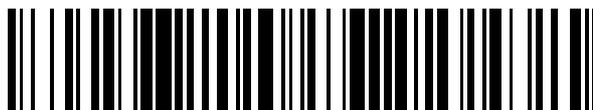


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 365**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2005 PCT/US2005/030290**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2006 WO06026373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2005 E 05792876 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1784417**

54 Título: **Polipéptidos de Fusobacterium y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**25.08.2004 US 604349 P**

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

**24.10.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 587 365 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

Polipéptidos de *Fusobacterium* y procedimientos de uso

**Datos continuos de la solicitud**

5 Esta solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de EE.UU. con número de serie 60/604.349, presentada el 25 de agosto de 2004.

**Antecedentes**

10 Las especies de *Fusobacterium* son bacterias gramnegativas, anaerobios obligados y pleomórficamente baciliformes responsables de una diversidad de infecciones necróticas en los animales y en los seres humanos (Langworth, Bacteriol. Rev., 41, 373 - 390 (1977)). *Fusobacterium necrophorum* se clasifica en dos subespecies: *F. necrophorum* subesp. *necrophorum* y *F. necrophorum* subesp. *funduliforme* y son responsables de numerosas manifestaciones clínicas en diversas especies de animales, tales como vacas, ovejas y cerdos, que incluyen; abscesos hepáticos, necrosis de las pezuñas, laminitis, dermatitis purulenta e interdigital, ectima contagioso, rinitis necrótica y laringitis necrótica.

15 En los seres humanos, *F. necrophorum* y *F. nucleatum* se consideran los más patógenos y son el agente causal de úlceras cutáneas, abscesos periamigdalinos, artritis séptica, síndrome de Lemierre, enfermedades periodontales y endocarditis. Varias de otras especies de *Fusobacterium* se han implicado como el agente etiológico de diversas enfermedades, por ejemplo, *F. ulcerans* (úlceras cutáneas), *F. russi* (infecciones por mordeduras de animales) y *F. varium* (infecciones oculares) (Smith et al., Epidemiol Infect., 110, 499 - 506 (1993)).

20 La bacteria produce varios factores de virulencia que son responsables de la patogenia del organismo, incluyendo una potente leucotoxina secretada que se ha demostrado que es específicamente tóxica para los leucocitos polimorfonucleares de los rumiantes (Tan et al., Vet. Res. Commun. 20, 113 - 140 (1996)). La importancia de la leucotoxina como un importante factor de virulencia ha sido bien documentada. Por ejemplo, algunos experimentos han indicado una correlación entre la producción de la toxina y la capacidad de *F. necrophorum* de inducir abscesos en animales de laboratorio (Coyle et al., Am. J. Vet. Res., 40, 274 - 276. (1979) y Tan et al., Am. J. Vet. Res., 55, 515 (1994)). Algunos experimentos también han demostrado que las cepas que no producen la leucotoxina son incapaces de inducir abscesos en las patas de las vacas después de una exposición. También se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes producidos por un toxoide inactivado derivados de la leucotoxina redujeron la infección y los abscesos hepáticos en las vacas vacunadas.

30 Se han usado diversas vacunas bacterianas de células completas inactivadas comerciales para controlar las infecciones necróticas en animales de granja que incorporan múltiples cepas que incluyen los serotipos más prevalentes, tales como el biotipo A (*F. necrophorum* subesp. *necrophorum*). Otra metodología en el desarrollo de vacunas ha sido la incorporación de la leucotoxina en forma de un toxoide para prevenir el efecto patológico de la toxina secretada (Saginala et al., J. Anim. Sci., 75, 11601166 (1997)). Aunque las vacunas convencionales han mostrado un cierto grado de eficacia en la prevención de la colonización y de la infección por *F. necrophorum*, todavía se carece de una protección adecuada para las vacas.

40 Los iones metálicos divalentes tales como hierro, cobalto, cobre, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y cinc son oligoelementos requeridos a menudo para la supervivencia de las bacterias que infectan a hospedadores tanto animales como humanos. Estos oligoelementos metálicos son usados por las bacterias como cofactores por parte de las enzimas que catalizan las reacciones bioquímicas de diversas rutas metabólicas requeridas por el organismo. El impacto del hierro en la patogenia de las bacterias ha sido ampliamente estudiado. El hierro es esencial para prácticamente todas las formas de vida y es necesario para las rutas enzimáticas y metabólicas de los organismos de todos los niveles filogenéticos.

45 La capacidad de *Fusobacterium* de evitar los mecanismos de defensa naturales del hospedador vertebrado depende en parte de su capacidad para obtener el hierro a partir del hospedador, lo que a su vez afecta directamente a la interacción entre el hospedador y el patógeno. Debido a la naturaleza esencial del hierro, los hospedadores vertebrados han desarrollado elaborados mecanismos para unir el hierro a los fluidos corporales (por ejemplo, la transferrina en la sangre y la linfa, y la lactoferrina en las secreciones externas). Estas proteínas de unión de hierro de alta afinidad crean un entorno restringido para el hierro en el interior del hospedador, reduciendo el nivel de hierro hasta aproximadamente  $10^{-18}$  molar, una concentración demasiado baja para que dé apoyo al crecimiento de prácticamente ninguna bacteria. Estos mecanismos de secuestramiento del hierro del hospedador actúan como un mecanismo de defensa natural para combatir la invasión bacteriana. Para soslayar estas condiciones restrictivas en hierro, muchas especies bacterianas han desarrollado mecanismos para obtener hierro. Los mecanismos más habituales incluyen la difusión de hierro soluble a través de porinas y de sistemas de transporte especializados que median la captación del hierro por parte de sideróforos. Este último sistema es uno de los mecanismos más habituales y mejor estudiados para la adquisición de hierro, e implica una quelación específica de hierro férrico por parte de sideróforos y la síntesis de sus correspondientes sistemas de transporte, lo que permite a las bacterias continuar su replicación y superar los mecanismos de defensa no específicos del hospedador. Una replicación continua, y por lo tanto cada etapa del proceso infeccioso, depende finalmente de la capacidad del organismo para

obtener hierro a partir de su hospedador.

Con tantas funciones básicas basadas en la disponibilidad del hierro, las bacterias han desarrollado una compleja red reguladora para la adquisición de hierro en unas condiciones fisiológicas variables. En condiciones anaeróbicas, el hierro está presente en la forma ferrosa soluble (Fe II) y puede difundir libremente a través de las porinas de la membrana externa hacia el periplasma. Por ejemplo, en *E. coli* el mecanismo de transporte FeoAB presente en la membrana citoplasmática transportará las moléculas de hierro ferroso al citoplasma de la célula. En condiciones anaeróbicas y de pH neutro, el hierro está presente principalmente en la forma férrica insoluble (Fe III) y no puede pasar a través de las porinas de la membrana externa mediante una difusión pasiva. En su lugar, las bacterias secretan unas moléculas denominadas sideróforos, que tienen una elevada afinidad por el hierro férrico. Los complejos férrico-sideróforo son reconocidos por los receptores de la membrana externa, denominados en conjunto receptores dependientes de TonB. Se cree que estos receptores, una vez unidos a los sideróforos cargados, interactúan con el TonB y sus proteínas asociadas localizadas en el periplasma y en la membrana citoplasmática. Estas interacciones entre las proteínas, aunque no son bien comprendidas, sirven para proporcionar la sinergia necesaria para el transporte de los complejos ferri-sideróforos a través de la membrana externa y a través del espacio periplásmico. Los sistemas de transporte ABC presentes en la membrana citoplasmática sirven para transportar los complejos de hierro-sideróforo a través de la membrana citoplasmática. Las enzimas reductasas reducen el hierro férrico a su forma ferrosa, que se disocia del sideróforo y libera el hierro en la célula.

Numerosas especies de bacterias patógenas usan mecanismos adicionales para obtener el hierro a partir de los hospedadores mamíferos, incluyendo la unión directa de la transferrina, del grupo hemo y de otros compuestos que contienen el grupo hemo. Las proteínas receptoras que se unen a estas moléculas que contienen hierro se basan lo más probablemente en el complejo TonB para la energía necesaria para el transporte del grupo hemo a través de la membrana externa, de forma similar a los complejos de hierro-sideróforo. Los transportadores especializados ABC se usan a continuación para transportar el grupo hemo a través de la membrana citoplasmática. Además, algunas bacterias secretan hemóforos, pequeñas moléculas que se unen al grupo hemo y lo presentan a sus receptores de la superficie de la célula bacteriana. Muchas especies patógenas también producen hemolisinas, que son toxinas que lisan los glóbulos rojos sanguíneos, liberando el grupo hemo y la hemoglobina para que sean captados por las bacterias.

Las proteínas de la membrana externa de las bacterias gramnegativas controlan la permeabilidad selectiva de muchos nutrientes esenciales críticos para la supervivencia de las bacterias, incluyendo todas las bacterias patógenas que provocan enfermedades en los animales y en el hombre. Esta permeabilidad selectiva de nutrientes está controlada por una clase de proteínas de membrana denominadas porinas. Ahora parece que la mayoría de las proteínas de la membrana externa de la superficie de las bacterias gramnegativas son porinas, identificadas como porinas generales (por ejemplo, OmpF), porinas monoméricas (por ejemplo, OmpA), porinas específicas (por ejemplo, la porina específica de la maltosa LamB) y las porinas dependientes de TonB (por ejemplo, el receptor de sideróforo FepA). La clase de proteínas de las porinas generalmente comparten características estructurales, incluyendo la presencia de bucles beta que abarcan la membrana externa.

Se sabe poco con respecto a la adquisición de hierro por parte de las especies de *Fusobacterium*, y las comparaciones genómicas son difíciles dado que sólo se ha secuenciado completamente el genoma de una única cepa de *Fusobacterium nucleatum*, la cepa de *F. nucleatum* ATCC 25586 (Kapatral et al., J. Bacteriol., 184, 2005 - 2018 (2002)). Sin embargo, esta secuencia genómica se ha usado recientemente en una comparación con un genoma parcialmente secuenciado de *F. nucleatum* subesp. *vincentii* (Kapatral et al., Genome Res., 13, 1180 - 1189 (2003)) para investigar las diferencias entre estas dos subespecies. Los resultados sugirieron que había diferencias entre los dos genomas con respecto a los sistemas de captación de hierro. Aunque se descubrieron sistemas para el transporte del hierro en ambos genomas, el genoma de la cepa ATCC 25586 contiene tres sistemas de transporte adicionales específicos para el hierro ABC. Además, parece que las proteínas del receptor de la hemina están codificadas por ambos genomas, pero mientras que la subespecie de la cepa aislada *vincentii* codifica para tres receptores, el genoma de la cepa ATCC 25586 codifica aparentemente para cinco de dichas proteínas. Adicionalmente, los genes *feoAB*, que codifican para un supuesto sistema de transporte de hierro ferroso, sólo se encuentran en el genoma de la subespecie de la cepa aislada *vincentii*. Dado que ambos organismos son anaerobios obligados, y el hierro ferroso es la forma predominante del metal en condiciones anaerobias, la cepa ATCC 25586 puede tener un segundo mecanismo para la captación de hierro ferroso. Dadas las diferencias entre estas dos subespecies de *F. nucleatum*, es probable que haya muchas diferencias entre los sistemas de captación de hierro entre otras especies de *Fusobacterium*. Por lo tanto, los datos genómicos de *F. nucleatum* pueden no ser útiles para predecir la presencia o la ausencia de sistemas de adquisición de hierro en otras especies de *Fusobacterium*.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de polipéptidos a partir de especies de *Fusobacterium* que comprende la incubación de una especie de *Fusobacterium* en un medio que comprende 15 - 20 µg/ml de 2,2-dipiridilo; alterar la especie de *Fusobacterium* para dar como resultado una mezcla que comprende membranas celulares rotas; solubilizar la mezcla mediante la adición a la mezcla de un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende polipéptidos solubilizados y no solubilizados; y aislar los péptidos

no solubilizados.

La presente divulgación proporciona una composición que incluye polipéptidos aislados que se pueden aislar a partir de especies de *Fusobacterium*. Al menos uno de los polipéptidos aislados se puede aislar a partir de especies de *Fusobacterium* cultivadas en unas condiciones con poco hierro, y no se pueden aislar a partir de especies de *Fusobacterium* cultivadas en unas condiciones con mucho hierro, y pueden tener un peso molecular de entre 24 kDa y 86 kDa. En algunos aspectos de la divulgación, la composición incluye adicionalmente una segunda población de polipéptidos aislados que se pueden aislar a partir de especies de *Fusobacterium* cultivadas en unas condiciones con poco hierro, en la que la expresión de la segunda población de polipéptidos aislados está aumentada en al menos un 10 % durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. Los polipéptidos de la segunda población pueden tener unos pesos moleculares de entre 29 kDa y 144 kDa. La composición también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para el tratamiento de un sujeto. En un aspecto, el procedimiento incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente divulgación a un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar una infección causada por una especie de *Fusobacterium*. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ungulado, o un ser humano. Algunos ejemplos de ungulados incluyen animales bovinos, ovinos o caprinos.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para el tratamiento de una afección causada por una especie de *Fusobacterium*. En un aspecto, el procedimiento incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente divulgación a un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar una afección provocada por una especie de *Fusobacterium*. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ungulado, o un ser humano. Algunos ejemplos de ungulados incluyen animales bovinos, ovinos o caprinos.

La presente invención proporciona procedimientos para el aislamiento de polipéptidos a partir de especies de *Fusobacterium* como se ha definido anteriormente y en las reivindicaciones. También se incluyen en la divulgación las composiciones preparadas mediante estos procedimientos.

La presente divulgación también proporciona un polipéptido aislado que se puede aislar a partir de una especie de *Fusobacterium*, en el que el polipéptido es expresado por una especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas condiciones con poco metal, y no es expresado por la especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas condiciones con mucho metal. En otro aspecto, el polipéptido aislado es expresado por una especie de *Fusobacterium* cultivada en unas condiciones con poco hierro, en el que la expresión del polipéptido aislado está aumentada en al menos un 10 % durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. En otro aspecto más, el polipéptido aislado es expresado sustancialmente en la misma cantidad durante el cultivo de la especie de *Fusobacterium* en unas condiciones con poco metal y en unas condiciones con mucho metal.

