



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 511**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/38 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95911683 .1**

86 Fecha de presentación : **09.02.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0749321**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.1996**

54 Título: **Inmunización activa utilizando una proteína receptor de sideróforo.**

30 Prioridad: **09.02.1994 US 194040**
08.02.1995 US 385273

73 Titular/es: **Epitopix L.L.C.**
3735 County Road 5
Willmar, Minnesota 56201, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

72 Inventor/es: **Emery, Darryll A. y**
Straub, Darren E.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

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

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

Inmunización activa utilizando una proteína receptor de sideróforo.

5 Antecedentes de la invención

El impacto económico de las enfermedades infecciosas en la industria de aves de corral es bien-apreciado. La inmunización de las aves ha ayudado a reducir el costo de la producción por la disminución de la incidencia de enfermedades gastrointestinales, respiratorias y sistémicas. Mientras las vacunas proveen una adecuada inmunidad para aquellos patógenos contra la que una parvada ha sido inmunizada, hay pocas vacunas que puedan proveer una protección cruzada de amplio rango contra enfermedades imprevistas o contra aquellas enfermedades para las cuales un animal no haya sido vacunado específicamente.

Un número de enfermedades importantes de aves de corral domésticas se ocasionan por bacterias capaces de invadir tejidos huésped, tales como *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.* y *Pasteurella spp.* Mientras muchas vacunas están disponibles para la inmunización contra especies y serotipos individuales, ninguna provee la protección cruzada o estimula la inmunidad de amplio rango contra serotipos, especies o géneros múltiples.

Un factor esencial requerido para que una bacteria cause una enfermedad clínica, es la capacidad de proliferar exitosamente en un tejido huésped. El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento de las bacterias gram-negativas *in vivo*, pero virtualmente no está disponible en tejidos de mamífero y/o aviar porque el hierro es tanto intracelular como extracelular, en complejos con alta afinidad, las proteínas de enlace-hierro, por ejemplo, transferrina en sangre y lactoferrina en secreciones externas. En tejidos normales, la concentración de hierro es aproximadamente 10^{-18} M, lejos debajo de aquellos requeridos para el crecimiento bacteriano. Para circunvenir estas condiciones restrictivas, las bacterias patógenas han evolucionado los sistemas de transporte de hierro de alta afinidad producidos bajo condiciones bajas de hierro, que consisten de quelantes de hierro férrico específicas, "sideróforos", y proteínas de membrana exterior hierro-regulado (IROMPs) y/o proteínas receptor de sideróforo (SRPs) las cuales son receptores para sideróforos en la membrana exterior de la célula bacteriana. Los sideróforos se sintetizan por y se secretan de las células de bacterias gram-negativas bajo condiciones de hierro bajas. Los sideróforos son proteínas de peso molecular bajo del orden en masa molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 MW, que quelan el hierro férrico y luego unen las IROMPs en la membrana bacteriana exterior que, a su vez, transporta el hierro en la célula bacteriana. Aunque el uso de las IROMPs como inmunógenos ha sido considerado, estas proteínas no se han examinado para tal uso, al menos en parte, debido a una incapacidad para extraer estas proteínas de las membranas bacterianas en un volumen alto y con un nivel deseado de pureza y calidad inmunogénica.

Por consiguiente, un objeto de la invención es proporcionar un método de obtención de cantidades altas de proteínas receptor de sideróforo calidad inmunogénica a partir de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, y otras bacterias gram-negativas. Otro objeto es proporcionar una vacuna para la inmunización de aves de corral y otros animales contra esta bacteria. No obstante otro objeto es proporcionar una vacuna para la protección cruzada contra múltiples serotipos, especies y/o géneros de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y/o *Pasteurellaceae*. Un objeto adicional es proporcionar un ensayo de diagnóstico para monitorear y/o perfilar la asepsia y la subenfermedad clínica causada por las bacterias gram-negativas bajo condiciones de campo.

Una variedad de aproximaciones para proporcionar una vacuna o una terapia contra enfermedades causadas por bacterias gram negativas, en donde la vacuna o terapia se relacionan con la absorción del hierro, han sido reveladas.

EP 0 287 206 se refiere a una vacuna contra la pasteurellosis la cual se obtiene de *Pasteurella* que crece bajo condiciones restringidas de hierro. Lo último contribuye a la formación de un material proteínico que no se encuentra en el crecimiento en *Pasteurella* bajo condiciones normales. Los extractos obtenidos de tal *Pasteurella* son más inmunogénicos que los extractos correspondientes del crecimiento de *Pasteurella* bajo condiciones normales, haciéndolos una vacuna más efectiva para las ovejas y el ganado.

La Aplicación de la Patente Canadiense CA 2, 029,906 revela una vacuna contra la bacteria septicémica, preparaciones antigénicas y vectores para la producción de estas y los procesos relacionados de estos. El contenido de hierro en el medio de crecimiento es fuertemente reducido por el uso de una proteína quelante de hierro tal como lactoferrina, i.e. a un nivel bajo en el cual los sideróforos y/o transferrinas se expresan por la bacteria respectiva. Las bacterias obtenidas por este proceso pueden ser utilizadas como una vacuna, bajo la administración del organismo huésped que generará los anticuerpos que previenen el reconocimiento específico de los sideróforos de las bacterias gram negativas infecciosas.

Choi-Kim *et al.* ("Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*"; *vet Microbiol.* 1991 Jun; 28(1):75-92) describe que el crecimiento de *Pasteurella multocida* bajo condiciones restringidas de hierro expresa las proteínas de membrana-exterior hierro-relacionado (IROMP). Además muestran que el suero de la fase convaleciente obtenido de los patos que han sobrevivido a la pasteurellosis contiene anticuerpos que reaccionan intensamente con estas IROMPs. Adicionalmente, las Bacterias que expresan IROMPs debido a las condiciones restringidas de hierro muestran el mayor enlace para *Pasteurella*-sideróforos ^{59}Fe -marcado, dicha reacción que se bloquea por el suero de la fase convaleciente mencionada arriba obtenido de los pavos que contienen los anticuerpos respectivos.

Glisson *et al.* ("Cross-protección studies with *Pasteurella multocida* bacterins prepared from bacteria propagated in hierro-depleted medium"; Avian Dis. 1993 Oct-Dec; 37(4):1074-9) han encontrado que las cepas de *Pasteurella multocida* de origen aviar expresan las proteínas de la membrana adicionales cuando se cultivan en presencia de los quelantes de hierro dipiridil o Chelex 100. Las aves de corral que se vacunaron con emulsiones de aceite inactivadas de bacterias que contienen estas proteínas de la membrana sin embargo no se protegieron mejor contra el desafío heterólogo que aquellos que se habían vacunados con las emulsiones respectivas de las bacterias que se cultivan bajo condiciones normales de hierro.

Bolin y Jensen ("Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia"; Infect Immun. 1987 May; 55(5): 1239-1242) han reportado que la inmunización pasiva con los anticuerpos contra proteínas de membrana exterior de hierro relacionado protege a los pavos de la enfermedad de Septicemia de *E. coli*. Similar a la *Pasteurella*, la *E. coli* es una bacteria gram-negativa. La última se encuentra comúnmente en aves de corral jóvenes y muchas especies de mamíferos. Los anticuerpos se obtuvieron de los conejos que se inocularon con fracciones enriquecidas de la proteína de membrana exterior de una cepa infecciosa de *E. coli* obtenida del hígado de un pavo que murió debido a la colisepticemia.

