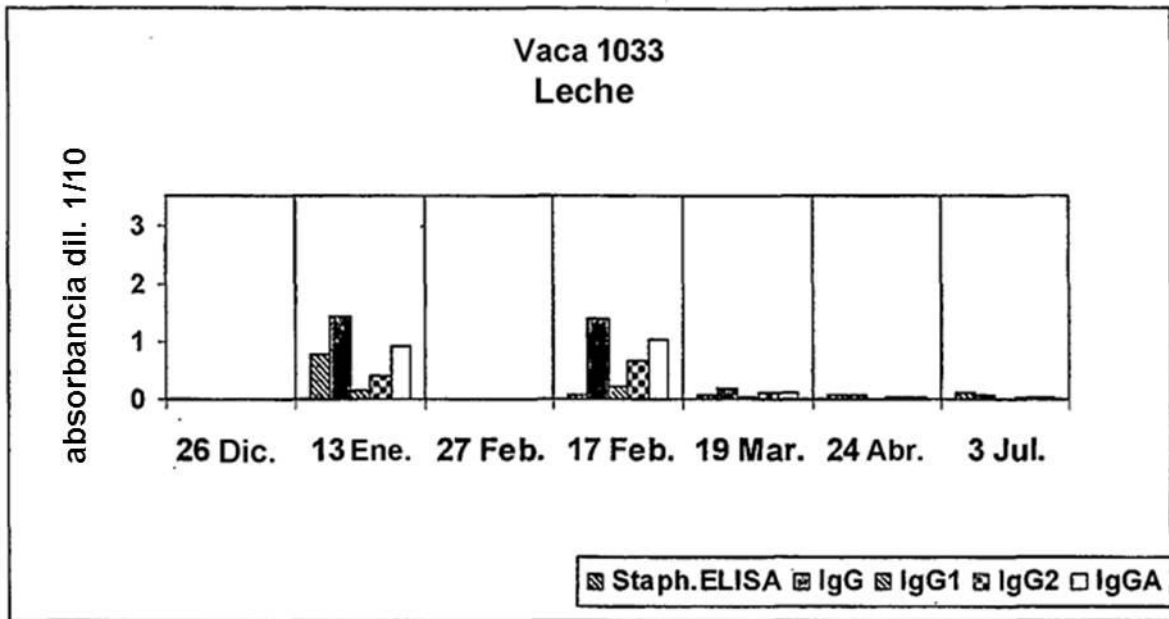
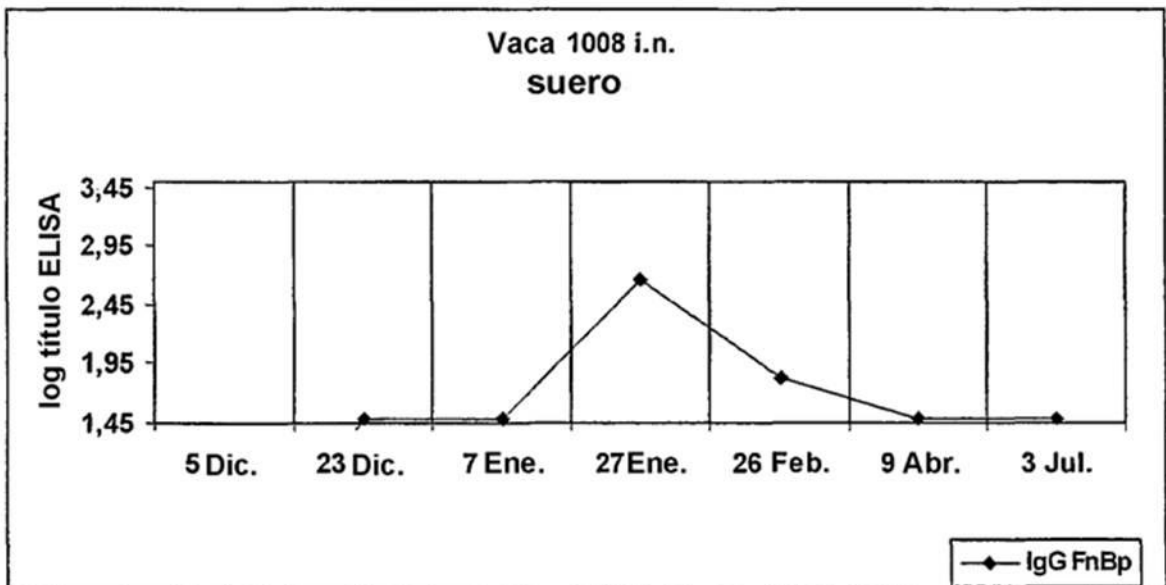