La divulgación proporciona adicionalmente composiciones que incluyen una preparación aislada de células completas de una especie de *Fusobacterium*. En un aspecto, las células incluyen un polipéptido regulado por un metal que es expresado por la especie de *Fusobacterium* durante su cultivo en unas condiciones con poco metal y que no es expresado durante su cultivo en unas condiciones con mucho metal. En otro aspecto, las células incluyen un polipéptido regulado por un metal que es expresado por la especie de *Fusobacterium* durante su cultivo en unas condiciones con mucho metal y que es expresado en una cantidad aumentada durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. La invención proporciona un procedimiento para la elaboración de dichas composiciones. También se divulga un método para la elaboración de dichas composiciones que incluye proporcionar un cultivo que incluye una especie de *Fusobacterium*, en el que la especie de *Fusobacterium* ha sido incubada en unas condiciones con poco metal, e inactivar la especie de *Fusobacterium* para dar como resultado una composición que contiene células inactivadas de especies de *Fusobacterium*.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para la detección de anticuerpos, que incluyen proporcionar una muestra biológica que comprende un anticuerpo, poner en contacto la muestra biológica con un polipéptido que se puede aislar a partir de una especie de *Fusobacterium* para formar una mezcla, incubar la mezcla e identificar un complejo de polipéptido:anticuerpo, en el que la presencia de un complejo de polipéptido:anticuerpo indica que la muestra biológica comprende un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido. El polipéptido puede ser un polipéptido que es expresado por una especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas condiciones con poco metal, y que no es expresado por la especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas condiciones con mucho metal, o un polipéptido que está aumentado durante el cultivo en unas condiciones con poco metal.

También se divulga un procedimiento para la inmunización pasiva de un sujeto, que incluye la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo a un sujeto que presenta o que está en riesgo de presentar una infección causada por una especie de *Fusobacterium*, en el que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que se puede aislar a partir de una especie de *Fusobacterium*. El polipéptido puede ser un polipéptido que es expresado por una especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas condiciones con poco metal y que no es expresado por la especie de *Fusobacterium* en una cantidad detectable durante su cultivo en unas

condiciones con mucho metal, o un polipéptido que está aumentado durante el cultivo en unas condiciones con poco metal.

### **Breve descripción de las figuras**

- 5           Figura 1. Diferencias en la mortalidad entre ratones vacunados y de control después de una exposición interperitoneal a *F. necrophorum*.
- Figura 2. Recuperación de *F. necrophorum* en hígados de ratones vacunados y de control después de una exposición intraperitoneal.
- Figura 3. Imagen de gel de las proteínas de membrana derivadas de *F. necrophorum* cultivado en unas condiciones de cultivo con hierro y sin hierro.
- 10           Figura 4. Disminución en el aislamiento de *F. necrophorum* a partir de muestras sanguíneas de novillos Holstein vacunados y de control después de una exposición intravenosa.
- Figura 5. *F. necrophorum* resuelto en un gel de SDS-poliacrilamida y teñido con azul brillante de Coomassie. Carril 1, marcadores del peso molecular; carril 2, *F. necrophorum* cultivado en un medio con hierro; carril 3, *F. necrophorum* cultivado en un medio sin hierro. Los pesos moleculares de algunas proteínas se muestran en los carriles 2 y 3. B. Inmunotransferencia Western de *F. necrophorum*. Carril 1, marcadores del peso molecular; carril 2, *F. necrophorum* cultivado en un medio sin hierro.
- 15

### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención**

La presente divulgación proporciona polipéptidos y composiciones que incluyen uno o más de los polipéptidos. Según se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y no se refiere a una longitud específica de un polímero de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína y enzima están incluidos en la definición de polipéptido. Este término también incluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Un polipéptido puede ser aislable directamente a partir de una fuente natural o puede ser preparado con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. En el caso de un polipéptido que sea natural, dicho polipéptido normalmente es aislado. Un polipéptido "aislado" es aquel que ha sido extraído de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que ha sido extraído a partir del citoplasma o de la membrana externa de una célula, y la mayoría de los polipéptidos, de los ácidos nucleicos y de otro material celular de su entorno natural ya no están presentes. Un polipéptido "aislado" también incluye un polipéptido producido mediante el uso de técnicas recombinantes, o que es sintetizado químicamente o enzimáticamente. Salvo que se especifique de otro modo, "un," "uno/a", "el/la" y "al menos uno/a" se usan de forma intercambiable y significan uno o más de uno. Los términos "comprende" y las variaciones del mismo no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

20

25

30

Los polipéptidos de la presente divulgación son aislables a partir de un miembro de la familia *Bacteroidaceae*, preferentemente del género *Fusobacterium*. Un miembro del género *Fusobacterium* también se denomina en el presente documento una especie de *Fusobacterium*. Algunos ejemplos de especies de *Fusobacterium* a partir de las cuales pueden obtenerse los polipéptidos de la presente divulgación incluyen *F. necrophorum* (incluyendo *F. necrophorum* subesp. *necrophorum* y *F. necrophorum* subesp. *funduliforme*), *F. nucleatum*, *F. ulcercans*, *F. russi*, *F. varium*, *F. mortiferum*, *F. gonidiaformans* y *F. naviforme*. Preferiblemente, la especie de *Fusobacterium* a partir de la cual pueden obtenerse los polipéptidos de la presente divulgación es *F. necrophorum*. Estos microbios están disponibles comercialmente en diversos depósitos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Además, dichos microbios son fácilmente aislables mediante técnicas de aislamiento conocidas y usadas en la materia. Por ejemplo, un microbio puede derivar de un animal infectado en forma de una cepa aislada de campo, y usarse para la obtención de los polipéptidos de la presente divulgación según se describe en el presente documento, o almacenarse para un uso futuro, por ejemplo, en un depósito congelado a entre -20 °C y -95 °C, en un medio bacteriológico apropiado que contiene un 20 % de glicerol, y otros medios similares. Los procedimientos para la obtención de los polipéptidos a partir de la especie de *Fusobacterium* se describen en el presente documento.

35

40

45

Cada polipéptido puede estar definido por su peso molecular en kilodaltons (kDa). Los procedimientos para la determinación del peso molecular de un polipéptido son rutinarios y conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, filtración en gel, electroforesis en gel, incluyendo una electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (SDS), electroforesis capilar, espectrometría de masas y cromatografía líquida, incluyendo una HPLC. Cuando el peso molecular de un polipéptido se determina mediante el uso de una electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS, se usan las condiciones apropiadas para la resolución de los polipéptidos que tienen los pesos moleculares de los polipéptidos de la presente divulgación, por ejemplo, de entre 140 kDa y 30 kDa. Dichas condiciones son rutinarias y conocidas en la materia.

50

En un aspecto, los polipéptidos de la presente divulgación son polipéptidos regulados por metales. Según se usa en el presente documento, un "polipéptido regulado por metales" es un polipéptido que es expresado por un miembro del género *Fusobacterium* en una cantidad mayor cuando el microbio se cultiva en unas condiciones con poco metal

55

en comparación con el cultivo del mismo microbio en unas condiciones con mucho metal. Los metales son aquellos que están presentes en la tabla periódica en los Grupos 1 hasta 17 (denominación de la IUPAC; también denominados Grupos I-A, II-A, III-B, IV-B, V-B, VI-B, VII-B, VIII, I-B, II-B, III-A, IV-A, V-A, VI-A y VII-A, respectivamente, en la denominación CAS). Preferiblemente, los metales son aquellos de los Grupos 2 hasta 12, más preferentemente, de los Grupos 3 - 12. Incluso más preferentemente, el metal es hierro, cinc, cobre, magnesio, níquel, cobalto, manganeso, molibdeno o selenio, lo más preferentemente, hierro.

Por ejemplo, una clase de polipéptido regulado por un metal producido por una especie de *Fusobacterium* no es expresado en unas cantidades detectables durante el cultivo de microbio en unas condiciones con mucho metal, pero es expresado en unas cantidades detectables durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. Las condiciones con poco metal y las condiciones con mucho metal se describen con mayor detalle en el presente documento. Algunos ejemplos de dichos polipéptidos regulados por un metal aislables a partir de una especie de *Fusobacterium* tienen unos pesos moleculares (según se determina mediante la separación de los polipéptidos mediante el uso de un gel adherente al 4 % y un gel de resolución al 10 % en unas condiciones reductoras y desnaturizantes) de entre 24 kDa y 86 kDa, preferentemente de entre 76 kDa y 86 kDa, de entre 62 kDa y 68 kDa, de entre 45 kDa y 53 kDa, de entre 34 kDa y 43 kDa y de entre 24 kDa y 35 kDa. Más preferentemente, los polipéptidos regulados por metales tienen unos pesos moleculares de entre 78 kDa y 84 kDa, de entre 64 kDa y 66 kDa, de entre 47 kDa y 51 kDa, de entre 36 kDa y 41 kDa y de entre 27 kDa y 32 kDa. Lo más preferentemente, los polipéptidos regulados por un metal tienen unos pesos moleculares de 83 kDa, de 79 kDa, de 65 kDa, de 49 kDa, de 39 kDa, de 38 kDa, de 31 kDa y de 28 kDa. Dichos polipéptidos son aislables a partir de una especie de *Fusobacterium* cultivada en unas condiciones sin hierro, y no son aislables a partir de la especie de *Fusobacterium* cultivada en unas condiciones con hierro.

Otro tipo de polipéptido regulado por un metal producido por una especie de *Fusobacterium* es expresado en unas cantidades detectables durante el cultivo del microbio en unas condiciones con mucho metal, pero hay más polipéptido expresado durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. La expresión de dichos polipéptidos se denomina en el presente documento "mejorada" durante su cultivo en unas condiciones con poco metal. Normalmente, el aumento en la expresión de un polipéptido durante su cultivo en unas condiciones con poco metal es de entre un 10 % y un 50 % en comparación con la expresión del polipéptido durante su cultivo en unas condiciones con mucho metal. Algunos ejemplos de polipéptidos regulados por un metal que muestran un aumento en la expresión y que son aislables a partir de una especie de *Fusobacterium* tienen unos pesos moleculares (según se determina mediante la separación de los polipéptidos mediante el uso de una SDS-PAGE en gel al 10 % en unas condiciones reductoras y desnaturizantes) de entre 136 kDa y 144 kDa, de entre 69 kDa y 77 kDa, de entre 39 kDa y 47 kDa y de entre 29 kDa y 37 kDa. Más preferentemente, los polipéptidos regulados por un metal que tienen un aumento en la expresión tienen unos pesos moleculares de entre 138 kDa y 142 kDa, de entre 71 kDa y 75 kDa, de entre 41 kDa y 45 kDa y de entre 31 kDa y 35 kDa. Lo más preferentemente, los polipéptidos regulados por un metal que tienen un aumento en la expresión tienen unos pesos moleculares de 140 kDa, de 73 kDa, de 43 kDa y de 33 kDa.

Si un polipéptido regulado por un metal es expresado en una cantidad detectable o tiene un aumento en la expresión durante su cultivo en unas condiciones con poco metal, puede ser determinado mediante procedimientos útiles para la comparación de la presencia de proteínas, que incluyen, por ejemplo, una filtración en gel, una electroforesis en gel, incluyendo una electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), una electroforesis capilar, una espectrometría de masas y una cromatografía líquida, incluyendo una HPLC. Los cultivos individuales de una especie de *Fusobacterium* se cultivan en unas condiciones con mucho metal y en unas condiciones con poco metal, los polipéptidos de la presente divulgación se aíslan según se describe en el presente documento, y los polipéptidos presentes en cada cultivo se resuelven y se comparan. Normalmente, se usa una cantidad igual del polipéptido de cada cultivo. Por ejemplo, cuando se usa a una electroforesis en gel de poli(acrilamida SDS para la comparación de los polipéptidos, se usan 30 µg microgramos del polipéptido de cada cultivo y se cargan en un pocillo. Después del procesado del gel y la tinción de los polipéptidos, pueden compararse los dos carriles. Un polipéptido que no es expresado en unas cantidades detectables durante el cultivo es un polipéptido que es indetectable mediante el uso de los procedimientos de detección disponibles actualmente, preferentemente una tinción con un agente de tinción tal como azul brillante de Coomassie.

En otro aspecto, los polipéptidos de la presente divulgación no están regulados por metales y normalmente son expresados en la misma cantidad cuando la especie de *Fusobacterium* se cultiva en unas condiciones con poco metal y con mucho metal. Algunos ejemplos de este tipo de polipéptido aislable a partir de una especie de *Fusobacterium* tienen unos pesos moleculares (según se determina mediante la separación de los polipéptidos mediante el uso de una SDS-PAGE en gel al 10 % en unas condiciones reductoras y desnaturizantes) de entre 36 kDa y 45 kDa. Más preferentemente, los pesos moleculares de este tipo de polipéptidos son de 45 kDa, de 41 kDa, de 40 kDa y de 34 kDa.

Preferiblemente, los polipéptidos de la presente divulgación tienen una actividad inmunógena. Una "actividad inmunógena" se refiere a la capacidad de un polipéptido de desencadenar una respuesta inmunológica en un animal. Una respuesta inmunológica a un polipéptido es el desarrollo de una respuesta inmunitaria en un animal mediada por células y/o por anticuerpos frente al polipéptido. Habitualmente, una respuesta inmunológica incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, de linfocitos B, de linfocitos T

colaboradores, de linfocitos T supresores y/o de linfocitos T citotóxicos, dirigidos contra un epítipo o epítipos del polipéptido. "Epítipo" se refiere al sitio de un antígeno al que responden específicamente los linfocitos B y/o los linfocitos T, de forma que se produce un anticuerpo.

5 La presente divulgación también proporciona preparaciones de células completas de una especie de *Fusobacterium*, en las que la especie de *Fusobacterium* expresa uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación. Las células presentes en una preparación de células completas están preferentemente inactivadas, de forma que las células no pueden replicarse, pero se conserva la inmunogenicidad de los polipéptidos de la presente divulgación expresados por la especie de *Fusobacterium*. Normalmente, las células son destruidas mediante una exposición a agentes tales como glutaraldehído, formalina o formaldehído.