Ikeda y Hirsh ("Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida*"; Infect Immun. 1988 Sep; 56(9):2499-502) describe las proteínas de membrana exterior hierro-regulado antigénicamente relacionadas producidas por serotipos somáticos diferentes de *Pasteurella multocida*. Las proteínas de membrana exterior se prepararon de 16 serotipos somáticos de *P. multocida* diferentes después del crecimiento en condiciones bajas de hierro. Los anticuerpos específicos por una proteína de membrana exterior hierro regulada 84 kD de una cepa reaccionan con una proteína expresada por cada una de las cepas con la excepción posible de una. Los autores especulan que los antígenos producidos por la *P. multocida* bajo condiciones *in vivo* son aquellos que se regulan por el hierro, como la concentración de hierro libre en natural biomas de la bacteria es extremadamente baja. Además, mencionan que los respectivos antígenos inducen la protección contra la infección con las cepas *P. multocida* que pertenecen a los serotipos somáticos múltiples.

Rimler ("Cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*: passive immunization of turkeys against fowl cholera caused by different serotypes"; Avian Dis. 1987 Oct-Dec; 31(4):884-7) ha producido un antisuero que tiene protección cruzada contra diferentes serotipos de *Pasteurella multocida*, el suero que se produce en pavo inoculado con organismos muertos de serotipo 3 crecidos *in vivo*, el cual ha sido luego expuesto a organismos vivos de serotipo 3. El antisuero proporciona la protección contra los serotipos 1, 4, 5, 9 y 12 homólogos y heterólogos. Sin embargo, el autor no traza ninguna relación de dicho efecto protector en condiciones de hierro en el biom de la bacteria, ni para las proteínas de membrana-exterior de hierro-relacionado, sideróforos o transferrinas.

Williams *et al.* ("Novel aerobactin receptor in *Klebsiella pneumoniae*"; J Gen Microbiol. 1989 Dec; 135(12): 3173-81) describe un novedoso receptor de aerobactina en *Klebsiella pneumoniae*, el promotor aerobactina del crecimiento de mutantes *Klebsiella* específicos en medios deficientes en hierro, y es un sideróforo tipo-hidroxiámato. Los autores proporcionan evidencia de que algunas cepas *Klebsiella pneumoniae* producen una aerobactina del sistema de absorción del hierro sin producir una aerobactina por sí misma, y discuten la asociación de estos sistemas de absorción del hierro con virulencia.

La Publicación Internacional WO 90/12591 revela un método para el aislamiento y la purificación de las proteínas receptor de transferrina y lactoferrina a partir de la bacteria, y la preparación de las vacunas que contienen las mismas. Adicionalmente, se revela que las proteínas receptor de lactoferrina y transferrina pueden ser utilizadas como vacunas para prevenir infecciones bacterianas, como estos agentes compiten con los receptores bacterianos para lactoferrinas y transferrinas del huésped respectivo, y así reducirán la absorción del hierro de la bacteria infecciosa, por consiguiente la reducción de la virulencia.

Chart y Griffiths ("Antigenic and molecular homology of the ferric enterobactina receptor protein of *Escherichia coli*", J Gen Microbiol. 1985 Jun; 131(6):1503-1509) han purificado una proteína receptor de enterobactina férrica de *E. coli* 0111 y utilizan esta proteína para producir anticuerpos policlonales en conejos. El antisuero obtenido se utilizó para estudiar el grado de homología antigénica del receptor de enterobactina férrica de varias cepas de *E. coli* de laboratorio y patógenas. El suero obtenido también reconoció una proteína 81 kD a partir de la *Salmonella typhimurium* restringida en hierro y una proteína 83 kD a partir de la *Klebsiella pneumoniae* restringida en hierro.

Resumen de la invención

Estos y otros objetivos se logran por la presente invención que se dirige a una vacuna para la prevención y el tratamiento de la infección por bacterias gram-negativas, y al uso de dicha vacuna para la fabricación de un medicamento para la inmunización de la especie aviar contra las infecciones por bacterias gram-negativas. La invención también proporciona un método para el aislamiento y la purificación de las proteínas receptor de sideróforo de membrana exterior a partir de la bacteria gram-negativa para la producción de la vacuna. La invención además proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de infecciones de bacterias gram-negativa en un animal que utiliza anticuerpos construidos contra las proteínas receptor aisladas.

La vacuna es útil para la inmunización en aviares u otros animales contra la infección por bacterias gram-negativas tales como colibacilosis, salmonelosis y pasteurellosis. La vacuna se compone de cuatro o más proteínas receptor de

sideróforo sustancialmente puras, en donde las proteínas se derivan de la membrana exterior de dos o más diferente cepas o especies de una bacteria gram-negativa de la familias *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* y/o *Pseudomonaceae*, en donde la vacuna previene la infección del animal por una bacteria gram negativa es decir de una cepa, especie o género diferente de las dos o más bacterias gram-negativas utilizadas para obtener las proteínas receptor de sideróforo.

Estas bacterias gram-negativas por ejemplo pueden ser *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.* y *Escherichia spp.* Una proteína receptor de sideróforo, útil de acuerdo con la invención, es una proteína o secuencia de péptido antigénica de esta, derivada de la membrana exterior de una bacteria gram negativa, la cual es capaz de producir un anticuerpo que reaccionará con la proteína receptor de sideróforo expresada por una bacteria gram-negativa de la misma o de diferente cepa, especie o género. Preferiblemente, la proteína receptor de sideróforo se deriva de una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y/o *Pasteurellaceae*.

La vacuna contiene proteínas receptor de sideróforo (SRPs) derivadas de una bacteria gram-negativa, capaz de elicitar una respuesta inmune en un animal con la producción de anticuerpos anti-SRP. Estos anticuerpos reaccionarán con las proteínas receptor de sideróforo de aquella bacteria, y pueden también reaccionar en cruz con las proteínas receptor de sideróforo de una diferente cepa, especie y/o géneros de bacteria gram-negativa para proporcionar protección cruzada contra la infección de tales bacterias. Útiles proteínas receptor de sideróforo que tienen un peso molecular de aproximadamente 72-96 kDa, según se determinó por SDSPAGE, han sido aisladas de *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.*, *Pseudomonas spp.*, y *Klebsiella spp.* Preferiblemente, las proteínas receptor de sideróforo (SRPs) se derivan de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y/o *Escherichia spp.* Los anticuerpos producidos de aquellas SRPs reaccionarán con las SRPs de aquellas bacterias y para reaccionar en cruz con las SRPs de una diferente cepa, especie y/o géneros de bacteria dentro del la familia *Enterobacteriaceae* y/o *Pasteurellaceae*.

La vacuna contiene cuatro o más proteínas receptor de sideróforo extraídas de la membrana exterior de dos o más diferentes cepas o especies de bacterias gram-negativas. La cantidad y tipo de proteína receptor de sideróforo incluida en la vacuna es efectiva para estimular la producción de anticuerpos reactivos con una proteína receptor de sideróforo de una, preferiblemente dos o más cepas, especies o géneros de bacterias gram-negativas que son de una cepa, especie o género diferente de las dos o más bacterias gram-negativas utilizadas para obtener las proteínas receptor de sideróforo. Una vacuna preferida se compone de una cantidad y perfil de las proteínas receptor de sideróforo para inducir efectivamente los anticuerpos reactivos con una mayoría, preferiblemente todas, de las proteínas receptor de sideróforo de una población bacteriana para mejorar efectivamente la opsonización y la lisis bacteriana complemento-mediada, y/o bloquear la capacidad de enlace hierro de la bacteria. La proteína receptor de sideróforo se combina con un excipiente fisiológicamente aceptable, preferiblemente un líquido. La vacuna además puede incluir un adyuvante para mejorar la respuesta inmune, y otros aditivos según se desee, tal como preservativos, agentes saborizantes, agentes reguladores, y similares.