Fig 4:1



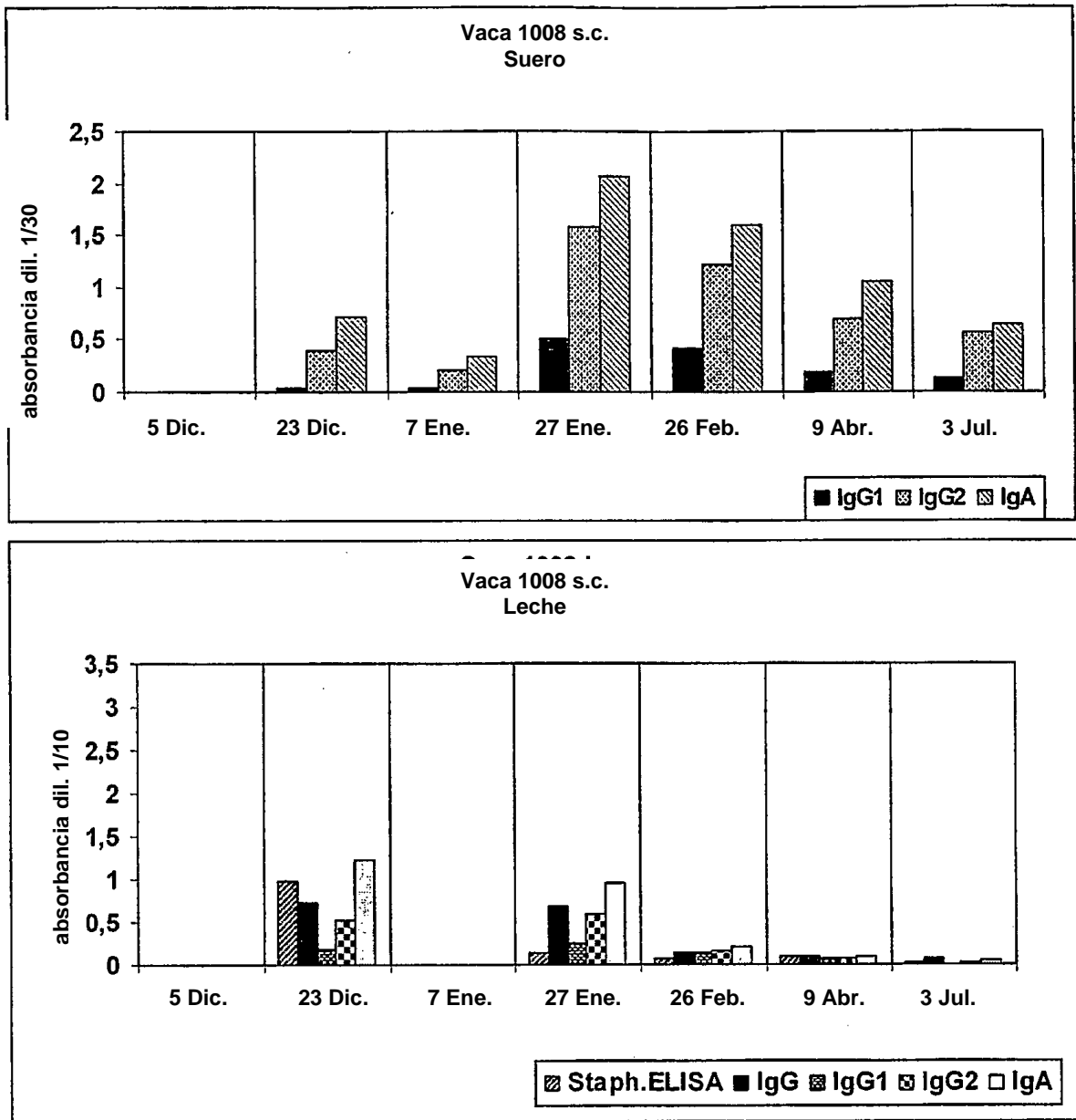


Fig 4:2