10 La presente divulgación también proporciona composiciones que incluyen al menos 1 de los polipéptidos de la presente divulgación, más preferentemente al menos 2, al menos 3, al menos 4, y así sucesivamente, hasta al menos 14 polipéptidos de la presente divulgación. Una composición puede incluir polipéptidos aislables a partir de 1 especie de *Fusobacterium*, o pueden ser aislables a partir de una combinación de 2 o más especies de *Fusobacterium*, por ejemplo, de *F. necrophorum* y de *F. nucleatum*. Adicionalmente, una composición puede incluir polipéptidos aislables a partir de 2 o más cepas de la misma especie de *Fusobacterium*. Por ejemplo, una composición puede incluir polipéptidos aislables a partir de 2 cepas aisladas diferentes de *F. necrophorum* subesp. *necrophorum*. La presente divulgación también proporciona composiciones que incluyen una preparación de células completas de al menos 1 especie de *Fusobacterium*, de 2, 3, 4, 5 o 6 especies de *Fusobacterium*.

20 Opcionalmente, un polipéptido de la presente divulgación puede estar unido covalentemente a un polipéptido portador para mejorar las propiedades inmunológicas del polipéptido. Algunos polipéptidos portadores útiles son conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, leucotoxina derivada de una especie de *Fusobacterium*. El acoplamiento químico de un polipéptido de la presente divulgación puede llevarse a cabo mediante el uso de procedimientos conocidos y rutinarios. Por ejemplo, pueden usarse diversos reactivos de reticulación homobifuncionales y/o heterobifuncionales, tales como suberato de bis(sulfosuccinimidilo), bis(diazobenzidina), adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, superimidato de dimetilo, suberato de disuccinimidilo, glutaraldehído, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, sulfo-m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo, 4-(p-maleimido-fenil) butirato de sulfosuccinimidilo y (1-etil-3-(dimetil-aminopropil) carbodiimida (Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, de forma general, y en el capítulo 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, NY (1988)).

30 Preferiblemente, dichas composiciones de la presente divulgación incluyen unas bajas concentraciones de lipopolisacárido (LPS). El LPS es un componente de la membrana externa de la mayoría de los microbios gramnegativos (véase, por ejemplo, Nikaido y Vaara, Outer Membrane, en: Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt et al., (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D. C., páginas 7 - 22 (1987), y normalmente incluye polisacáridos (específicos de la cadena O, el núcleo externo e interno) y la región lipídica A. El componente lipídico A del LPS es el componente más biológicamente activo de la estructura del LPS y conjuntamente inducen un amplio espectro de efectos fisiopatológicos en los mamíferos. Los efectos más drásticos son fiebre, coagulación intravascular diseminada, activación del complemento, choque por hipotensión y muerte. La actividad inmunoestimulante no específica del LPS puede aumentar la formación de un granuloma en el sitio de la administración de las composiciones que incluyan el LPS. Dichas reacciones pueden dar como resultado un estrés excesivo en el animal, por lo que el animal puede rechazar el alimento o el agua durante un periodo de tiempo, y exacerbar afecciones infecciosas en el animal. Además, la formación de un granuloma en el sitio de la inyección puede aumentar la probabilidad de un posible deterioro del cadáver debido a la formación de cicatrices o de imperfecciones de tejido en el sitio de inyección (véase, por ejemplo, Rae, Injection Site Reactions, disponible en [www.animal.ufl.edu/extension/beef/documents/SHORT94/RAE.HTM](http://www.animal.ufl.edu/extension/beef/documents/SHORT94/RAE.HTM), que está disponible en el sitio web mantenido por el Department of Animal Sciences of the University of Florida, Gainesville, FL).

45 La concentración del LPS puede ser determinada mediante el uso de procedimientos rutinarios conocidos en la materia. Dichos procedimientos normalmente incluyen la medición de la unión de colorante por parte del LPS (véase, por ejemplo, Keler y Nowotny, Analyt. Biochem., 156, 189 (1986)) o el uso de una prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (véase, por ejemplo, Endotoxins and Their Detection With the Limulus Amebocyte Lystate Test, Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, Nueva York, NY (1982)). Existen cuatro procedimientos básicos disponibles comercialmente que normalmente se usan en una prueba de LAL: la prueba de coagulación en gel; la prueba turbidimétrica (espectrofotométrica); la prueba colorimétrica; y la prueba cromogénica. Un ejemplo de una prueba de coagulación en gel está disponible con el nombre comercial E-TOXATE (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; véase Sigma Technical Bulletin Nº 210) y PYROTELL (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA).

50 Normalmente, las condiciones del ensayo incluyen poner en contacto la composición con una preparación que contiene un lisado de los amebocitos circulantes del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. Cuando es expuesto al LPS, el lisado aumenta su opacidad, así como su viscosidad, y puede gelificar. Se añaden aproximadamente 0,1 mililitros de la composición al lisado. Normalmente, el pH de la composición es de entre 6 y 8, preferentemente, de entre 6,8 y 7,5. La mezcla de la composición y el lisado se incuba durante 1 hora sin perturbaciones a 37 °C.

60 Después de la incubación, la mezcla se usará para determinar si se produjo una gelificación de la mezcla. Una gelificación indica la presencia de la endotoxina. Para determinar la cantidad de endotoxina presente en la composición, se realizan diluciones de una solución estandarizada de la endotoxina y se ensayan al mismo tiempo

que se ensaya la composición. Las soluciones estandarizadas de la endotoxina están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma Chemical (n° de catálogo 210-SE), en la Farmacopea de los Estados Unidos (Rockville, MD, n° de catálogo 235503), y en Associates of Cape Cod, Inc., (n° de catálogo E0005). En general, cuando una composición de la presente divulgación se prepara mediante el aislamiento de polipéptidos a partir de una especie de *Fusobacterium* mediante un procedimiento según se describe en el presente documento (por ejemplo, un procedimiento que incluya la disrupción y la solubilización de las células, y la recolección de los polipéptidos insolubles), la cantidad de LPS en una composición de la presente divulgación es menor que la cantidad de LPS presente en una mezcla de la misma cantidad de la especie de *Fusobacterium* que ha sido homogenizada en las mismas condiciones, pero no solubilizada. Normalmente, la cantidad de LPS en una composición de la presente invención ha disminuido, en orden creciente de preferencia, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en al menos un 70 %, en al menos un 80 % o en al menos un 90 % con respecto a la cantidad de LPS en una composición preparada mediante la disrupción, pero no la solubilización, de la misma especie de *Fusobacterium*.

En algunos aspectos, una composición de la presente divulgación no incluye una leucotoxina aislable a partir de una especie de *Fusobacterium*. Las leucotoxinas que no están opcionalmente presentes en una composición de la presente divulgación incluyen polipéptidos que tienen un peso molecular de 300 kDa según un análisis de un gel de SDS-PAGE al 10 % en unas condiciones reductoras y desnaturalizantes, y que tienen una actividad que es tóxica para los leucocitos bovinos (Narayanan et al., Infect. Immun., 69, 5447 - 5455 (2001) y Narayanan et al., Infect. Immun., 70, 4609 - 4620 (2002)). Puede determinarse si un polipéptido tiene actividad de leucotoxina mediante el uso del anticuerpo monoclonal F7B10 que es reactivo frente a la leucotoxina de *F. necrophorum* (Tan et al., Vet. Microbiol., 42, 121 - 133 (1994), o mediante la determinación de si el polipéptido es tóxico para los leucocitos de los rumiantes. Los procedimientos para la medición de la toxicidad de un polipéptido para los leucocitos de los rumiantes son conocidos en la materia (Narayanan et al., Infect. Immun., 69, 5447 - 5455 (2001) y Narayanan et al., Infect. Immun., 70, 4609 - 4620 (2002)).

Las composiciones de la presente divulgación opcionalmente incluyen adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, un portador, un excipiente, una sal, etc., que es compatible con los demás ingredientes de la composición y no es perjudicial para el receptor de la misma. Normalmente, la composición incluye un portador farmacéuticamente aceptable cuando la composición se usa según se describe en el presente documento. Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en preparaciones farmacéuticas en diversas formas adaptadas a la vía de administración elegida, preferentemente, vías adecuadas para la estimulación de una respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Por lo tanto, una composición de la presente divulgación puede ser administrada a través de las vías conocidas que incluyen, por ejemplo, oral; parental incluyendo intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc., y por vía tópica, tal como intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica y por vía rectal etc. Se prevé que una composición pueda ser administrada en una superficie mucosa, tal como mediante su administración en la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, pulverizada o en un aerosol), para estimular la inmunidad de la mucosa, tal como la producción de anticuerpos de IgA secretores, en todo el cuerpo del animal.

Una composición de la presente divulgación también puede ser administrada a través de un implante de liberación sostenida o retardada, incluyendo implantes biodegradables y/o erosionables. Los implantes adecuados son conocidos. Algunos ejemplos de implantes adecuados para su uso de acuerdo con la divulgación se divulgan en Emery y Straub (documento WO 01/37810). Los implantes pueden ser producidos con unos tamaños lo suficientemente pequeños como para ser administrados mediante un aerosol o una pulverización. Los implantes también incluyen nanoesferas y microesferas.

Una composición de la presente divulgación es administrada en una cantidad suficiente para proporcionar una respuesta inmunológica frente a los polipéptidos o las células completas de la presente divulgación presentes en la composición. La cantidad de polipéptido presente en una composición de la presente divulgación puede variar. Por ejemplo, la dosis del polipéptido puede ser de entre 0,01 microgramos ( $\mu\text{g}$ ) y 3.000 miligramos (mg), normalmente de entre 10 mg y 2.000 mg. Cuando la composición es una preparación de células completas, las células pueden estar presentes a una concentración de  $10^6$  bacterias/ml, de  $10^7$  bacterias/ml, de  $10^8$  bacterias/ml o de  $10^9$  bacterias/ml. Para una composición inyectable (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, etc.) el polipéptido está presente preferentemente en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición administrado es de entre 0,5 ml y 5,0 ml, normalmente de 1,0 - 3,0 ml. Cuando la composición es una preparación de células completas, las células están presentes preferentemente en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición administrado es de entre 0,5 ml y 5,0 ml, normalmente de 1,0 - 2,0 ml. La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos o las células específicas elegidas, el peso, el estado físico y la edad del animal, y la vía de administración. Por lo tanto, el peso absoluto del polipéptido o el número de células incluidas en una forma de dosificación unitaria dada puede variar, y depende de factores tales como la especie, la edad, el peso y el estado físico del animal, así como del procedimiento de administración. Dichos factores pueden ser determinados por el experto en la materia. Otros ejemplos de dosis adecuadas para la divulgación se divulgan en Emery et al. (Patente de EE.UU. 6.027.736).

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitarias y pueden ser preparadas mediante procedimientos bien conocidos en la materia de Farmacia. Todos los procedimientos para la preparación de una composición que incluya un portador farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner

en asociación el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o una célula completa de la presente invención) con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el compuesto activo con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido o ambos, y después, si fuera necesario, moldear el producto en las formulaciones deseadas.

5 Una composición que incluye un portador farmacéuticamente aceptable también puede incluir un adyuvante. Un "adyuvante" se refiere a un agente que puede actuar de una forma inespecífica para mejorar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en particular, reduciendo así potencialmente la cantidad de antígeno necesaria en cualquier composición inmunizante dada y/o la frecuencia de inyección necesaria con objeto de generar una respuesta inmunitaria adecuada frente al antígeno de interés. Algunos adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, IL-1, IL-2, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), avridina, hidróxido de aluminio, aceites, saponinas, alfa-tocoferol, polisacáridos, parafinas emulsionadas (disponibles con el nombre comercial EMULSIGEN en MVP Laboratories, Ralston, Nebraska), ISA-70, RIBI y otras sustancias conocidas en la materia.

15 En otra realización, una composición de la divulgación que incluye un portador farmacéuticamente aceptable puede incluir un modificador de la respuesta biológica, tal como, por ejemplo, IL-2, IL-4 y/o IL-6, TNF, IFN-alfa, IFN-gamma, y otras citocinas efectoras de las células inmunitarias. Una composición también puede incluir un antibiótico, un conservante, un antioxidante, un agente quelante, etc. Dichos componentes son conocidos en la materia.

Los polipéptidos y las preparaciones de células completas de la presente divulgación pueden obtenerse mediante la incubación de un miembro del género *Fusobacterium* en unas condiciones que favorezcan la expresión de uno o más de los polipéptidos descritos en el presente documento. La presente divulgación también incluye composiciones preparadas mediante los procesos divulgados en el presente documento. Normalmente, dichas condiciones son unas condiciones con poco metal. Según se usa en el presente documento, la frase "condiciones con poco metal" se refiere a un entorno, normalmente un medio bacteriológico, que contiene cantidades de un metal libre que provocan que un microbio exprese polipéptidos regulados por un metal. Según se usa en el presente documento, la frase "condiciones con mucho metal" se refiere a un entorno que contiene cantidades de un metal libre que provocan que un microbio no exprese uno o más de los polipéptidos regulados por un metal descritos en el presente documento, o que disminuya la expresión de dicho polipéptido. Las condiciones con poco metal son generalmente el resultado de la adición de un compuesto quelante de metales a un medio bacteriológico. Las condiciones con mucho metal están presentes generalmente cuando no hay presente un quelante en el medio, y/o cuando se añade un metal al medio.