Las proteínas receptor de sideróforo se pueden utilizar para construir un suero de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales para utilizar en terapias pasivas de inmunización. Tales anticuerpos también pueden ser utilizados en un método *in vitro* de diagnóstico de una infección bacteriana gram-negativa en un animal.

Las proteínas receptor de sideróforo también pueden ser utilizadas como antígenos de captura en un método de monitoreo y de perfil de asepsia gram negativa. Por ejemplo, la proteína puede ser utilizada en una técnica de ELISA en la cual la proteína se une a un soporte sólido y se conecta con un material de muestra para reaccionar con y detectar los anticuerpos presentes en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 es una descripción gráfica del perfil de elución de las proteínas receptor de sideróforo aisladas concentradas, solubilizadas del serotipo 078 de la *Escherichia coli* (ATCC 55652).

Figura 2 es una descripción gráfica del aclaramiento cuantitativo de *Salmonella agona* en bazos de pavos vacunados con IROMPs aisladas de la *E.coli* y controles no-vacunados.

Figura 3 es una descripción gráfica de la respuesta serológica para las proteínas receptor de sideróforo (SRPs) de *E.coli* entre parvadas flocks vacunadas y no-vacunadas.

Figura 4 es una descripción del % total de mortalidad y seleccionados en parvadas control y *E.coli* SRP- vacunadas (3-13 semanas de edad).

Figura 5 es una descripción del % total de mortalidad y seleccionados en parvadas control y *E.coli* SRP- vacunadas (3-13 semanas de edad).

Figura 6 es una descripción gráfica de la mortalidad total en pavos SRP-vacunados y no-vacunados seguido del desafío con la *Pasteurella multocida* P-1059.

Figura 7 es una descripción gráfica de la respuesta serológica en aves vacunadas con proteínas receptor de sideróforo purificadas a partir de la *Salmonella senftenberg*, que mostraron reactividad cruzada con la SRP de *E.coli*.

Figura 8 es una descripción gráfica de la respuesta serológica en aves vacunadas con proteínas receptor de sideróforo purificadas a partir de la *P. multocida*, que mostraron reactividad cruzada con la SRP de *E.coli*.

Figura 9 es una descripción gráfica del % total de mortalidad en parvadas consecutivas antes y después de la vacunación con proteínas receptor de sideróforo derivadas de la *E.coli* 078.

Figura 10 es una descripción gráfica de la respuesta serológica a las SRPs de la *E.coli* entre parvadas de pavos comerciales SRP-vacunados y no-SRP-vacunados.

Figura 11 es una descripción gráfica de la respuesta serológica de SRP purificada y la célula completa de *Salmonella heidelberg*.

Figura 12 es una descripción gráfica del total de la mortalidad entre progenie de SRP-vacunado y no-vacunado (control) gallinas de criadero.

Figura 13 es una descripción gráfica de la respuesta serológica en aves vacunadas con proteínas receptor de sideróforo purificadas de la *Salmonella typhimurium*, que mostraron reactividad cruzada con la SRP de *E.coli*.

Figura 14 es una descripción gráfica de la respuesta serológica en aves vacunadas con proteínas receptor de sideróforo purificadas de la *Salmonella enteritidis*, que mostraron reactividad cruzada con la SRP de *E.coli*.

Figura 15 es una descripción gráfica de SRPs de *Salmonella typhimurium* como un inmunógeno protector contra un desafío homólogo y heterólogo en pavos.

Figura 16 es una descripción gráfica de las SRPs de *Salmonella enteritidis* como inmunógenos protectores contra un desafío homólogo y heterólogo en pavos.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en esta, el término “sustancialmente puro” significa que la proteína receptor de sideróforo ha sido extraída y aislada a partir de su asociación natural con otras proteínas, lípidos, y otras sustancias y elementos similares de una célula bacteriana u otro organismo.

Las bacterias gram-negativas son frecuentes patógenos de aves de corral y otros animales, tales como contaminación doméstica, ganado, caballos, animales acompañantes, y humanos. En un ambiente de hierro-restringido, las bacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Escherichia spp.* producen sideróforos que quelan el hierro férrico y unen a las proteínas de membrana exterior que funcionan como receptores sideróforos en la membrana bacteriana.

La invención proporciona un proceso mejorado para el aislamiento y la separación de las proteínas receptor de sideróforo de la membrana exterior de bacteria gram-negativa. El aislamiento y la purificación de proteínas receptor de sideróforo inmunogénicamente intactas de las membranas bacterianas en una cantidad suficiente y calidad inmunogénica para la formulación de una vacuna contra la infección por bacteria gram-negativa ha sido difícil. La orientación estructural, o la conformación, de la proteína de membrana exterior necesaria para proporcionar antigenicidad puede ser típicamente se pierden cuando la proteína se separa y purifica a partir del complejo lipopolisacárido.

Otro problema es que la proteína llega a ser desnaturalizada por el proceso de separación en donde su inmunogenicidad se pierde. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, el aislamiento y la separación de cantidades inmunogénicas de proteínas receptor de sideróforo efectivas antigénicamente de la membrana exterior de bacteria gram-negativa se ha logrado. Esto permite la producción de vacunas y de suero hipermunizado para el tratamiento de animales infectados o susceptibles a la infección por bacterias gram-negativas, y de métodos *in vitro* de diagnóstico para detectar tal infección en un animal.

Como un grupo, las bacterias gram-negativas poseen una estructura de la pared celular común. Los componentes de la estructura de la pared celular pueden ser utilizados como inmunógenos. Sin embargo, estos inmunógenos pueden proporcionar solo protección inmune homóloga. La vacuna actual utiliza una combinación de proteínas de membrana exterior receptor de sideróforo común a dos o más bacterias gram negativas que son capaces de proliferar en la sangre o tejidos huésped y causando la infección en un animal. La vacuna puede contener cuatro o más proteínas receptor de sideróforo (SRPs) derivadas de la membrana exterior de dos o más diferentes cepas o especies de bacterias gram-negativas y/u otro organismo. Una proteína receptor de sideróforo preferida para utilizar en la vacuna tiene un receptor común reactivo con sideróforos producidos por dos o más cepas, especies y/o géneros de bacterias gram-negativas.