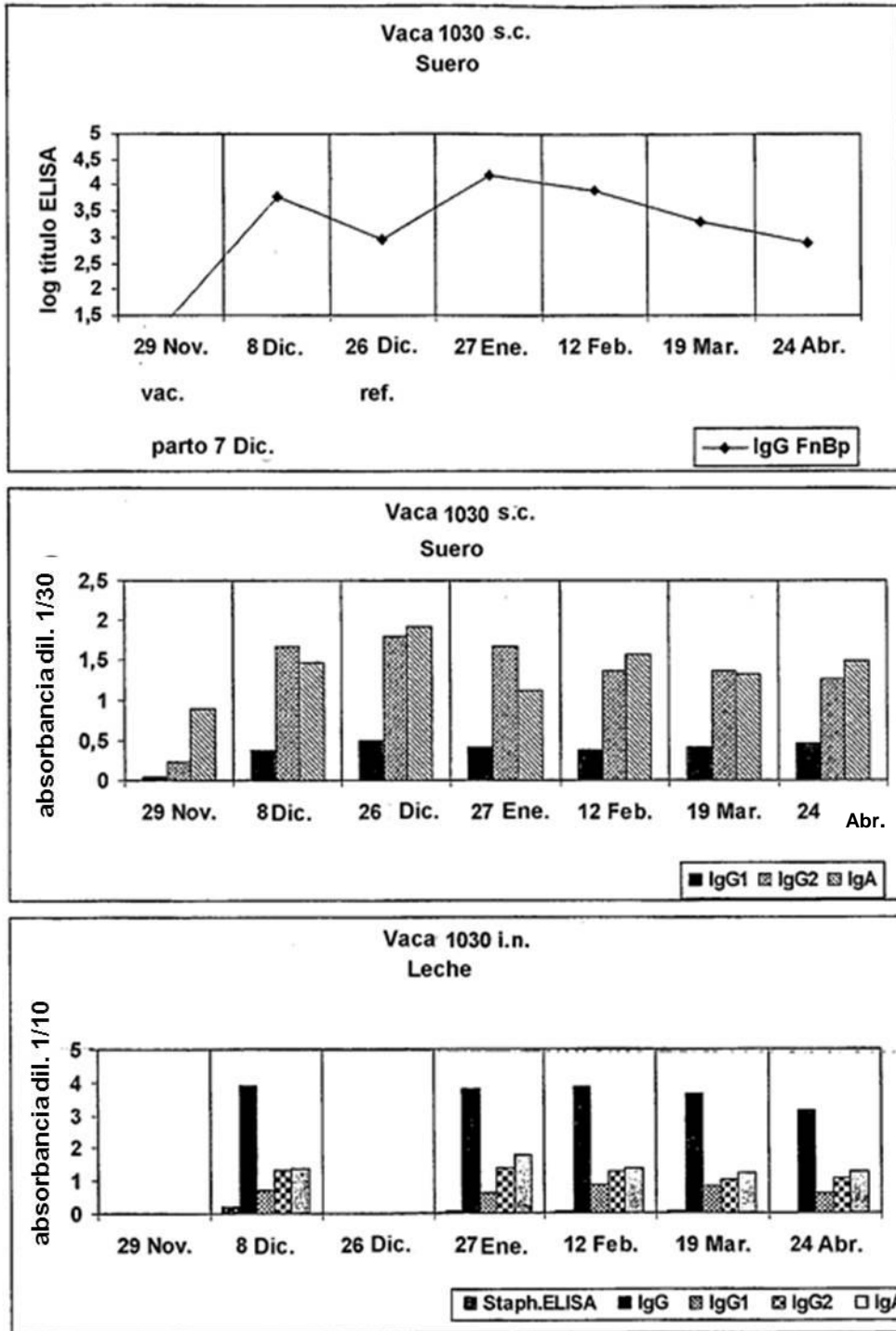


Fig 4:3