20 Algunos ejemplos de quelantes de metales incluyen compuestos naturales y sintéticos. Algunos ejemplos de compuestos naturales incluyen compuestos fenólicos vegetales, tales como los flavonoides. Algunos ejemplos de flavinoides incluyen los quelantes de cobre catequina y naringenina, y los quelantes de hierro miricetina y quercetina. Algunos ejemplos de quelantes de cobre sintéticos incluyen, por ejemplo, tetratiomolibdato, y algunos ejemplos de quelantes de cinc sintéticos incluyen, por ejemplo, N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil)-etileno diamina. Algunos ejemplos de quelantes de hierro sintéticos incluyen 2,2'-dipiridilo (también conocido en la materia como V,V'-bipiridilo), 8-hidroxiquinolina, ácido etilendiamino-di-O-hidroxifenilacético (EDDHA), metansulfonato de desferrioxamina (desferol), transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, sideróforos biológicos, tales como los catecolatos y los hidroxamatos, y citrato. Preferiblemente se usa 2,2'-dipiridilo para la quelación del hierro. Normalmente, el 2,2'-dipiridilo se añade al medio a una concentración de al menos 0,0025 microgramos/mililitro (µg/ml), de al menos 0,025 µg/ml o de al menos 0,25 µg/ml. Unos niveles elevados de 2,2'-dipiridilo pueden ser de 10 µg/ml, de 20 µg/ml o de 30 µg/ml.

Se espera que una especie de *Fusobacterium* con una mutación en un gen *fur* dé como resultado la expresión constitutiva de muchos, si no de todos, los polipéptidos regulados por un metal de la presente divulgación. Se ha identificado un potencial gen *fur* en una *F. nucleatum* (Kapatral et al., J. Bacteriol. 184 (7), 2005 - 2018 (2002)). La producción de una mutación *fur* en una especie de *Fusobacterium* puede producirse mediante el uso de procedimientos rutinarios que incluyen, por ejemplo, electroporación y constructos genéticos útiles para la inactivación de genes en bacterias gramnegativas.

Muchas especies de *Fusobacterium* son capaces de crecer en unas condiciones con poco metal *in vitro* en un medio artificial únicamente después de una adaptación. Por ejemplo, puede adaptarse una especie de *Fusobacterium* a unas condiciones sin hierro *in vitro* mediante su cultivo en presencia de unas bajas concentraciones de un quelante de hierro, y después del cultivo en un medio que contiene el quelante, aumentar gradualmente la concentración del quelante. Por ejemplo, una especie de *Fusobacterium* puede ser adaptada para que crezca en unas condiciones sin hierro mediante la adición de 0,0025 µg/ml de 2,2'-dipiridilo a un medio, y aumentar gradualmente la concentración del quelante hasta una concentración mayor de, por ejemplo, 20 µg/ml.

El medio usado para la incubación del microbio no es crítico, y el volumen de medio usado para la incubación del microbio puede variar. Cuando se está evaluando la capacidad de un microbio de una especie de *Fusobacterium* para producir los polipéptidos descritos en el presente documento, el microbio puede cultivarse en un volumen adecuado, por ejemplo, de entre 10 mililitros y 1 litro de medio. Cuando se está cultivando un microbio para obtener polipéptidos para su uso, por ejemplo, en la administración a animales, el microbio puede cultivarse en un fermentador para permitir el aislamiento de grandes cantidades de polipéptidos. Los procedimientos para el cultivo de microbios en un fermentador son rutinarios y conocidos en la materia. Las condiciones usadas para el cultivo de

un microbio incluyen preferentemente un quelante de metales, más preferentemente un quelante de hierro, por ejemplo, 2,2'-dipiridilo, un pH de entre 6,5 y 7,5, preferentemente de entre 6,9 y 7,1, y una temperatura de 37 °C. Cuando se usa un fermentador, el cultivo puede ser purgado con un gas apropiado, por ejemplo, nitrógeno, para mantener unas condiciones anaerobias. Los miembros del género *Fusobacterium* son anaerobios obligados, por lo que las condiciones de cultivo no incluirán cantidades de oxígeno que impidan el crecimiento.

En algunos aspectos de la invención, puede recogerse una especie de *Fusobacterium* después de su cultivo. El cultivo incluye la concentración del microbio en un volumen menor y su suspensión en un medio diferente al medio de cultivo. Los procedimientos para concentrar microbios son rutinarios y conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, filtración y/o centrifugación. Normalmente, el microbio concentrado se suspende en unas cantidades decrecientes de tampón. Preferiblemente, el tampón final incluye un quelante de metales, preferentemente, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Un ejemplo de un tampón que puede usarse contiene Tris-base (7,3 gramos/litro) y EDTA (0,9 gramos/litro), a un pH de 8,5. Opcionalmente, el tampón final también minimizar la degradación proteolítica. Esto puede llevarse a cabo llevando el tampón final a un pH de más de 8,0, preferentemente, de al menos 8,5, y/o incluyendo uno o más inhibidores de la proteinasa (por ejemplo, fluoruro de fenilmetansulfonilo). Opcionalmente y preferentemente, el microbio concentrado se congela a -20 °C o menos hasta que es alterado.

Cuando la especie de *Fusobacterium* se va a usar en forma de una preparación de células completas, las células recogidas pueden ser procesadas mediante el uso de procedimientos rutinarios y conocidos para la inactivación de las células. Alternativamente, cuando se va a usar una especie de *Fusobacterium* para el aislamiento de los polipéptidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la especie de *Fusobacterium* puede ser alterada mediante el uso de procedimientos químicos, físicos o mecánicos rutinarios y conocidos en la materia, que incluyen, por ejemplo, prensa francesa, aplicación de ultrasonidos u homogeneización. Preferiblemente, se usa una homogeneización. Según se usa en el presente documento, "disrupción" se refiere a la ruptura de la célula. La disrupción de un microbio puede medirse mediante procedimientos que son rutinarios y conocidos en la materia, que incluyen, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, un microbio se somete a una disrupción hasta que el porcentaje de transmitancia aumenta en un 20 % cuando se mide una dilución de 1:100. La temperatura durante la disrupción se mantiene normalmente a 4 °C, para minimizar adicionalmente la degradación proteolítica.

El microbio alterado es solubilizado en un detergente, por ejemplo, un detergente aniónico, bipolar, no iónico o catiónico. Preferiblemente, el detergente es la sarcosina, más preferentemente, lauroil sarcosinato de sodio. Según se usa en el presente documento, el término "solubilizar" se refiere a la disolución de los materiales celulares (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos) en la fase acuosa del tampón en el que el microbio fue alterado, y la formación de agregados de materiales celulares en solubles. Las condiciones de solubilización dan como resultado preferentemente la agregación de los polipéptidos de la presente invención en agregados insolubles que son lo suficientemente grandes como para permitir un fácil aislamiento mediante, por ejemplo, una centrifugación.

Preferiblemente, la sarcosina se añade de tal forma que la proporción final entre la sarcosina y el peso en gramos del microbio alterado es de entre 1,0 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de sedimento y 6,0 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de sedimento, preferentemente, de 4,5 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de sedimento. La solubilización del microbio puede medirse mediante procedimientos que son rutinarios y conocidos en la materia, que incluyen, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, la solubilización se deja producir durante al menos 24 horas, más preferentemente, al menos 48 horas, lo más preferentemente, al menos 60 horas. La temperatura durante la disrupción se mantiene normalmente baja, preferentemente a 4 °C.

Los agregados insolubles que incluyen los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser aislados mediante procedimientos que son rutinarios y conocidos en la materia. Preferiblemente, los agregados insolubles se aíslan mediante una centrifugación. Normalmente, la centrifugación de los polipéptidos de la membrana externa que son insolubles en los detergentes requieren unas fuerzas centrífugas de al menos 50.000 x g, normalmente de 100.000 x g. El uso de dichas fuerzas centrífugas requiere el uso de ultracentrífugas, y el aumento de escala para procesar grandes volúmenes de muestra es a menudo difícil y no es económico con estos tipos de centrífugas. Los procedimientos descritos en el presente documento permiten la producción de agregados insolubles lo suficientemente grandes como para permitir el uso de unas fuerzas centrífugas significativamente menores (por ejemplo, de 46.000 x g). Los procedimientos para el procesado de grandes volúmenes a estas fuerzas centrífugas menores están disponibles y son conocidos en la materia. Por lo tanto, los agregados insolubles pueden ser aislados a un coste significativamente inferior.

Opcionalmente y preferentemente, la sarcosina se elimina de los polipéptidos aislados. Los métodos para la eliminación de la sarcosina de los polipéptidos aislados son conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, diafiltración, precipitación, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad, y una ultrafiltración y un lavado de los polipéptidos en alcohol mediante una diafiltración. Después del aislamiento, los polipéptidos se suspenden en tampón y se almacenan a baja temperatura, por ejemplo, a -20 °C o menos.

Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden aislarse a partir de una especie de *Fusobacterium* mediante el uso de procedimientos que son conocidos en la materia. El aislamiento de los polipéptidos puede

llevarse a cabo según se describe, por ejemplo, en Hussain, et al. Infect. Immun., 67, 6688 - 6690 (1999); en Trivier, et al., FEMS Microbiol. Lett., 127, 195 - 199 (1995); en Heinrichs, et al., J. Bacteriol., 181, 1436 - 1443 (1999).

5 En aquellos aspectos de la presente divulgación en los que va a elaborarse una preparación de células completas, después del cultivo de una especie de *Fusobacterium*, el microbio puede ser destruido mediante la adición de un agente tal como glutaraldehído, formalina o formaldehído, a una concentración suficiente para inactivar las células del cultivo. Por ejemplo, puede añadirse formalina a una concentración del 3 % (vol:vol). Después de un periodo de tiempo suficiente para inactivar las células, las células pueden recogerse, por ejemplo, mediante una diafiltración y/o una centrifugación, y lavarse.

10 Un aspecto de la presente divulgación está dirigido adicionalmente a los procedimientos de uso de las composiciones de la presente divulgación. Los procedimientos incluyen la administración a un animal de una cantidad eficaz de una composición de la presente divulgación. Preferiblemente, la composición incluye adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Según se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de una composición de la presente divulgación es la cantidad capaz de desencadenar la respuesta deseada en el receptor. La composición puede ser administrada en un momento en que puede haber presente un anticuerpo materno, por ejemplo, tan pronto como con un día de edad, o en un momento posterior durante la vida del animal. El animal puede ser, por ejemplo, un ungulado, un animal de compañía o un ser humano. Algunos ejemplos de ungulados incluyen animales que son bovinos (incluyendo, por ejemplo, vacas), caprinos (incluyendo, por ejemplo, cabras), ovinos (incluyendo, por ejemplo, ovejas), porcinos (incluyendo, por ejemplo, cerdos), equinos (incluyendo, por ejemplo, caballos), miembros de la familia *Cervidae* (incluyendo, por ejemplo, ciervo, alce, alce americano, caribú y reno) y *Bison* (incluyendo, por ejemplo, el búfalo). Algunos ejemplos de animales de compañía incluyen perros y gatos.

15 En algunos aspectos, los procedimientos pueden incluir adicionalmente administraciones adicionales (por ejemplo, una o más administraciones de refuerzo) de la composición al animal para mejorar o estimular una respuesta inmunitaria secundaria. Un refuerzo puede ser administrado un tiempo después de la primera administración, por ejemplo, entre 1 y 8 semanas, preferentemente entre 2 y 4 semanas, después de la primera administración de la composición. Pueden administrarse refuerzos posteriores una, dos, tres, cuatro o más veces al año. Sin pretender estar limitados por la teoría, se espera que los refuerzos anuales no sean necesarios, ya que un animal estará expuesto en el campo por la exposición a los miembros del género *Fusobacterium* que expresan los polipéptidos que tienen unos epítomos que son idénticos o están estructuralmente relacionados con los epítomos presentes en los polipéptidos presentes en la composición administrada al animal.

20 En un aspecto, la divulgación se refiere a procedimientos para la elaboración de un anticuerpo contra un polipéptido de la presente divulgación, por ejemplo, mediante la inducción de la producción del anticuerpo en un animal, o mediante técnicas recombinantes. El anticuerpo producido incluye un anticuerpo que se une específicamente a al menos un polipéptido presente en la composición. En este aspecto de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para dar como resultado la producción del anticuerpo en el animal. Los procedimientos para determinar si un animal ha producido los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos presentes en una composición de la presente divulgación pueden ser determinados según se describe en el presente documento. Según se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un polipéptido es un anticuerpo que interactúa únicamente con el epítomo del antígeno que indujo la síntesis del anticuerpo, o que interactúa con un epítomo estructuralmente relacionado. Un anticuerpo que "se une específicamente" a un epítomo interactuará, en las condiciones apropiadas, con el epítomo incluso en presencia de diversos objetivos de unión potenciales.

25 En un aspecto, la divulgación también se refiere al tratamiento de una infección en un animal causada por un miembro del género *Fusobacterium*. La infección puede estar causada exclusivamente por una especie de *Fusobacterium*, o puede ser una infección mixta de una especie de *Fusobacterium* y, por ejemplo, *Bacteroides nodosus*. El procedimiento incluye la administración de una cantidad eficaz de la composición de la presente divulgación a un animal que presenta una infección causada por un miembro del género *Fusobacterium*, y determinar si la especie de *Fusobacterium* que causó la infección ha disminuido. Los procedimientos para determinar si una infección está causada por un miembro del género *Fusobacterium* son rutinarios y conocidos en la materia. Se espera que las composiciones elaboradas con polipéptidos aislables a partir de una especie de *Fusobacterium* sean útiles en los procedimientos descritos en el presente documento frente a otras especies de *Fusobacterium*.

30 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a procedimientos para el tratamiento de uno o más síntomas de ciertas afecciones en animales que pueden estar causadas por una infección por un miembro del género *Fusobacterium*. Algunos ejemplos de afecciones causadas por infecciones por especies de *Fusobacterium* incluyen abscesos hepáticos, necrosis de las pezuñas, laminitis, dermatitis purulenta, dermatitis interdigital, ectima contagioso, rinitis necrótica, úlceras cutáneas, abscesos periamigdalinos, artritis séptica, síndrome de Lemierre y endocarditis. El tratamiento de estas afecciones puede ser profiláctico, o alternativamente puede iniciarse después del desarrollo de una afección descrita en el presente documento. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, iniciado antes de que un sujeto manifieste los síntomas de una afección causada por una especie de *Fusobacterium*, se denomina en el presente documento tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la afección.