Un ejemplo de una proteína receptor de sideróforo útil es la proteína receptor para la aerobactina (MW aproximadamente 72-74 kDa) producida por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Klebsiella*. Se ha encontrado que los anticuerpos producidos contra una proteína receptor aerobactina de una especie, cepa o género de la familia reaccionan en cruz con otra bacteria dentro de la familia. Las especies de *Pseudomonas* de la familia *Pseudomonadaceae* también expresa las proteínas receptor de sideróforo aerobactinas que pueden ser aisladas de acuerdo con la invención y utilizadas en una vacuna para producir anticuerpos que reaccionan

en cruz con las proteínas receptor aerobactina de *E. coli*, *Salmonella* y *Klebsiella*, entre otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Otro ejemplo de una proteína receptor de sideróforo apropiada para utilizar en las presentes vacunas es la que se produce por la *Pasteurella* multocida para el sideróforo multocidina (MW aproximadamente 500-1000 kDa). Los anticuerpos para la proteína receptor multocidina reaccionarán con las tres SRPs en *Pasteurella* multocida. En western blots, dos de las proteínas sideróforo más grandes (96 kDa, 84 kDa) de *P. multocida* mostraron reactividad con el antisuero de la proteína *E. coli* hiperinmune. Los anticuerpos producidos para las proteínas receptor multocidina reaccionarán en cruz con las proteínas receptor de sideróforo de *Salmonella* spp. y *E. coli*, según se demuestra por los análisis ELISA y Western blot.

Otras proteínas receptor de sideróforo incluyen aquellas reactivos con el sideróforo enteroquelina (MW aproximadamente 81-84 kDa) producidos por *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*; y el sideróforo citrato (MW aproximadamente 74-78 kDa) producidos por la *E. coli*, entre otras. Una vacuna que contiene las proteínas receptor de enteroquelina y/o citrato producirán los anticuerpos reactivos con *E. coli*, *Salmonella* y otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, y con *Pseudomonas* de la familia *Pseudomonadaceae*.

Otra SRP útil es la proteína receptor de sideróforo para ferricromo (MW aproximadamente 78 kDa) producida por *E. coli*, y *Salmonella* spp. En las instalaciones de cría comercial de aves de corral, la infección por *Aspergillus* causa serios problemas respiratorios en las aves. En los pulmones, *Aspergillus* excretará el ferricromo para adquirir el hierro como un nutriente de crecimiento. Bajo la condiciones sistemáticas o de restricción de hierro, la *E. coli* y *Salmonella* expresaran la proteína receptor de ferricromo. También son bacterias oportunistas que pueden recuperar y utilizar el ferricromo producido por *Aspergillus* como un nutriente de crecimiento. Por consiguiente, se prefiere que la preparación de la vacuna incluya una proteína receptor de ferricromo para inducir a que los anticuerpos se unan y reaccionen en cruz con las proteínas receptor de ferricromo de bacterias gram-negativas incluyendo *E. coli* y *Salmonella*, y mohos/hongos. Una vacuna que contiene esta SRP elicitará una respuesta inmune a la proteína para mejorar la actividad bactericida del anticuerpo. También, una vez que el aviar u otro animal se vacuna con una proteína receptor de ferricromo, el *Aspergillus* que expresa esta proteína *in vivo* en el animal mejorará la respuesta del anticuerpo a la proteína receptor de ferricromo la cual a sus vez reaccionará en cruz con la *Salmonella* y *E. coli* y otras bacterias que expresen la proteína receptor de ferricromo.

El anticuerpo elicitado de una proteína receptor de ferricromo (MW aproximadamente 78 kDa) derivada a partir de la *E. coli* puede reaccionar en cruz con las proteínas receptor de hongos, tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* y *Fusarium*. El análisis Western blot contra la proteínas de membrana exterior (OMPs) de *A. fumigatus* utilizando el anticuerpo anti-SRP reveló tres proteínas reactivas en cruz (MW aproximadamente 45-90 kDa). La inclusión de una proteína receptor de ferricromo en una preparación de la vacuna proporcionará el incentivo de los anticuerpos que reaccionarán con los hongos y/o bacterias para prevenir el enlace y la excreción del sideróforo ferricromo. Los animales tal como aves que se vacunan con una preparación de la vacuna que contiene una proteína receptor de ferricromo conseguirán un título de anticuerpo elevado por las bacterias y/u hongos que desafían el animal y producen una proteína receptor de ferricromo. También, el anticuerpo para el receptor de ferricromo puede ser elevado por el desafío de campo natural por hongos o bacterias el cual puede inducir un efecto bactericida que podría reducir el desafío del sistema y la potencial enfermedad.

Aún otra SRP útil es una proteína receptor de coprogen (MW aproximadamente 74-76 kDa) producido por la *E. coli*. Los anticuerpos producidos contra la proteína receptor coprogen reaccionarán en cruz con las SRPs de otra *E. coli* que expresan esta proteína bajo condiciones sistemáticas.

La vacuna se formula con las proteínas receptor de sideróforo (SRPs) de diferentes tipos y/o pesos moleculares, derivados de la membrana exterior de dos o más diferentes cepas o especies de bacterias gram-negativas, las SRPs que son capaces de estimular la producción de anticuerpos que reaccionan con las cepas, especies o géneros diferentes de las dos o más bacterias gram-negativas. La vacuna preferiblemente contiene todas las SRPs derivadas del agente infeccioso de la bacteria gram-negativa. Por ejemplo, *P. multocida* y *Salmonella* spp. Han sido identificados como productores de 3 SRPs cada una, y *E. coli* produjo 2, 3, 4, y 6 SRPs que varían entre los serotipos. Por consiguiente, la vacuna se formula para contener las SRPs derivadas del agente causativo bacteriano, i.e., 2-6 o más SRPs. Se prefiere que la vacuna también incluya las proteínas receptor de sideróforo de diferentes tipos y/o pesos moleculares derivadas de una bacteria gram-negativa de una cepa o especie diferente de la primera bacteria gram-negativa, preferiblemente 1-15 SRPs, preferiblemente 5-10 SRPs.

Por ejemplo, la vacuna puede contener una proteína receptor de sideróforo derivada de la *E. coli*, preferiblemente serotipo 01a, 02a y/o 078 de *E. coli*, es decir capaz de estimular la producción de un anticuerpo inmunoreactivo con esa *E. coli* y una segunda bacteria gram-negativa tal como *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Pasteurella multocida*. En otro ejemplo, la vacuna puede contener una proteína receptor de sideróforo derivada de una especie de *Pasteurella*, tal como *P. multocida*, es decir capaz de estimular la producción de un anticuerpo inmunoreactivo con esa especie de *Pasteurella* y una segunda bacteria gram-negativa tal como *Salmonella* spp. y/o *E. coli*. En otro ejemplo, la vacuna puede contener una proteína receptor de sideróforo derivada de una especie de *Salmonella* es decir capaz de estimular la producción de un anticuerpo inmunoreactivo con tal especie de aquella especie de *Salmonella*, y una segunda bacteria gram-negativa tal como la *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y/o *Pasteurella multocida*.