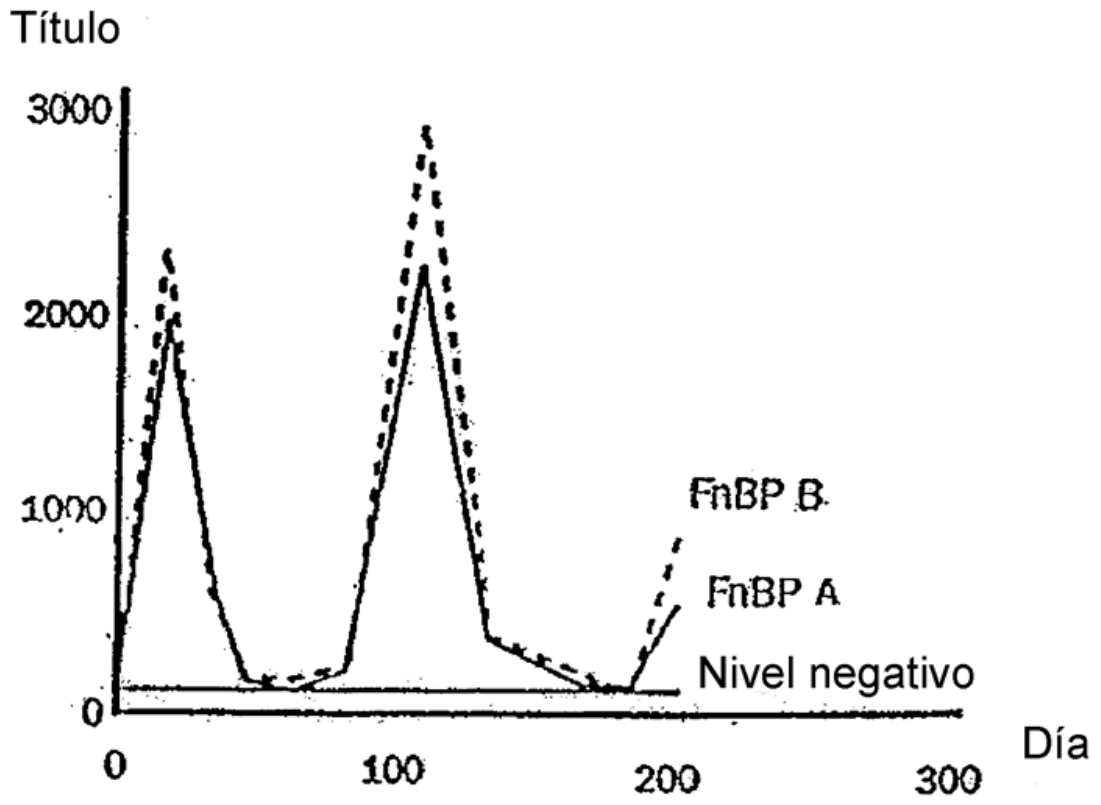


Fig 4:4



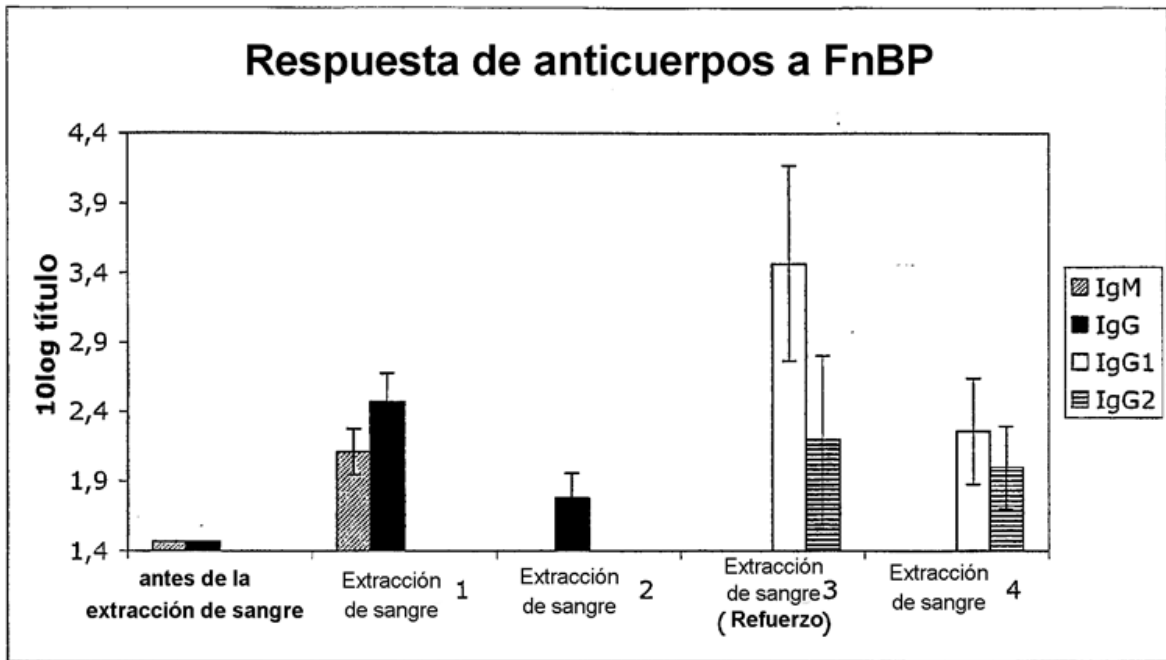