Normalmente, un animal "en riesgo" de desarrollar una afección es un animal que probablemente está expuesto a una especie de *Fusobacterium* que causa la afección. Por ejemplo, el animal está presente en una zona en la que la afección ha sido diagnosticada en al menos otro animal, o está siendo transportado a una zona en la que es endémica una especie de *Fusobacterium* y/o en la que son prevalentes las afecciones causadas por una especie de *Fusobacterium*. Consecuentemente, la administración de una composición puede llevarse a cabo antes, durante o después de la aparición de las afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento iniciado después del desarrollo de una afección puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de una de las afecciones, incluyendo la eliminación completa de los síntomas. En este aspecto de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para prevenir la manifestación de los síntomas de una afección, disminuir la gravedad de los síntomas de una afección y/o eliminar completamente los síntomas. La potencia de una composición de la presente divulgación puede ensayarse de acuerdo con los procedimientos habituales. Por ejemplo, el uso de ratones como modelo experimental de una infección por una especie de *Fusobacterium* en seres humanos y en animales grandes, tales como las vacas, está bien establecido (Conion et al, Infect. Immun, 15, 510 - 517 (1977), García y McKay, Can. J. Comp. Med, 42, 121 - 127 (1978), Abe et al, Infect. Immun, 13, 1473 - 1478 (1976), Emery y Vaughan, Vet. Microbiol, 12, 255 - 268 (1986), Smith et al, Epidemiol. Infect, 110, 499 - 506 (1993) y Narayanan et al., Vet. Micro. 93, 335 - 347 (2003)). El modelo de ratón ha demostrado ser un modelo valioso para evaluar la inmunogenicidad y la identificación de diversos antígenos objetivo proporcionados por varias especies de *Fusobacterium*. Alternativamente, cuando la afección está presente en un animal, tal como, por ejemplo, una vaca o una oveja, puede llevarse a cabo un ensayo experimental controlado mediante la vacunación de los animales con cantidades variables de la composición, y exponiendo los animales vacunados y los no vacunados a una especie de *Fusobacterium*.

Los procedimientos para determinar si un animal presenta las afecciones divulgadas en el presente documento y los síntomas asociados con las afecciones son rutinarios y conocidos en la materia. Los síntomas asociados a menudo con los abscesos hepáticos pueden ser un abanico de patologías, desde pequeños focos de inflamación de linfocitos rodeados por pequeñas cantidades de hepatocitos en degeneración, hasta focos pronunciados con necrosis y hemorragia, pérdida de hepatocitos, fibrina y células inflamatorias mixtas en el margen del área necrótica.

Una composición de la divulgación puede usarse para proporcionar una inmunización pasiva frente a una infección por una especie de *Fusobacterium*. Por ejemplo, la composición puede ser administrada a un animal para inducir la producción de productos de inmunidad, tales como anticuerpos, que pueden ser recogidos del animal que los produce y administrados a otro animal para proporcionar una inmunidad pasiva. Los componentes de inmunidad, tales como anticuerpos, pueden ser recogidos para preparar composiciones de anticuerpos a partir de suero, de plasma, de sangre, de calostro, etc. para terapias de inmunización pasiva. Las composiciones de anticuerpos que incluyen anticuerpos monoclonales, anti-idiotipos y/o anticuerpos recombinantes también pueden ser preparadas mediante el uso de procedimientos conocidos. Las composiciones con anticuerpos pasivos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub> o Fv u otras formas modificadas de los mismos, pueden ser administradas a un receptor en forma de suero, de plasma, de sangre, de calostro, y similares. Sin embargo, los anticuerpos pueden ser aislados a partir de suero, de plasma, de sangre, de calostro, y similares, mediante el uso de procedimientos conocidos y secados por pulverización o liofilizados para un uso posterior en una forma concentrada o reconstituida. Las preparaciones de inmunización pasiva pueden ser particularmente ventajosas para el tratamiento de una enfermedad sistémica aguda, o para la inmunización pasiva de animales jóvenes que no han conseguido recibir unos niveles adecuados de inmunidad pasiva a través del calostro materno.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para la detección de un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. Estos procedimientos son útiles, por ejemplo, para detectar si un animal tiene un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación, y diagnosticar si un animal puede presentar una infección causada por una especie de *Fusobacterium*. Preferiblemente, dichos sistemas diagnósticos están en forma de un kit. Los procedimientos incluyen poner en contacto un anticuerpo con una preparación que incluye al menos un polipéptido de la presente divulgación para dar como resultado una mezcla. Preferiblemente, el anticuerpo está presente en una muestra biológica, más preferentemente de sangre, de leche o de calostro. El procedimiento incluye adicionalmente incubar la mezcla en unas condiciones que permitan que el anticuerpo se una específicamente a un polipéptido para formar un complejo de polipéptido:anticuerpo. Según se usa en el presente documento, el término "complejo de polipéptido:anticuerpo" se refiere al complejo que se produce cuando un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido. La preparación que incluye los polipéptidos presentes en una composición de la presente divulgación también puede incluir los reactivos, por ejemplo, un tampón, que proporcionen las condiciones apropiadas para la formación del complejo de polipéptido:anticuerpo. A continuación se detecta el complejo de polipéptido:anticuerpo. La detección de anticuerpos es conocida en la materia y puede incluir, por ejemplo, inmunofluorescencia y peroxidasa.

Los procedimientos para la detección de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación pueden usarse en diversos formatos que han sido usados para la detección de anticuerpos, incluyendo radioinmunoensayo y ensayo de inmuoadsorción enzimática.

La presente divulgación también proporciona un kit para la detección de un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. El kit incluye al menos un polipéptido de la presente divulgación en un material de envasado adecuado en una cantidad suficiente para al menos un ensayo. Opcionalmente, también están incluidos otros reactivos, tales como tampones y las soluciones necesarias para llevar a la práctica la invención.

También se incluyen normalmente las instrucciones de uso de los polipéptidos envasados.

- Según se usa en el presente documento, la frase "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para alojar el contenido de un kit. El material de envasado se fabrica mediante unos procedimientos conocidos, preferentemente para proporcionar un entorno estéril exento de contaminantes. El material de envasado tiene una etiqueta que indica que los polipéptidos pueden usarse para la detección de los anticuerpos inducidos por una infección por una especie de *Fusobacterium*. Además, el material de envasado contiene instrucciones que indican cómo se emplean los materiales del kit para la detección de dichos anticuerpos. Según se usa en el presente documento, el término "envase" se refiere a una matriz o un material sólido, tal como vidrio, plástico, papel, aluminio, y similares, capaz de contener en unos límites fijos los polipéptidos. Por lo tanto, por ejemplo, un envase puede ser un pocillo de una placa de microtitulación al que se han fijado cantidades de microgramos de los polipéptidos. Las "instrucciones de uso" normalmente incluyen una expresión tangible que describe la concentración del reactivo o al menos un parámetro del procedimiento de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y de muestra que se van a mezclar, los periodos de tiempo de mantenimiento de las mezclas de reactivo/muestra, la temperatura, las condiciones de tampón, y similares.
- La presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos. Hasta el punto en que cualquiera de los ejemplos contenga materia en cuestión que esté fuera del ámbito de la presente invención, están incluidos simplemente con fines de referencia.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

- Condiciones de cultivo de la especie de *Fusobacterium*

*Fusobacterium* spp. *necrophorum* puede cultivarse en unas condiciones de fermentación controlada de forma que exprese proteínas, incluyendo las proteínas asociadas a la membrana externa. Las bacterias pueden recogerse y a continuación aislarse las proteínas y usarse como inmunógenos en una composición.

- Las condiciones anaerobias para el cultivo de *F. necrophorum* en placas y en pequeños cultivos líquidos fueron establecidas mediante la incubación en un frasco anaeróbico que contiene un sistema generador de gas anaeróbico. Se preparó una solución madre de siembra maestra de *Fusobacterium necrophorum* subesp. *necrophorum* procedente de una oveja y disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de la ATCC 27852, mediante la inoculación de la cepa aislada en 200 ml de caldo de infusión de corazón y cerebro porcino (P-BHI, Difco) que contiene un 0,05 % de cisteína (Sigma) y que contiene entre 15 y 20 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ) de 2,2-dipiridilo (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). El cultivo se cultivó sin agitación durante 16 horas a 37 °C en condiciones anaerobias. Antes de ser cultivado en un cultivo inicial, el *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* fue adaptado para crecer en el quelante de hierro 2,2-dipiridilo mediante subcultivos repetidos de la cepa aislada en concentraciones crecientes del delante de hierro, comenzando a 0,0025  $\mu\text{g/ml}$ , y aumentando hasta 20  $\mu\text{g/ml}$ . Las bacterias se recogieron mediante una centrifugación a 10.000 x g. El sedimento bacteriano se resuspendió en 20 ml de P-BHI que contiene un 20 % de glicerol, y se dispuso estérilmente en viales criogénicos de 2 ml (1 ml por vial) y se almacenó a -90 °C. A la cepa aislada se le asignó el número de identificación MS 040525, y se estableció como una siembra maestra. La siembra maestra se expandió en una siembra de trabajo que a continuación se usó para la producción de las proteínas reguladas por metales.

### Ejemplo 2

- Producción de las proteínas reguladas por metales

- Fermentación: se usó un vial criogénico de la siembra de trabajo (1 ml a  $10^9$  UFC/ml) para inocular 130 ml de P-BHI a 37 °C que contiene 15 microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de 2,2-dipiridilo y un 0,05 % de cisteína (Sigma) y se incubó en un tarro de vela. El cultivo se incubó a 37 °C durante 12 horas, punto en el cual se transfirió estérilmente a 1,3 litros del medio anterior. El segundo cultivo se dejó crecer durante 10 horas adicionales a 37 °C. Este cultivo se usó para inocular un fermentador de 20 litros Bioflo IV bench-top (New Brunswick Scientific Co, Edison NJ) cargado con 13 litros del medio anterior. El pH se mantuvo constante a entre 6,9 y 7,1 mediante una valoración automática con un 30 % de NaOH y un 10 % de HCL. La velocidad de agitación se ajustó a 100 revoluciones por minuto (rpm), y el cultivo se purgó con nitrógeno puro para mantener un estado anaeróbico. El cultivo se dejó crecer de forma continua en estas condiciones durante 24 horas, punto en el cual se terminó la fermentación reduciendo la temperatura del fermentador hasta 10 °C.

- Recogida: la fermentación bacteriana se concentró y se lavó mediante el uso de un conjunto de filtro de flujo tangencial de Millipore Pellicon (Millipore Corporation, Bedford, MA), equipado con una serie de filtros en canal de 2,32 m<sup>2</sup> de pantalla de la serie Alpha 300K Centrasette (Pall Filtron). El volumen original del cultivo de 13 litros se redujo hasta 2,5 litros. El retenido bacteriano se ajustó entonces a 25 litros mediante el uso de solución salina fisiológica (al 0,85 %) y después se concentró de nuevo hasta 2,5 litros para ayudar a eliminar cualquier contaminante no asociado con las células, por ejemplo, las proteínas secretadas. El retenido (2,5 litros) se ajustó a 15 litros mediante el uso de tampón de choque osmótico estéril (OMS) que contiene 7,26 gramos/litro de Tris-base y

0,93 gramos/litro de EDTA ajustado a un pH de 8,5. El retenido se mezcló concienzudamente y se dispensó por igual (3,0 litros en cada uno) en 5 recipientes estériles Nalgene de cuatro litros y se colocaron en un congelador a -20 °C para su almacenamiento. La masa de sedimento se calculó mediante la centrifugación de muestras de 30 ml del cultivo fermentado y la cosecha final. En resumen, los tubos cónicos de 50 ml Nalgene pesados previamente se centrifugaron a 39.000 x g durante 90 minutos en una centrífuga Beckman J2-21 mediante el uso de un rotor JA-21 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Al final del análisis, el sobrenadante se eliminó vertiéndolo y los tubos se pesaron de nuevo. Se calculó la masa de sedimento para cada etapa.

Disrupción (homogeneización): se descongelaron tres litros de la suspensión celular bacteriana congelada en OMS a 4 °C (180 gramos de masa de sedimento). La suspensión del cultivo líquido se transfirió asépticamente a un tanque de procesamiento de 50 litros revestido que contiene 44 litros de OMS a pH 8,5 que contiene 0,1 gramos de timerosal/litro como conservante. El volumen de la suspensión bacteriana se enfrió hasta 4 °C con una mezcla continua durante 18 horas a 200 rpm, momento en el cual se alteró mediante una homogeneización. En resumen, el tanque de 50 litros que contiene la suspensión bacteriana se conectó a un homogeneizador modelo 12.51 H Rannie, (APV Systems, Rosemont, IL). Se conectó un segundo tanque de procesamiento de 50 litros revestido (vacío) al homogeneizador de forma que el líquido del tanque de procesamiento pudiera pasar a través del homogeneizador hacia el tanque vacío y atrás de nuevo, permitiendo múltiples pases de homogeneización mientras todavía se mantenía un sistema cerrado. La temperatura durante la homogeneización se mantuvo a 4 °C. Al comienzo de cada pase, el líquido se hizo circular a 70 psi a través del homogeneizador y atrás de nuevo al tanque original, mientras que la presión del homogeneizador se ajustó a 13.500 psi. Antes del primer pase se extrajeron dos muestras previas a la homogeneización del homogeneizador para establecer un momento inicial para la determinación del grado de disrupción y para la monitorización del pH. El grado de disrupción se controló mediante la comparación de la transmitancia (% de T a 540 nanómetros (nm) a una dilución de 1:100) en comparación con la muestra no homogeneizada. La suspensión bacteriana se hizo pasar tres veces a través del homogeneizador para dar un porcentaje final de transmitancia de entre el 78 - 83 % de T a una dilución de 1:100.

Después de la homogeneización se añadió asépticamente lauroil sarcosinato de sodio (Hamptosil L-30, Chem/Serv, Minneapolis, MN) a la suspensión bacteriana homogeneizada para su solubilización. La cantidad de sarcosina (30 %) añadida equivalía a 0,0664 veces el volumen de solubilización, en litros, (1,0 gramos de sarcosina / 4,5 gramos de masa de sedimento). El tanque de procesamiento se retiró del homogeneizador y se mantuvo a 4 °C con agitación a 240 rpm durante entre 60 - 70 horas.