Una vacuna formulada con proteínas receptor de sideróforo derivada de *E. coli* preferiblemente se compone de una SRP aerobactina, ferricromo, coprogen, enteroquelina y/o citrato, que tiene pesos moleculares de aproximadamente 89 kDa a aproximadamente 72 kDa, según se determinó por SDS-PAGE. La vacuna preferiblemente incluye 2-5 proteínas receptor, preferiblemente 3-5 proteínas, preferiblemente todas las SRPs de *E. coli*. Una vacuna preferida contra la infección de *E. coli* se prepara con las SRPs de la *E. coli* 078 (ATCC #55652). La *E. coli* 078 ha sido identificada como productora de hasta 6 SRPs fluctuando en un peso molecular de aproximadamente 72 a 90 a 92 kDa, según se determinó por SDS-PAGE. Las SRPs derivadas de la *E. coli* 078 incluyen SRPs de aerobactina, ferricromo, coprogen, enteroquelina y citrato, que tienen pesos moleculares de aproximadamente 91-92 kDa, 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa, 74 kDa y 72 kDa, según se determinó por SDS-PAGE, 12.5% de gel reductor de acrilamida. Aunque las proteínas 91-92 kDa de *E. coli* 078 se expresan en medios de cultivo hechos con y sin hierro, la expresión de aquellas proteínas se mejora en un medio restringido de hierro, y según se utiliza aquí, las proteínas 91-92 kDa se consideran por ser SRPs hierro-regulado. Una vacuna preferida para la inmunización de un animal contra *E. coli* se formula con una SRP de aerobactina, ferricromo, coprogen, enteroquelina y citrato derivada de la *E. coli*, preferiblemente *E. coli* 078, hecha de al menos 5 proteínas receptor de sideróforo, preferiblemente al menos 6 proteínas receptor, o más, para inducir los anticuerpos anti-SRP para bloquear efectivamente una mayoría, preferiblemente todos, los sitios de enlace de hierro de los serotipos de *E. coli* presentes en una infección, y para inducir niveles altos de anticuerpos para promover la actividad bactericida.

Además se prefiere que la vacuna incluya una o más SRPs, preferiblemente aproximadamente 1-15 SRPs, derivadas de una o más bacterias adicionales, diferentes de la primera bacteria gram-negativa. Por ejemplo, en una vacuna compuesta de SRPs de la *E. coli*, es deseable incluir una o más de las SRPs derivadas de *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella* y/o *Pseudomonas*. Una vacuna preferida contiene cada una de las SRPs de diferentes tipos y/o pesos moleculares, de una población de bacterias gram-negativas para inducir la producción de anticuerpos que efectivamente bloquearán los sitios de enlace de hierro de todas de las diversas SRPs de la población bacteriana así que la bacteria no se puede unir efectivamente al hierro como un nutriente para el crecimiento. Se prefiere también que la vacuna induzca los niveles altos de anticuerpos de SRP lo cual mejorará la opsonización y/o la lisis bacteriana complemento mediada. Debido a la variación en proteínas de membrana exterior hierro-regulado (IROMPs) producidas entre y dentro de los serotipos bacterianos, la formulación de una vacuna con SRPs aisladas y purificadas de una sola fuente aislada puede proporcionar únicamente un perfil parcial de las SRPs presentes en una población bacteriana. Por consiguiente, la efectividad de la vacuna para inducir anticuerpos anti-SRP para bloquear los sitios de enlace de hierro bacterianos e inhibir la infección bacteriana pueden ser limitados a aquellos serotipos que producen todas o menos de todas de las SRPs incluidas en la vacuna, mientras que aquellos serotipos bacterianos que producen otras SRPs pueden conservar una capacidad de enlace de hierro. De esta manera, se prefiere que un perfil, o patrón de bandas (i.e., separaciones de proteínas SDS-PAGE), de una población bacteriana se conduce mediante exámenes diferentes de aislados de campo, preferiblemente aproximadamente 25-100 aislados, para determinar las SRPs que están presentes, y todas de las diversas SRPs se incluyen en la vacuna.

Las proteínas y polipéptidos regulados sin-hierro también se pueden incluir en la vacuna como adyuvantes para mejorar la efectividad de la vacuna e incrementar la opsonización, es decir, incrementar la actividad del macrófago resultando en el incremento de fagocitosis de células unidas al anticuerpo, e induce la lisis bacteriana complemento-mediada.

Un proteína adyuvante útil es un grupo de 34-38 kDa de las proteínas de membrana exterior (porinas, i.e., proteínas que forman poros) derivadas de las bacterias gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae* incluyendo la *E. coli* 078, y otras bacterias gram-negativas. Las proteínas porinas y transmembrana (MW 34-38 kDa) identificadas como OmpA, OmpC, OmpD y OmpF se expresan con y sin hierro, se conservan relativamente entre bacteria gram-negativa, y juegan un papel en el enlace de hierro. Por ejemplo, OmpF y OmpC unirán la lactoferrina (Erdei *et al.*, Infection y Immunity 62: 1236-1240 (April 1994)), mientras OmpA unirá ferricromo (Coulton *et al.*, J. Gen. Microbiol. 110:211-220 (1979)).

Los anticuerpos tempranos en la infección particularmente de la clase IgM reaccionarán en cruz con proteínas de membrana exterior de *E. coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*, y se unirán a la lactoferrina y/o ferricromo, imposibilitando la disponibilidad de una fuente de hierro para el crecimiento bacteriano. Los anticuerpos para estas proteínas también unirán a la porina Omp en la superficie para mejorar la opsonización y/o lisis bacteriana complemento-mediada. Las proteínas de membrana exterior porina de 34-38 kDa inmunológicamente intactas pueden ser aisladas y purificadas de acuerdo con el proceso de la invención.

La vacuna puede ser utilizada para inmunizar las aves de corral y otros animales tal como aves de corral domésticas, ganado, caballos, animales acompañantes, y humanos, contra infección causadas por una o más bacterias gram-negativas. La vacuna es efectiva para elicitar los anticuerpos que son inmunoreactivos con una bacteria gram-negativa que expresa una o más proteína(s) receptor de sideróforo.

Preferiblemente, la vacuna es capaz de lograr la eficacia clínica de inmunización reactiva en cruz y de protección cruzada contra dos o más diferentes cepas, especies y/o géneros de bacterias gram-negativas u otros organismos capaces de expresar las proteínas receptor de sideróforo. Por ejemplo, una vacuna que contiene las proteínas receptor de sideróforo por aerobactina, enteroquelina, ferricromo, coprogen y/o citrato, puede ser utilizada para estimular la producción de anticuerpos que reaccionan en cruz con un número de diferentes bacterias que expresan una o más de estas proteínas receptor.

La efectividad de la vacuna actual se debe, al menos en parte, a la naturaleza conservadora de las proteínas de membrana exterior receptor de sideróforo que son reactivas en cruz con las proteínas receptor de sideróforo producidas por dos o más diferentes especies, cepas y/o géneros de *Enterobacteriaceae* tal como *E.coli*, *Salmonella*, y otras bacterias gram-negativas dentro de otras familias tal como *Pasteurella* y/o *Pseudomonas*.

Debido a la reactividad cruzada de las SRPs, la vacuna es efectiva estimulando la producción de los anticuerpos que reaccionan con la bacteria gram-negativa de la cual las SRPs se derivan, así como con la bacteria gram-negativa de una cepa o especie diferente de la primera bacteria gram-negativa. Por ejemplo, una vacuna se puede formular para contener una proteína receptor de sideróforo derivada de la *E.coli*, preferiblemente serotipo 01a, 02a y/o 078 de *E.coli*, más preferiblemente *E.coli* 078, es decir efectiva en estimular la producción *in vivo* de un anticuerpo inmunoreactivo con ese serotipo de *E.coli* (del cual la(s) SRP(s) se deriva(n)), y una segunda bacteria gram-negativa tal como *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y/o *Pasteurella multocida*. En otro ejemplo, la vacuna puede contener una proteína receptor de sideróforo derivada de una especie de *Pasteurella*, tal como *P. multocida*, es decir efectiva en estimular la producción de un anticuerpo inmunoreactivo con esa especie de *Pasteurella* y una segunda bacteria gram-negativa tal como *Salmonella spp.* y/o *E. coli*. En aún otro ejemplo, la vacuna puede contener una proteína receptor de sideróforo derivada de una especie de *Salmonella* es decir efectiva en estimular la producción de un anticuerpo inmunoreactivo con esa especie de *Salmonella*, y una segunda bacteria gram-negativa tal como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y/o *Pasteurella multocida*.