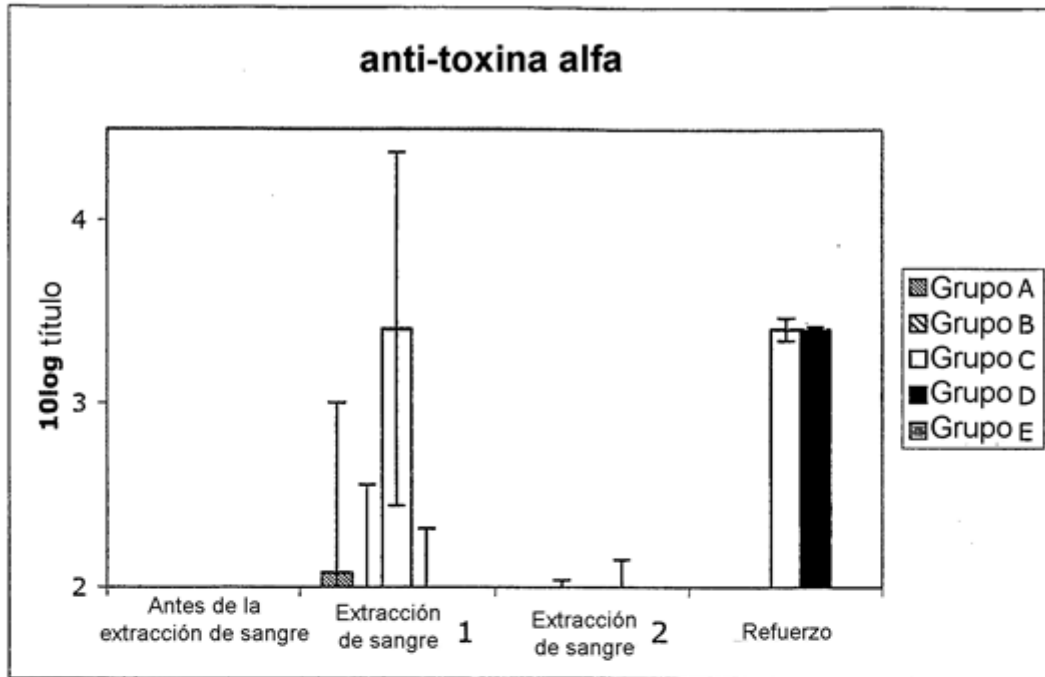