Recogida de las proteínas: las proteínas insolubles del líquido solubilizado del proceso se recogieron mediante una centrifugación mediante el uso de Sharples T-1, (Alfa Laval Separations, Warminster, PA). En resumen, el homogeneizado solubilizado se suministró a seis Sharples a una velocidad de suministro de 250 ml/minuto a 17 psi con una fuerza centrífuga de 60.000 x g. La temperatura durante la centrifugación se mantuvo a 4 °C. El homogeneizado solubilizado se hizo pasar 2 veces a través de las centrífugas. La proteína se recogió, se resuspendió y se dispensó en 10 litros de tampón Tris a pH 8,5 que contiene un 0,3 % de formalina (Sigma) como conservante.

Diafiltración: la suspensión de proteínas (10 litros) se ajustó a 60 litros mediante el uso de tampón Tris estéril, a pH 8,5. La suspensión se lavó y se dializó mediante el uso de un conjunto de filtro de flujo tangencial de Millipore Pellicon (Millipore Corporation), equipado con una serie de filtros en canal de 2,32 m<sup>2</sup> de pantalla de la serie Alpha 10K Centrasette (Pall Filtron) para eliminar la sarcosina residual. La solución de proteínas se concentró mediante una filtración hasta un volumen objetivo de 10 litros, punto en el cual se añadieron lentamente 50 litros de tampón Tris a pH 7,4 que contiene un 5 % de alcohol isopropílico al concentrado procedente de un segundo tanque de procesamiento. Se cree que el alcohol isopropílico provoca un ligero desplegamiento de la estructura de las proteínas, permitiendo la eliminación de la sarcosina unida sin comprometer la inmunogenicidad de las proteínas. La diafiltración continúa hasta que el pH se estabiliza en 7,4, punto en el cual se añadieron lentamente 50 litros de tampón Tris a pH 7,4 mediante una diafiltración para eliminar el alcohol residual. La suspensión de proteínas se concentró después hasta aproximadamente 5 litros. El concentrado de proteínas se dispensó por igual (500 ml) en diez recipientes estériles de 1 litro Nalgene y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### Ejemplo 3

#### 50 Análisis de las proteínas

El perfil de proteínas de la cepa aislada de *F. necrophorum* subesp. *necrophorum* cultivada en medio con hierro y/o en medio sin hierro se analizó mediante una SDS-PAGE. En resumen, el organismo se cultivó a partir de una solución madre de siembra maestra congelada mediante un subcultivo en 25 ml de P-BHI que contiene un 0,05 % de cisteína (sigma) y entre 15 y 20 microgramos por mililitro (µg/ml) de 2,2-dipiridilo (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) y/o P-BHI que contiene cloruro férrico 200 µM incubado durante 18 horas a 37 °C con agitación a 100 rpm. A las 18 horas de incubación, se transfirieron 5 ml de cada cultivo a 500 ml de medio incubado previamente (37 °C) sin hierro y/o con hierro. Los cultivos se dejaron crecer durante 18 horas a 37 °C con agitación a 100 rpm. A las 18 horas tras la incubación cada cultivo se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100 ml de tampón salino con Tris y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos para eliminar cualquier proteína contaminante del medio. El sedimento bacteriano del medio con hierro y sin hierro se resuspendió en 40 ml de

tampón salino con Tris a pH 7,2 y se alteró mediante la aplicación de ultrasonidos. La suspensión bacteriana alterada se clarificó mediante una centrifugación a 32.000 x g durante 12 minutos. El sobrenadante se recogió y se solubilizó mediante la adición de lauroil sarcosinato de sodio al 4 % vol/vol a 4 °C durante 24 horas. Las proteínas insolubles se recogieron mediante una centrifugación a 32.000 x g durante 2,5 horas a 4 °C. El sedimento de OMP se resuspendió en 200 µl de tampón Tris a pH 7,2 y se almacenó a -90 °C. Se resolvió una muestra de cada extracto en un gel de SDS-PAGE al 10 % para comparar los perfiles proteicos. El gel se escaneó mediante el uso de un densitómetro BioRad GS-800 para comparar la diferencia en el perfil proteico de *F. necrophorum* cultivado en unas condiciones con hierro y sin hierro. El gel escaneado se muestra en la Figura 3.

Se compararon los perfiles de las bandas electroforéticas de las proteínas aisladas a partir de la cepa aislada de *Fusobacterium necrophorum* cultivada en las siguientes tres condiciones: medio con hierro (500 ml de P-BHI que contiene cloruro férrico 50 µM), medio sin hierro (500 ml de P-BHI que contiene 15 µg de 2,2-dipiridilo y un 0,05 % de cisteína) y en unas condiciones de fermentación controladas (las condiciones de fermentación sin hierro del Ejemplo 2). Los resultados revelaron unos perfiles de bandas idénticos para cada muestra cultivada en las condiciones sin hierro. Se observaron varias proteínas reguladas por metales que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 82,9 kDa, 79,3 kDa, 65,4 kDa, 49 kDa, 39 kDa, 38,5 kDa, 31 kDa y 27,9 kDa y proteínas no reguladas por hierro que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 45,2 kDa, 40,4 kDa, 39,9 kDa y 33,6 kDa. Varias proteínas reguladas por metales que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 140,5 kDa, 72,9 kDa, 42,7 kDa y 33 kDa parecían estar aumentadas o reguladas por aumento cuando se cultivaban en unas condiciones sin hierro en comparación con la misma banda expresada en unas condiciones con hierro.

#### 20 Ejemplo 4

Expresión de proteínas por parte de las cepas aisladas de campo

Para determinar si existían diferencias en el perfil de bandas entre las cepas aisladas de campo de *Fusobacterium* se llevó a cabo el siguiente estudio. Se recogieron hígados bovinos a partir de numerosos carniceros comerciales que tenían unos grandes focos necróticos. Cada foco se subcultivó anaeróbicamente en placas de agar sangre. Se aislaron supuestas colonias de *Fusobacterium* y se caracterizaron química y nutricionalmente mediante el uso de los kits de ensayo de identificación API 20-A (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Se recogieron seis cepas aisladas (las cepas aisladas 1248, 1250, 1251, 1252, 1253 y 1255) y se identificaron como *Fusobacterium necrophorum/nucleatum*. Las cepas aisladas se cultivaron según se ha descrito en el Ejemplo 3, y una muestra de cada extracto se resolvió en un gel de SDS-PAGE al 10 % para comparar el perfil proteico obtenido a partir de cada cepa aislada cultivada en medio con hierro y sin hierro. El gel se escaneó mediante el uso de un densitómetro BioRad GS-800 para comparar la diferencia en el perfil proteico de las cepas aisladas cultivadas en unas condiciones con hierro y sin hierro. Los resultados revelaron unos perfiles de bandas idénticos para cada cepa aislada cultivada en unas condiciones sin hierro. Se observaron varias proteínas reguladas por metales que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 82,9 kDa, 79,3 kDa, 65,4 kDa, 49 kDa, 39 kDa, 38,5 kDa, 31 kDa y 27,9 kDa y proteínas no reguladas por hierro que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 45,2 kDa, 40,4 kDa, 39,9 kDa y 33,6 kDa. Otras diversas bandas que tienen unos pesos moleculares de aproximadamente 140,5 kDa, 72,9 kDa, 42,7 kDa y 33 kDa parecían estar aumentadas o reguladas por aumento cuando se cultivaban en unas condiciones sin hierro en comparación con la misma banda expresada en unas condiciones con hierro. Los perfiles de las bandas de las cepas naturales aisladas de campo de *Fusobacterium* parecían no variar con respecto a la cepa aislada del ATCC del ejemplo 3. Esto fue sorprendente e inesperado en vista de las diferencias en los supuestos sistemas de captación de hierro observadas recientemente entre 2 especies de *Fusobacterium* (Kapatral et al., Genome Res., 13, 1180 - 1189 (2003)).

#### 40 Ejemplo 5

Preparación de las composiciones inmunizantes derivadas de *Fusobacterium necrophorum*

Se usó la composición elaborada a partir de *F. necrophorum* según se ha descrito en el ejemplo 1 para preparar una vacuna. Se preparó una solución madre de vacuna a partir de la composición mediante la dilución del antígeno en suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contiene 8,0 g/l de NaCl, 0,2 g/l de KCl, 1,44 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,24 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7,4 que contiene un 10 % de hidróxido de aluminio (Rehidrogel, Reheis Chemical Company Berkeley Heights, NJ). Después se emulsionó la suspensión de hidróxido de aluminio (500 µg de proteína total/ml) en el adyuvante comercial EMULSIGEN, (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) mediante el uso de un recipiente de homogeneización IKA Ultra Turrax T-50 (IKA, Cincinnati, OH). Se administró una dosis de ratón para dar una dosis final de 50 µg de proteína total en un volumen inyectable de 0,1 ml con una concentración de adyuvante del 22,5 % vol/vol. Se preparó un placebo mediante la sustitución del antígeno por solución salina fisiológica en la formulación anterior y emulsionando la suspensión en EMULSIGEN para dar una concentración de adyuvante del 22,5 %.

#### 55 Ejemplo 6

Vacunación de los ratones

La eficacia de la vacuna de *Fusobacterium necrophorum* se llevó a cabo frente a una exposición virulenta viva en ratones. Se distribuyeron por igual treinta (N = 30) ratones hembra CF-1 obtenidos en Harlan Breeding Laboratories

(Indianapolis, IN) con un peso de 16 - 22 gramos en dos grupos (15 ratones/grupo). Los ratones se alojaron en jaulas para ratón de policarbonato (Ancore Corporation, Bellmore, NY). Los grupos se designaron como Grupo-1 (placebo) y Grupo-2 (vacunado). A todos los ratones se les suministró alimento y agua *ad libitum*. Los ratones fueron vacunados por vía intraperitoneal tres veces a intervalos de 14 días. El volumen administrado fue de 0,1 ml/ratón.

## 5 Ejemplo 7

Preparación del organismo para la exposición

Se usó la cepa aislada de *F. necrophorum* como se ha descrito anteriormente para la exposición. En resumen, la cepa aislada procedente de una solución madre congelada (ejemplo 1) se sembró con estrías en una placa de agar sangre y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Se subcultivaron varias colonias en 50 ml de P-BHI que contiene 15 µg/ml de 2, 2' dipiridilo y un 0,05 % de cisteína. El cultivo se incubó a 37 °C durante 16 horas y después se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las bacterias. El sedimento bacteriano se lavó una vez mediante una centrifugación (10.000 x g durante 15 minutos) a 4 °C. El sedimento final se resuspendió en 25 ml de P-BHI sin dipiridilo. Justo antes de la exposición se diluyó sucesivamente 1 ml de la anterior suspensión bacteriana diez veces para contar el número de UFC/dosis.

## 15 Ejemplo 8

Exposición

Catorce días después de la tercera vacunación, los ratones de los grupos 1 y 2 fueron expuestos intraperitonealmente a 0,1 ml de *F. necrophorum* ( $3,0 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias) preparado según se ha descrito en el ejemplo 6. Se registró diariamente la mortalidad durante 4 días después de la exposición. A los cuatro días después de la exposición se terminó el ensayo experimental. Todos los ratones supervivientes de cada grupo fueron sacrificados con dióxido de carbono. Se extrajo asépticamente el hígado de cada ratón y se realizó un análisis a simple vista para determinar diferencias en los focos necróticos. Después se maceró la totalidad del lóbulo derecho de cada hígado, se pesó individualmente y se ajustó para dar una dilución a 1:10 en peso:volumen por muestra. Cada muestra se diluyó sucesivamente diez veces y se colocó por duplicado en placas de agar sangre para contar las diferencias en el número de bacterias de *F. necrophorum* por hígado entre los grupos.

Resultados

Los resultados mostraron un fuerte índice de protección frente a la exposición sistémica, según se observa en la Tabla 1 y en la Figura 1. Doce de los 15 (un 80,0 %) de los ratones vacunados con placebo (Grupo 1) murieron en los 4 días posteriores a la exposición. Por el contrario, únicamente 4 ratones de los 15 (un 26,7 %) murieron en el Grupo 2 (grado de significación de  $P = 0,0046$ ).

Grupos de tratamiento	nº de ratones	nº de muertes	<sup>a</sup> Porcentaje de mortalidad (%)
Grupo 1 (placebo)	15	12/15	80,0
Grupo 2 (vacunados)	15	4/15	26,7

<sup>a</sup> Porcentaje de ratones que murieron 4 días después de la exposición IP a  $3,0 \times 10^8$  ufc de *F. necrophorum*. El grado de significación de la mortalidad entre el grupo vacunado en comparación con el grupo con placebo era de  $P = 0,0046$  determinado mediante una prueba exacta de Fisher.

El análisis a simple vista de cada hígado reveló una diferencia drástica en el número de placas necróticas visibles entre los ratones con placebo y los vacunados. Era claramente evidente que los ratones a los que se les administró la vacuna redujeron rápidamente el número de bacterias capaces de proliferar con éxito en la circulación sistémica, según indicaba la reducción en los focos necróticos visibles en comparación con los ratones vacunados con placebo. Esto se corrobora adicionalmente en los resultados que comparan la diferencia entre la eliminación cuantitativa de *F. necrophorum* de los hígados entre los ratones vacunados y los vacunados con placebo, según se observa en la Figura 2. La diferencia en el número de bacterias en los hígados de los controles vacunados con placebo y en el grupo vacunado era muy estadísticamente significativa (grado de significación de  $P = 0,041$ ), lo que sugiere una mayor eliminación cuantitativa de *F. necrophorum* en los hígados de los ratones vacunados. Las unidades formadoras de colonias medias expresadas como  $\log_{10}$  eran de 4,72 en el grupo vacunado con placebo en comparación con el recuento logarítmico medio de 2,97 en el grupo vacunado. Esto es una reducción del 95 % en el número de bacterias en el grupo vacunado cuando se compara con el grupo con placebo.

La composición de vacuna mostró un alto grado de protección sistémica en comparación con los ratones no vacunados del Grupo 1 (vacunados con placebo). La vacuna preparada a partir de *F. necrophorum* era muy eficaz en la prevención de la mortalidad asociada con una exposición mortal a *F. necrophorum* en un modelo de ratón estandarizado, así como en la reducción de la formación de focos necróticos y en el número de unidades formadoras

de colonias en el hígado.