Ventajosamente, la inmunización utilizando la vacuna actual que contiene un inmunógeno reactivo en cruz con múltiples especies, cepas y géneros de bacterias gram-negativas, no solo minimiza los costos de inmunización dado que no son requeridas las inoculaciones separadas con un diferente inmunógeno para cada tipo de bacteria gram-negativa. Además, la vacuna actual proporciona protección contra nuevas cepas o patógenos imprevistos de bacterias gram-negativas que producen proteínas receptor de sideróforo que reaccionarán en cruz con anticuerpos inducidos por las proteínas receptor de sideróforo contenidas en la vacuna. La vacuna dada a un animal adulto es altamente eficaz en el tratamiento de y la prevención de sepsia gram-negativa no solo en el animal adulto si no también su progenie por la transferencia directa de los anticuerpos anti-SRP.

Las vacunas célula completa bacteriana comerciales son útiles para el tratamiento de una enfermedad y/o infección particular pero no proporcionan una efectiva protección cruzada contra otra infección. Por ejemplo, la pasteurellosis aviar en pavos causada por *Pasteurella multocida* clínicamente se diagnostica por lesiones particulares inducidas por la infección bacteriana. El tratamiento de la enfermedad con una vacuna de célula completa comercial estimula los anticuerpos que son homólogos pero no heterólogos en su acción, y no tendrán protección cruzada contra la infección por otra bacteria.

Ventajosamente, las actuales vacunas proporcionan una protección cruzada contra un número de infecciones causadas por la bacteria gram negativa. De acuerdo con la invención, una especie de animal que sufre de la sepsia bacteriana gram-negativa puede ser administrada con la vacuna que contiene las SRPs derivadas de la bacteria gram-negativa (agente causativo) para inducir los anticuerpos inmunoreactivos con aquellas SRP(s) para inhibir el estado de la enfermedad. Los anticuerpos también reaccionarán en cruz con las SRP(s) producidas por otras bacterias gram-negativas para inhibir un estado de la enfermedad causada por esta otra bacteria. De esta manera, una vacuna que contiene las SRPs de una primera bacteria gram negativa proporcionará la protección contra una infección causada por esta bacteria y proporciona la protección cruzada contra la infección causada por una diferente bacteria gram-negativa.

Las bacterias gram-negativas apropiadas para utilizar en la obtención de las proteínas receptor de sideróforo de acuerdo con la invención, son aquellas capaces de producir las proteínas receptor de sideróforo cuando se construyen bajo condiciones de crecimiento de disponibilidad bajo de hierro. Ejemplos de bacterias gram-negativas útiles incluyen *Escherichia coli* (serotipos 01a, 02a, y 078), *Salmonella agona*, *Salmonella blockley*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella hadar*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocida* (serotipo A:3,4), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y similares. Estos organismos están disponibles comercialmente de un depositario tal como American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Además, tales organismos son obtenibles fácilmente por técnicas de aislamiento conocidas y utilizadas en el oficio. Las bacterias gram-negativas se pueden derivar de animales infectados como un aislado de campo, y seleccionadas para la producción de las SRPs, y ser introducidas directamente en los medios agotados de hierro preferidos para que esas bacterias, o almacenadas para su futuro uso, por ejemplo, en un depósito congelado a aproximadamente -20°C a aproximadamente -95°C, preferiblemente aproximadamente -40°C a aproximadamente -50°C, en BHI que contiene glicerol al 20%, y otros medios similares.

Para la producción de las proteínas receptor de sideróforo, se crean condiciones de disponibilidad baja de hierro utilizando medios de cultivo que carecen de hierro o han sido suplementados con un agente quelante de hierro para disminuir la disponibilidad de hierro. Medios de cultivo apropiados para proporcionar una disponibilidad baja de hierro y promover la producción de las proteínas receptor de sideróforo en bacterias gram-negativas, incluyen medios tales como caldo de soja triptico (Difco Laboratories, Detroit, MI) y/o caldo infusión cerebro-corazón (BHI) el cual ha sido combinado con un agente quelante de hierro, por ejemplo, α,α' -dipiridil, deferroxamina, y otros agentes similares. En una modalidad preferida, se adiciona α,α' -dipiridil a un medio de cultivo BHI en una concentración de aproximadamente 1-500 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente aproximadamente 50-250 $\mu\text{g/ml}$, más preferiblemente cerca de 75-150 $\mu\text{g/ml}$.

Las bacterias gram-negativas empleadas para producir una proteína receptor de sideróforo se cultivan en los medios preferidos para ese organismo utilizando metodologías y aparatos conocidos y utilizados en el oficio, tal como un fermentador, vibrador giratorio, u otros equipos similares. Por ejemplo, un cultivo puede ser cultivado en un vibrador giratorio en el cual el medio se agita continuamente con aeración a aproximadamente 300-600 rev/minuto, por aproximadamente 15-20 horas, a una temperatura y pH apropiados para el crecimiento para este organismo, i.e., aproximadamente 35-45°C y pH 7-7.6 aproximadamente, preferiblemente pH 6.5-7.5. El cultivo microbiano luego se procesa para separar y purificar las proteínas receptor de sideróforo de la membrana exterior de la bacteria.

El cultivo microbiano se concentra, por ejemplo, por centrifugación, concentración de membrana, y similares. Por ejemplo, el cultivo celular puede ser centrifugado a aproximadamente 2,450-20,000 x g, preferiblemente a aproximadamente 5,000-16,000 x g, por aproximadamente 5-15 minutos a aproximadamente 3-6°C. El sobrenadante se retira por decantación, succión, con pipeta y similares, y el pellet de las células concentradas se colecta y lava en una solución reguladora compatible mantenida a pH 7-7.6 aproximadamente, tal como solución salina reguladora-tris (TBS), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-N(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), y similares. El pellet lavado se resuspende y se lava en una solución reguladora compatible, i.e., TBS, HEPES, MOPS y similares. El material celular luego se trata para solubilizar los componentes de la membrana exterior por resuspensión del pellet en solución reguladora que contiene aproximadamente 0.5-10% de N-lauroil sarcosinato de sodio, preferiblemente aproximadamente 1-3%, a aproximadamente 4-10°C por aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 3 horas, preferiblemente aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, preferiblemente con agitación continua.

Las células bacterianas luego se desestabilizaron por sonicación, prensa Francesa, molienda con abrasivos, vortexing de cuentas de vidrio, y otros métodos similares conocidos y utilizados en el oficio, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 3-6°C. La célula homogenizada luego se centrifuga a aproximadamente 10,000-20,000 x g por aproximadamente 10-45 minutos, para separar los restos de la célula de la fracción del sobrenadante que contiene las proteínas de membrana exterior. El sobrenadante se colecta por decantación, succión, con pipeta, u otro método similar, y luego se concentra, por ejemplo, por precipitación con etanol, concentración de membrana, precipitación con propilenglicol, y otros métodos conocidos y utilizados en el oficio. En un método preferido, el sobrenadante se trata pasándolo a través de una membrana que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 1,000-50,000 MW, preferiblemente aproximadamente 10,000-25,000 MW, para concentrar la proteína y dejar contaminar las proteínas más pequeñas que el límite de peso molecular para pasar a través de la membrana, y disminuir la cantidad de detergente. Tales membranas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Amicon, Danvers, MA.