Figura 5:1

A



B

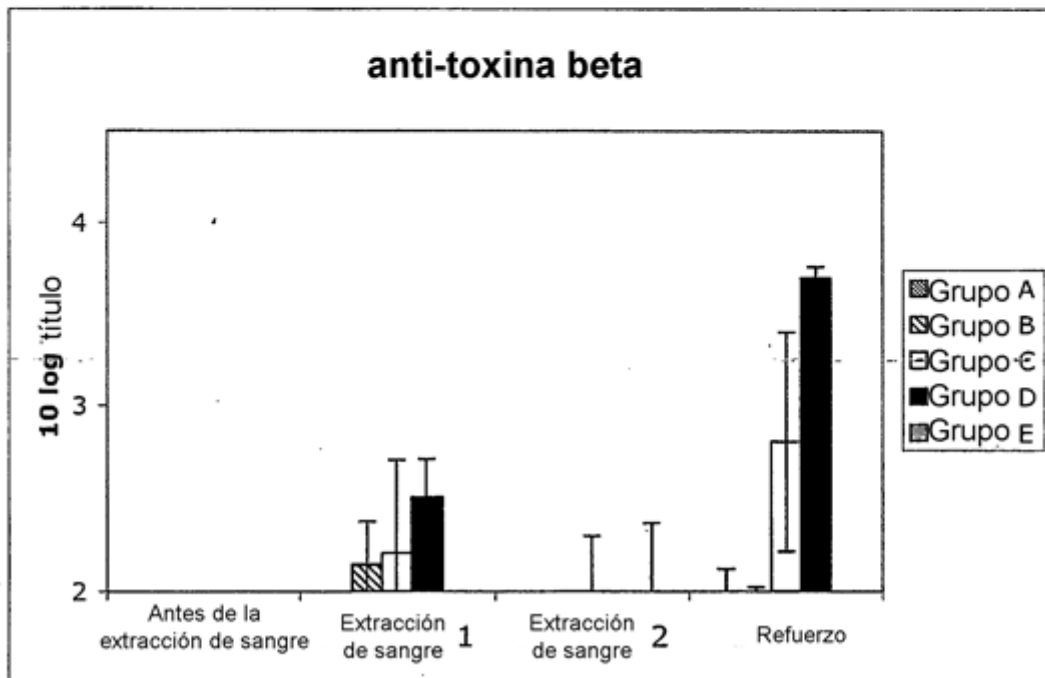
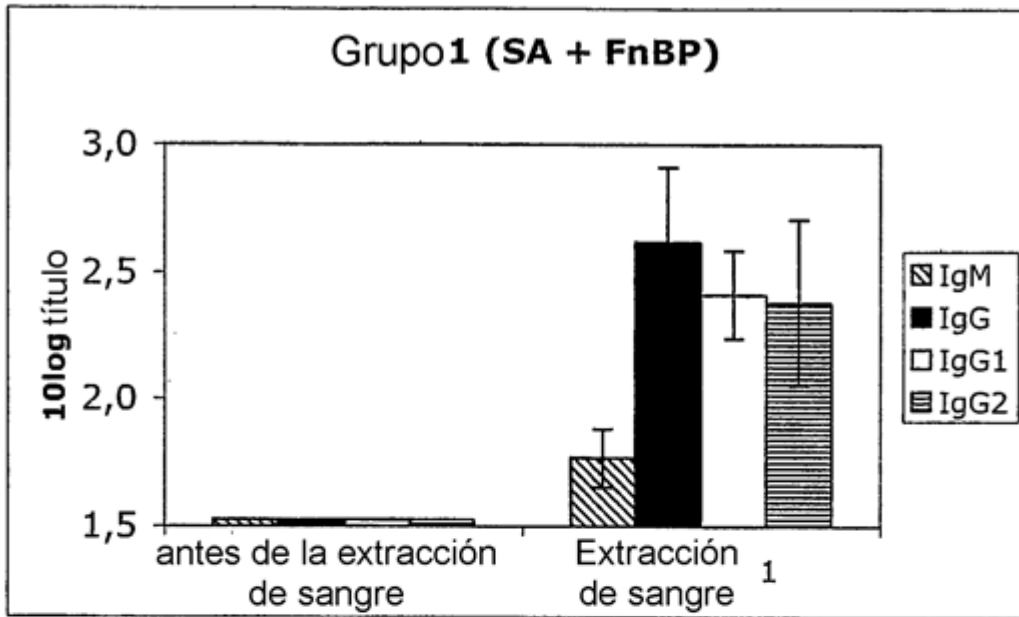