### Ejemplo 9

Disminución en el cultivo sanguíneo de *Fusobacterium necrophorum* tras una exposición intravenosa que compara novillos Holstein vacunados y no vacunados

- 5 El fin de este estudio incluía la evaluación de la capacidad de la composición derivada de *F. necrophorum* para disminuir el número de unidades formadoras de colonias en la sangre del organismo expuesto. La composición inmunizante se preparó a partir de *F. necrophorum* según se ha descrito en el Ejemplo 5, excepto por la siguiente modificación; se calculó una dosis bovina para dar una dosis final de 1.000 µg de proteína total en un volumen inyectable de 2 ml (500 µg/ml).
- 10 Se distribuyeron aleatoriamente seis novillos (N = 6) con un peso medio de aproximadamente 136 kg en un único redil. Los novillos fueron etiquetados en la oreja para su identificación y se ubicaron aleatoriamente en dos grupos designados como los grupos 1 y 2 (3 novillos/grupo de tratamiento). Los novillos del grupo 1 fueron designados como no vacunados y permanecieron como el grupo de control no vacunado. Los novillos del grupo 2 fueron vacunados dos veces en intervalos de 14 días. La eficacia de la composición fue evaluada mediante la recolección de datos con los siguientes parámetros de resultados: 1) se evaluó la potencia de la composición inmunizante por su capacidad para disminuir el número de unidades formadoras de colonias de *F. necrophorum* en sangre después de una exposición intravenosa en comparación con los novillos no vacunados, 2) la comparación de la morbilidad clínica entre los vacunados y los no vacunados, y 3) los cambios histopatológicos en los hígados entre los novillos vacunados y los no vacunados.

### 20 Ejemplo 10

Recolección de las muestras sanguíneas

- Se recogieron muestras sanguíneas de todos los novillos en el momento de la primera vacunación (antes de la exposición); 14 días después de la segunda vacunación (hiperinmunizados) y de nuevo 14 días después de la exposición. La sangre recogida de los novillos no vacunados a los 14 días después de la exposición se designó como suero de convalecencia, y la sangre recogida a partir de los novillos vacunados a los 14 días después de la exposición se designó como suero vacunado/expuesto. Toda la sangre se recogió en tubos de recolección vacutainer estériles de 13 x 75 milímetros (SST N° 369783, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Después de coagular la sangre, los tubos se centrifugaron a 800 x g durante treinta minutos y se congelaron a -20 °C.

### Ejemplo 11

#### 30 Exposición

- Catorce días después de la segunda vacunación, los novillos de los grupos 1 y 2 fueron expuestos intravenosamente a 1,0 ml de *F. necrophorum* ( $2,4 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias) preparado según se ha descrito en el ejemplo 7. Se recogieron muestras sanguíneas a las 4, 12 y 24 horas después de la exposición intravenosa para contar el número de unidades formadoras de colonias de *Fusobacterium* entre los vacunados y los no vacunados. En resumen, se recogió una muestra de sangre de 10 ml de la vena yugular de cada novillo a las 4, 12 y 24 horas después de la exposición y se colocó inmediatamente en 90 ml de caldo de cultivo sanguíneo BBL Septic-Check Columbia (Becton Dickinson, MD). Cada muestra se diluyó sucesivamente diez veces y se colocó por duplicado en placas de agar sangre para contar las diferencias en el número de bacterias de *F. necrophorum* por mililitro de sangre entre los grupos experimentales.
- 40 A las 4, 12 y 24 horas después de la exposición, era claramente evidente que la vacuna redujo rápidamente el número de bacterias de *F. necrophorum* capaces de proliferar con éxito en la circulación sistémica de los novillos vacunados cuando se comparaban con los no vacunados (Tabla 2, Figura 4).

Horas después de la exposición	Log 10 UFC de <i>F. necrophorum</i>	
	Grupo 1 (no vacunados)	Grupo 2 (vacunados)
4 horas	5,6	2,2
12 horas	4,0	0
24 horas	1,9	0

<sup>a</sup> Disminución en el número de unidades formadoras de colonias de *Fusobacterium necrophorum* después de la exposición intravenosa a  $2,4 \times 10^8$  UFC de *F. necrophorum* que compara la eficacia en los novillos vacunados con los controles no vacunados.

Según indica la reducción en el número de unidades formadoras de colonias del organismo expuesto en cada periodo de muestreo, los resultados demuestran claramente que la composición era muy eficaz. Los resultados demuestran que la vacunación redujo el número de organismos infecciosos capaces de proliferar con éxito en la circulación sistémica del hospedador. Esta disminución en la dosis infecciosa también reduciría la capacidad del organismo de inducir una enfermedad clínica o de manifestar los síntomas clínicos, principalmente mediante una reducción de la carga sistémica del organismo infeccioso. Esto se observa claramente en la tabla 1 y en la figura 4.

### Ejemplo 12

#### Morbilidad

Los novillos de los grupos 1 y 2 se observaron visualmente diariamente durante 21 días después de la exposición para evaluar anomalías clínicas o signos de enfermedad. Durante el periodo de observación, ninguno de los novillos vacunados mostró ningún signo clínico ni síntoma de enfermedad. Por el contrario, todos los novillos no vacunados estaban visiblemente afectados por la exposición intravenosa. En las 24 horas posteriores a la exposición, los no vacunados dejaron de beber y comer y se volvieron letárgicos, menos agresivos y deprimidos. Una semana después de la exposición todos los novillos no vacunados comenzaron a mostrar un alto grado de debilidad caracterizado por una reducción en la actividad al levantarse y al moverse, adoptando unas posturas inusuales, anormales, que incluyen flaccidez, decaimiento, rigidez y una ausencia de flexión, particularmente en las articulaciones de los espaldones y de las rodillas. A los catorce días después de la exposición todos los novillos no vacunados mostraban una gran dificultad para caminar y/o para permanecer erguidos. De nuevo, estas observaciones se correlacionan bien con la capacidad observada de la vacuna para disminuir la carga de la exposición de la dosis infecciosa sistemáticamente, previniendo así la diseminación del organismo de la exposición en múltiples sitios tisulares.

### Ejemplo 13

#### Terminación del ensayo y conclusión

A los 21 días después de la exposición intravenosa, los terneros fueron sacrificados mediante una inyección mortal y se terminó el ensayo. Durante este periodo de tiempo, los novillos no vacunados nunca recuperaron su estado de salud en comparación con los novillos vacunados. Tras un análisis visual a simple vista, los novillos vacunados tenían un mayor peso corporal en comparación con sus compañeros no vacunados. Los resultados mostraron una diferencia positiva en el peso debida a la vacunación, probablemente debida al control de la infectividad del organismo de la exposición.

El análisis *post-mortem* no reveló diferencias anormales en los órganos internos. Se extrajeron los hígados y se analizaron para evaluar los focos necróticos mediante una disección. No pudieron observarse focos necróticos ni lesiones visibles en ninguno de los hígados tras un análisis a simple vista. Cada hígado se diseccionó y las secciones se extrajeron para un análisis histológico, para determinar si podían observarse anomalías o cambios debidos a la exposición intravenosa entre los novillos vacunados y los no vacunados. El análisis hepático de las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina y eosina revela cambios microscópicos en los controles no vacunados. Los novillos no vacunados mostraron un abanico de patologías, desde pequeños focos de inflamación de linfocitos hasta focos pronunciados con necrosis y hemorragia. Los abscesos hepáticos eran lo suficientemente grandes como para ser observables mediante una observación visual si se deja continuar la infección. Dichas patologías normalmente no se observan en los novillos vacunados.

Estos resultados demuestran claramente que la vacunación con la composición según se describe en los Ejemplos 8 y 10 disminuye la carga del organismo de la exposición sistemáticamente, lo que redujo la morbilidad global de la enfermedad y disminuyó la necrosis hepática del hígado.

### Ejemplo 14

#### Identificación de proteínas de membrana serorreactivas de *F. necrophorum* mediante el uso de un análisis por inmunotransferencia Western

Las proteínas de la composición de vacuna según se ha descrito en el Ejemplo 5 se sometieron a una electroforesis seguida de un análisis por inmunotransferencia western con suero hiperinmunizado según se ha descrito en el Ejemplo 10. En resumen, las proteínas de membrana derivadas de *F. necrophorum* cultivadas en unas condiciones limitantes de hierro fueron fraccionadas por tamaños en un gel de SDS-PAGE mediante el uso de un gel adherente al 4 % y de un gel de resolución al 10 %. Se combinaron 10 µl de muestra con 30 µl de tampón reductor de muestra de SDS (Tris-HCL 62,5 mM a pH 6,8, glicerol al 20 %, SDS al 2 %, β-mercaptoetanol al 5 %) y se hirvieron durante 4 minutos. Las muestras se electroforetizaron a una corriente constante de 18 mA durante 5 horas a 4 °C mediante el uso de una celda Protein II xi y una fuente de energía modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, Richmond, CA). La migración de las bandas se visualizó mediante el uso de estándares de caleidoscopio de amplio espectro (BioRad) para ayudar en la electroinmunotransferencia, mientras que se usaron estándares biotinilados de amplio espectro como referencias de peso molecular para la inmunotransferencia, véase la Figura 5. Para el análisis por inmunotransferencia Western, las proteínas se electrotransfirieron desde el gel a membranas de inmunotransferencia de nitrocelulosa (BioRad) durante una noche, a 4 °C a 50 V, en tampón Towbin (Tris 25 mM,

glicina 192 mM, metanol al 20 %) mediante el uso de una celda de transferencia BioRad TransBlot y una fuente de energía Pac 300 (BioRad). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó mediante el uso de gelatina de pescado al 3 % (Sigma Chemical, St. Louis, Mo) en solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) durante 1 hora con agitación a 37 °C. La membrana se secó a 37 °C y se bloqueó con TBS que contiene gelatina de pescado al 3 %, y se repitió este proceso. Después la membrana se sondeó con los sueros policlonales hiperinmunizados recogidos a partir de los novillos inmunizados según se ha descrito en el ejemplo 10. El anticuerpo primario se diluyó a 1/2.500 en TBS que contiene gelatina de pescado al 1 %, Tween 20 al 0,05 % y azida de sodio al 0,2 % (tampón de anticuerpo). La membrana se incubó con la solución de anticuerpo primario durante una noche en un agitador a la temperatura ambiente. Después la membrana se lavó dos veces con TBS que contiene Tween 20 al 0,05 % (TTBS) y se transfirió al tampón de anticuerpo que contiene una dilución 1/10.000 del clon BG-18 de IgG anti-bovina de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) y una dilución a 1/3.000 de avidina conjugada con fosfatasa alcalina (BioRad). La membrana se incubó a 37 °C durante 2 horas en un agitador, después se lavó con TTBS cuatro veces para eliminar el conjugado no unido. El transferido se resolvió en solución de sustrato que contiene reactivo colorante A y B de fosfato alcalino en 1x AP de tampón de desarrollo de color (BioRad) durante 30 min a 37 °C en un agitador. El inmunotransferido Western resultante fue documentado mediante el uso de un densitómetro BioRad GS-800 (véase la Figura 5 B).

El fin de este análisis era determinar cuáles de las proteínas presentes en la composición inmunizante inducían respuestas de anticuerpos después de la inmunización de los novillos. Los resultados revelaron reactividad inmunológica, con bandas en las regiones de 82,9 kDa, de 65,4 y de 49 kDa, así como bandas en los intervalos de 45,2 kDa - 38,5 kDa y de 31 kDa - 27,9 kDa. Estos resultados demostraron que las proteínas de membrana de la composición descritas en el Ejemplo 3 reaccionaban con fuerza con los sueros hiperinmunizados descritos en el Ejemplo 10, lo que sugiere que estos componentes de la vacuna pueden proporcionar protección frente a la enfermedad. El resto de las proteínas con unos pesos moleculares aproximados (en kDa) de 140,5, de 72,9, de 42,7, de 40,4, de 39,9, de 33,6 y de 33, no mostraron ninguna reactividad frente a los sueros hiperinmunizados. Sin embargo, los límites de sensibilidad del ensayo pueden haber impedido la detección de unas interacciones más débiles que, aunque menos evidentes, todavía pueden contribuir a la eficacia de la vacuna al aumentar la respuesta inmunitaria frente a la composición. Además, las proteínas que no eran serorreactivas en este ensayo pueden desencadenar respuestas diferentes a la producción de anticuerpos, tales como la estimulación de citocinas, de interferón, de interleucinas, de linfocitos T o de factores estimulantes de colonias. Dichas respuestas podrían mejorar, dirigir o restaurar la capacidad del sistema inmunitario del hospedador para luchar contra la enfermedad.