El sobrenadante concentrado luego se reconstituye en una solución reguladora compatible, i.e., TBS, HEPES, MOPS, y similares, aproximadamente pH 7-7.6, que contiene un detergente para la solubilización de la membrana exterior y la extracción de las proteínas receptor de sideróforo. Se encontró que el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), cuando se utiliza como un detergente solubilizante solo sin un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol, es efectivo particularmente para extraer una alta cantidad de las proteínas receptor de sideróforo sin desnaturalizar o alterar su inmunogenecidad tal que las proteínas funcionarán *in vivo* como inmunógenos efectivos para elicitación una respuesta del anticuerpo contra la bacteria gram-negativa. La solución reguladora contiene aproximadamente 0.1-4% SDS (0.2%), preferiblemente aproximadamente 0.1-2% SDS, preferiblemente aproximadamente 0.1-2% SDS.

Después de aproximadamente 1-10 minutos, las proteínas receptor de sideróforo se separan de la solución reguladora por afinidad, intercambio iónico, permeación sobre gel y otros métodos cromatográficos similares conocidos y utilizados en el oficio. Preferiblemente, la preparación SRP se separa con un 4% gel de carga en un gel reducido de acrilamida 12.5%. Las fracciones luego se combinaron, concentraron, por ejemplo por centrifugación, y se precipitaron, por ejemplo con un alcohol (i.e., etanol, metanol, acetona), para retirar el SDS. Las proteínas purificadas pueden ser utilizadas inmediatamente para preparar una vacuna, o pueden ser almacenadas para un uso futuro a través de la liofilización, criopreservación, u otras técnicas similares conocidas y utilizadas en el oficio.

La vacuna de la presente invención puede ser utilizada para prevenir y eliminar las infecciones de la bacteria gram-negativa en aves de corral y otros animales, incluyendo humanos. La vacuna puede ser entregada al animal, por ejemplo, por entrega parenteral, inyección (subcutánea o intramuscular), depósito de liberación controlada, aplicación con aerosol, inoculación en huevo (i.e., aves de corral), y similares, por técnicas conocidas en el oficio. Para uso terapéutico profiláctico y anti-infeccioso *in vivo*, la vacuna contiene una cantidad de una proteína receptor de sideróforo para estimular un nivel de inmunidad activa en el animal para inhibir y/o eliminar la patogénesis y/o asepsia bacteriana gram-negativa.

Las proteínas receptor de sideróforo se administraron en combinación con un excipiente farmacéutico compatible con la proteína y el animal. Excipientes farmacológicos apropiados incluyen, por ejemplo, suero fisiológico (0.85%), solución salina reguladora fosfato (PBS), Tris hidroximetil aminometano (TRIS), solución salina reguladora-Tris, y similares. La proteína también se puede incorporar en un excipiente que sea biocompatible y pueda incorporar la proteína y proporcionar su liberación o entrega controlada, por ejemplo, un polímero de liberación controlada tal como un hidrogel, acrilato, poliláctido, policaprolactona, poliglicólido, o copolímero de estos. Un ejemplo de una matriz sólida para la implantación en el animal y la liberación controlada del antígeno de la proteína en el cuerpo es una matriz metabolizable, según lo descrito, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 4,452,775 (Kent), la divulgación de la cual se incorpora por referencia aquí.

Los adyuvantes pueden ser incluidos en la vacuna para mejorar la respuesta inmune en el animal. Tales adyuvantes incluyen, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, Adyuvante Incompleto de Freund (FCA), liposomas, ISCOM, y similares. La vacuna también puede incluir aditivos tal como soluciones reguladoras y preservativos para mantener la isotonicidad, pH fisiológico y estabilidad. Formulaciones parenterales e intravenosa de la vacuna pueden incluir un agente emulsificante y/o de suspensión, junto con diluentes farmacéuticamente aceptables para controlar la entrega y la dosis de la cantidad de la vacuna.

Los factores concernientes a la dosificación de la vacuna incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del animal. El rango de una dosis dada es aproximadamente 25-5000 μg de la proteína receptor de sideróforo purificada por ml, preferiblemente aproximadamente 100-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ preferiblemente dada en dosis de aproximadamente 0.1-5 ml. La vacuna podría ser administrada al animal en una cantidad efectiva para asegurar que el animal desarrollará una inmunidad para proteger contra una infección bacteriana gram-negativa. Por ejemplo, para aves de corral, una sola dosis de una vacuna hecha con Adyuvante Incompleto de Freund podría contener aproximadamente 150-300 μg de la proteína receptor de sideróforo purificada por ml. Para la inmunización de un ave de un día de edad de aproximadamente 60 gramos de peso, el ave puede ser inyectada por vía subcutánea o intramuscular con una dosis de aproximadamente 0.25-0.5 ml. Para un ave de aproximadamente 3-semanas de edad de aproximadamente 1.5 lbs, el ave se puede inyectar con una dosis de aproximadamente 0.25-1 ml. Una vacuna para la inmunización de un lechón de aproximadamente 5-lb contra *Salmonella choleraesuis* podría contener aproximadamente 100-5000 μg de la proteína por ml, preferiblemente dado en una dosis de 1-5 ml. En cada caso, la dosis de inmunización luego sería seguida por la administración de un refuerzo dado unos 21-28 días aproximadamente después de la primera inyección. Preferiblemente, la vacuna se formula con una cantidad de la proteína receptor de sideróforo efectiva para la inmunización de un animal susceptible contra una infección por dos o más cepas o especies de bacterias gram-negativas que expresan una proteína receptor de sideróforo.

Para el aumento de la dosis de la inmunización, el refuerzo puede ser una preparación de células completas como se utiliza convencionalmente, o una preparación celular químicamente modificada, entre otras. Por ejemplo, un refuerzo útil es una preparación de una *E. coli* modificada tal como R-mutantes avirulentos, como por ejemplo, *E. coli* J5 (comercialmente disponible de la ATCC como ATCC #43754; descrita por Overbeck *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 25:1009-1013 (1987)), o *Salmonella minnesota* (comercialmente disponible de ATCC como ATCC #49284; según lo descrito por Sanderson *et al.*, *J. Bacteriol.* 119:753-759, 760-764 (1974)) que carece de cadenas laterales del oligosacárido exterior de la capa del lipopolisacárido (LPS) de la membrana exterior. Las cadenas laterales de oligosacárido exteriores tienden a camuflar las SRPs en la membrana celular de una manera que el sistema inmune no reconoce las SRPs y los títulos de anticuerpo anti-SRP se reducen. Para mejorar la capacidad de un refuerzo hecho con células bacterianas intactas para elicitación una respuesta inmune anti-SRP, la membrana celular de la bacteria puede ser químicamente alterada para eliminar la interferencia de las cadenas laterales de oligosacárido. Reforzando con la bacteria químicamente-modificada tal como una R-mutante, ventajosamente proporciona un título de anticuerpo anti-SRP es decir 5-20 veces mayor que el refuerzo hecho de una preparación bacteriana de célula completa no-modificada, o un desafío de campo natural.