Figura 5.2

A



B

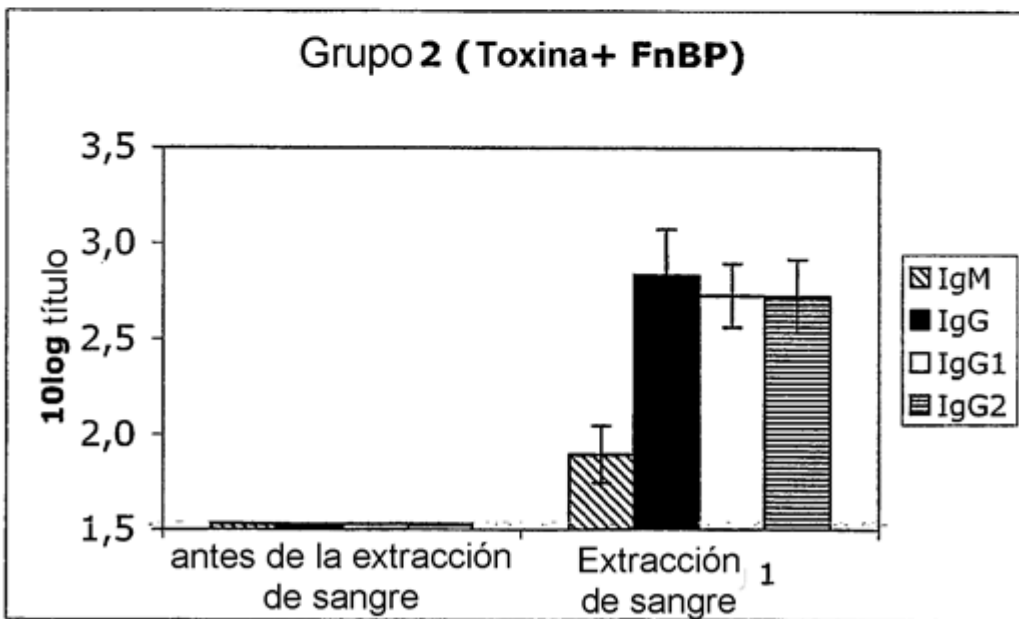


Figura 6