### Ejemplo 15

Procedimientos para la identificación de las proteínas de membrana derivadas de *Fusobacterium* mediante el uso de una cromatografía líquida de alta presión en fase inversa

La composición de vacuna descrita en los Ejemplos 1 y 5 consiste en múltiples proteínas de membrana derivadas de *Fusobacterium* cultivadas en unas condiciones restrictivas en hierro. Con objeto de identificar qué proteínas de la composición son eficaces, se llevaron a cabo experimentos para separar estas proteínas para ensayar su antigenicidad individual. Inicialmente se investigó en nuestro laboratorio una electroforesis bidimensional tradicional como un procedimiento para separar las proteínas de membrana derivadas de una bacteria gramnegativa cultivada en unas condiciones limitadas en hierro. El procedimiento demostró tener un éxito limitado, dado que muchas de las grandes proteínas de membrana no pudieron ser separadas mediante este procedimiento. Para conseguir una mejor separación de las proteínas y una clarificación adicional de los antígenos objetivo de la vacuna, se estandarizaron procedimientos para la utilización de una cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RP-HPLC) basada en la hidrofobicidad, y se han usado para separar las proteínas de membrana derivadas de *Fusobacterium* y de otras bacterias gramnegativas cultivadas en unas condiciones restrictivas en hierro. En resumen, las proteínas de membrana se prepararon según se ha descrito en el Ejemplo 1. Las proteínas se solubilizaron en tampón de solubilización de membrana (urea 5 M, tiourea 2 M, glicerol al 10 %, 2,5 % p/v de sulfonato de N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, Tris 50 mM, n-octilglucósido al 2 %, clorhidrato de Tris-(carboxietil) fosfina 5 mM, inhibidor de la proteasa 1 mM) durante 24 h a 4 °C. Para la separación de las proteínas se usó un procedimiento de cromatografía líquida bidimensional (CL 2-D). La primera dimensión era una CL de cromatoenfoco, mediante el uso de una columna HPCF-1D (Eprogen, Darien, IL) y de una HPLC System Gold (Beckman Coulter, Buckinghamshire, Inglaterra). El gradiente de pH se generó mediante el uso de un tampón inicial (SB) y un tampón de elución (EB). El SB consistía en urea 6 M y Bis-Tris 25 mM, ajustado a pH 8,5 con ácido iminodiacético. El EB consistía en urea 6 M, un 10 % de Polybuffer™ 74 (Amersham Biosciences), ajustado a pH 4,0 con hidróxido de amonio. Antes de la aplicación de la muestra, se preparó la columna de HPCF-1D mediante un lavado de 1 hora con agua seguido de un equilibrado con 10 volúmenes de SB hasta que el pH del efluente era de 8,5. Después se aplicó la muestra y se estableció un gradiente de pH mediante la adición del EB a la columna a 0,2 ml/min. El pH del efluente de la fase móvil se monitorizó en línea mediante el uso de una celda de flujo de pH postdetector con un volumen muerto de aproximadamente 150 µl. Las fracciones se recogieron cada 0,3 unidades de pH mediante el uso de un recolector de fracciones. Se recogió un total de 26 fracciones de la columna de cromatoenfoco. Las separaciones se monitorizaron mediante la medición de la absorbancia (a 280 nm) de las fracciones eluidas. La segunda dimensión de la CL 2-D es una HPLC en fase inversa no porosa. Las separaciones se realizaron con una columna de RP-HPLC empaquetada con microesferas de sílice C-18 no porosa 1,5 µM (ODS-IIE, Eprogen) con un caudal de 700 µl/min. Se usó un gradiente de dos disolventes. El disolvente A consistía en agua nanopura con un 0,1 % de ácido

5 trifluoroacético (TFA), y el disolvente B consistía en acetonitrilo (ACN) con un 0,08 % de TFA. El gradiente se ejecutó con el siguiente esquema: un 5 - 25 % del disolvente B en 1 min; un 25 - 31 % de B en 1 min; un 31 - 37 % de B en 8 min, un 37 - 41 % de B en 8 min; v41 - 67 % de B en 8 min; un 67 - 100 % de B en 2 min; B al 100 % durante 1 min, y un 100 - 5 % de B en 1 min. Los perfiles de elución se monitorizaron a 214 nm. Las fracciones se recogieron y se almacenaron a -90 °C en placas de microtitulación de 96 pocillos.

### Ejemplo 16

Cribado del antígeno objetivo en las fracciones de la RP-HPLC mediante el uso de un dot-ELISA

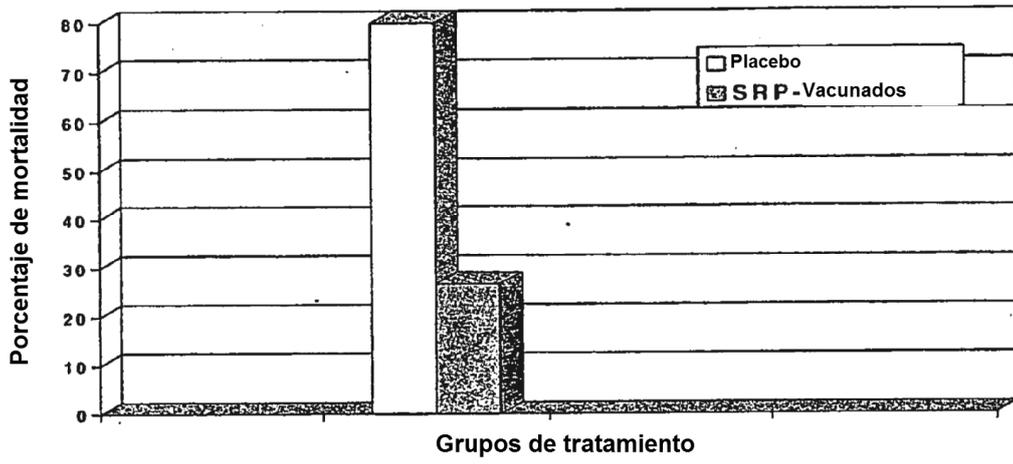
10 Cada fracción será cribada para buscar potenciales antígenos objetivo de la vacuna mediante el uso de un dot-ELISA de 96 pocillos. En resumen, se usarán los sueros bovinos derivados de *Fusobacterium* de novillos convalecientes, hiperinmunizados, vacunados/expuestos y sólo expuestos para cribar las fracciones individuales según se ha descrito en el Ejemplo 15. Las membranas de nitrocelulosa (1620117, de 0,45 µm BioRad, Richmod CA) se lavan con tampón salino con Tris (TBS) durante 5 minutos y se puntean con papel Whatman #5 para eliminar el exceso de TBS. Después se coloca la membrana de nitrocelulosa en un colector de 96 pocillos Bio-Dot (BioRad).  
15 Las fracciones (2 µl) según se ha descrito en ejemplo 15 se puntean cuidadosamente en cada pocillo (muestras por duplicado) y se dejan secar a la temperatura ambiente. Después del secado de la nitrocelulosa, la membrana se bloquea mediante el uso de gelatina de pescado al 4 % (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) preparada en TBS para bloquear los sitios de unión no específicos. La membrana se incuba a 37 °C con agitación constante a 100 rpm en un agitador de plataforma. Después de la incubación, la mezcla de bloqueo se aspira y los pocillos se lavan 4 veces con TBS que contiene Tween-20 al 0,05 % y gelatina de pescado al 1 %. A cada pocillo se añadirán los sueros diluidos a 1:200 (100 µl). La membrana se incuba durante 1 hora a 37 °C, punto en el cual el suero se elimina mediante aspiración y la membrana se lava 4 veces. A cada pocillo se añade (100 µl) el clon BG-18 de IgG anti-bovina de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido óptimamente, después se incuba durante 2 horas a 37 °C con agitación a 100 rpm. La solución de conjugado se aspira y los pocillos se lavan 4 veces. A cada pocillo (100 µl) se añade sustrato PnPP (Sigma) preparado en tampón de glicina 0,1 M. El sustrato se deja reaccionar  
20 durante 45 minutos a 37 °C. Se retira la membrana y la reacción se termina mediante una inmersión en NaOH 3 N. La membrana se escanea mediante el uso de un densitómetro BioRad GS-800 para evaluar qué fracciones han reaccionado con los sueros hiperinmunizados o han dado una reacción positiva definida como un punto coloreado. Las fracciones que dan reacciones positivas se registran, y cada proteína se identifica adicionalmente mediante la huella molecular de la masa de péptidos con una MALDI-TOF-MS.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para el aislamiento de polipéptidos a partir de una especie de *Fusobacterium* que comprende:
  - 5   incubar una especie de *Fusobacterium* en un medio que comprende 15 - 20 µg/ml de 2,2-dipiridilo;
  - alterar la especie de *Fusobacterium* para dar como resultado una mezcla que comprende membranas celulares rotas;
  - solubilizar la mezcla mediante la adición a la mezcla de un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende polipéptidos solubilizados y no solubilizados; y
  - aislar los polipéptidos no solubilizados.
- 10  2. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el acoplamiento de un polipéptido portador a al menos uno de los polipéptidos aislados.

Figura 1



**Figura 2**

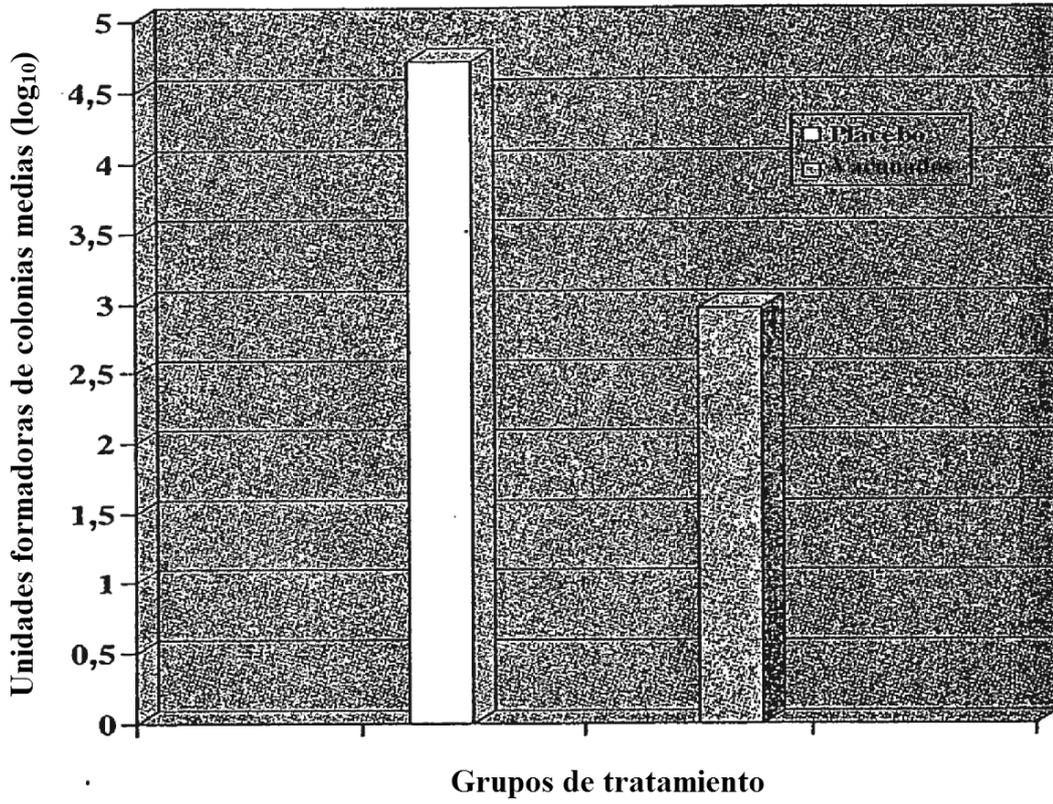


Figura 3

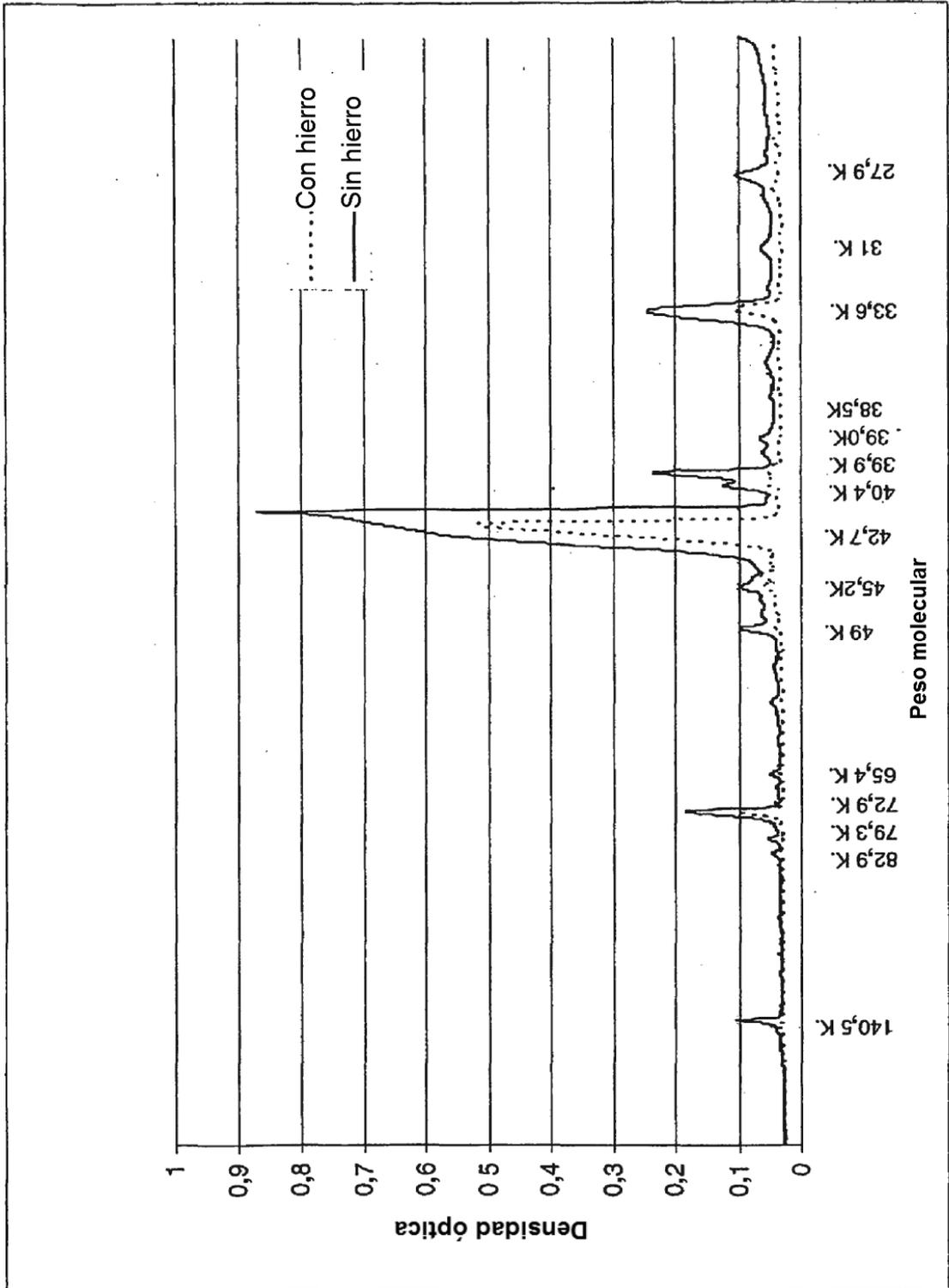


Figura 4