Aunque no pretende ser una limitación de la invención, el mecanismo por el cual la inmunización con la vacuna actual proporciona la protección contra la infección bacteriana gram-negativa se cree que es como sigue. Después de que un animal ha sido inmunizado con la vacuna, encima de ser desafiado con una cepa patogénica de la bacteria gram-negativa, el cuerpo responde produciendo anticuerpos humorales que bloquean las proteínas receptor de sideróforo en la membrana exterior de la bacteria. Esta previene la absorción del hierro por la célula, que, a su vez, eventualmente matan de hambre las bacterias de nutrientes de hierro requeridos. Otro mecanismo es que los anticuerpos humorales producidos en respuesta a las proteínas receptor de sideróforo en la vacuna, unen a la proteína receptor de sideróforo en la membrana bacteriana para causar la activación del complemento (C'). Esto da lugar a la bacteriólisis complemento-mediada, o al incremento de la opsonización que conduce al incremento de la fagocitosis por el sistema fagocitario mononuclear.

Además, la eficacia de esta vacuna se basa en el uso de proteínas receptor de sideróforo purificadas mejor que utilizando las células completas. La respuesta inmune en animales vacunados con una preparación SRP purificada es aproximadamente 20 veces mayor que la respuesta inmune para una preparación de célula completa crecida bajo las condiciones restringidas de hierro. Durante la asepsia gram-negativa, un animal huésped acumula una respuesta inmune para una bacteria que invade. Desde que el principal constituyente de la pared celular de la bacteria gram-negativa se hace del lipopolisacárido (LPS), la respuesta inmune de un animal se dirige a su estructura que induce un papel inmunodominante para la pared celular del LPS. Las proteínas de la membrana exterior tal como IROMPs o SRPs que no son proteínas dominantes en la superficie de la pared celular bacteriana induce la respuesta inmune limitada resultando en títulos de anticuerpo bajos. De esta manera, el uso de una bacteria hecha de las células bacterianas completas crecido bajo restricción de hierro para expresar las proteínas receptor de sideróforo proporciona una respuesta inmune limitada a las proteínas receptor de sideróforo debido a los antígenos componentes en la superficie celular. Por comparación, la inmunización de un animal con una vacuna hecha de SRPs purificadas, hay menos competición antigénica y el sistema inmune del animal centra su respuesta en las proteínas receptor. Los perfiles sexológicos muestran un incremento significativo en el título de anticuerpo en el grupo SRP-vacunado comparado con el grupo de célula completa-vacunado cuando se refuerza con la célula completa que expresa SRP.

Los anticuerpos policlonales se pueden construir en la proteína receptor de sideróforo por hiperinmunización de un animal con un inóculo que contiene la proteína receptor de sideróforo aislada. El suero de sangre se puede retirar y

contactar con las proteínas receptor de sideróforo reactivas inmovilizadas con la proteína-anticuerpos específicos. El suero semi-purificado además se puede tratar por métodos cromatográficos similares para purificar las inmunoglobulinas IgG e IgM proporcionando un suero de anticuerpos policlonales purificado para uso comercial.

Los anticuerpos monoclonales reactivos con la proteína receptor de sideróforo pueden ser contruidos por técnicas de hibridoma conocidas y utilizadas en el oficio. En resumen, un ratón, rata, conejo u otras especies apropiadas pueden ser inmunizados con una proteína receptor de sideróforo. El bazo del animal luego se retira y procesa como una preparación de célula completa. Siguiendo el método de Kohler y Milstein (*Nature* 256:496-97 (1975)), las células inmunes de la preparación celular del bazo se pueden combinar con las células de mieloma para producir hibridomas. Los hibridomas entonces pueden ser cultivados y el fluido del cultivo probado para anticuerpos específicos para las proteínas receptor de sideróforo utilizando, por ejemplo, un ELISA en el cual las proteínas receptor de sideróforo específicas se adhieren a una superficie sólida y actúan como antígenos de captura. El hibridoma entonces puede ser introducido en el peritoneo de la especie huésped para producir un crecimiento peritoneal del hibridoma, y se pueden colectar los líquidos de ascitis que contienen el anticuerpo monoclonal para la bacteria.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados en composiciones y métodos de diagnóstico y terapéuticos, incluyendo inmunización pasiva. Por ejemplo, las inmunoglobulinas específicas para una proteína receptor de sideróforo pueden ser utilizadas para proporcionar inmunidad pasiva contra la asepsia gram negativa. Los animales se pueden tratar administrando las inmunoglobulinas vía intramuscular a aproximadamente 100/mg/kg de peso corporal, aproximadamente cada 3-7 días.

Un método para el diagnóstico de una infección por bacterias gram-negativas en una muestra del cuerpo se puede realizar con el suero de los anticuerpos policlonales o los anticuerpos monoclonales descritos arriba, en un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), radioinmuno-ensayo (RIA), ensayo inmunofluorescente (IFA), un ensayo Northern, Western o Southern blot, y similares. En resumen, la muestra del anticuerpo o del cuerpo (i.e., muestra de tejido, fluido corporal) se puede inmovilizar, por ejemplo, por contacto con un material polimérico tal como poliestireno, un papel de nitrocelulosa, u otro medio similar para inmovilizar el anticuerpo o la muestra. La otra muestra del anticuerpo o del cuerpo entonces se adiciona, incuba, y el material no-inmovilizado se retira por lavado u otro medio. Un anticuerpo de especie-específico marcado reactivo con el se adiciona más adelante. El anticuerpo del suero o de la bacteria gram-negativa en la muestra del cuerpo, luego se adiciona y la presencia y la cantidad del marcador se determina indicando la presencia y cantidad de bacterias gram-negativas en la muestra del cuerpo.

La invención será descrita más a fondo por la referencia a los siguientes ejemplos detallados, en donde las metodologías son según lo descrito abajo. Estos ejemplos no tienen la intención de limitar el alcance de la invención que ha sido publicada en la descripción precedente. La variación dentro de los conceptos de la invención es evidente para aquellos de habilidad en el oficio. Las divulgaciones de las referencias citadas a través de la aplicación se incorporan aquí por referencia.

Ejemplo 1

Producción y Purificación de las Proteínas Receptor Sideróforo

El serotipo 078 de la *Escherichia coli* (aislado del pavo; serotipado por Pennsylvania State University, depositado con la American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD, U.S.A., as ATCC #55652, el 3 de Enero, 1995) (700 ml a 10^8 colonias/ml) se inoculó en un fermentador Virtis bench-top (Virtis, Inc., Gardiner, NY), cargado con 20-L de infusión cerebro-corazón (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI) que contiene 50 microgramos/ml de dipiridil (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 41°C. Se ha demostrado que este aislado produce cuatro proteínas receptor de sideróforo (MW 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa, 72 kDa) bajo condiciones restrictivas de hierro. El pH se mantuvo constante a 7.4 por titulación automática con NaOH 5 N. El fermentador se agitó a 400 rpm. El cultivo se cosechó continuamente por 18 horas después de los cuales las bacterias se retiraron mediante centrifugación de flujo-continuo a 20,000 x g a 4°C utilizando una centrífuga Beckman (Model J2-21M) (Beckman Instruments, Eden Prairie, MN). La bacteria pelletizada se lavó dos veces con 1,000 ml de suero fisiológico (0.85%) para retirar el contaminante de las proteínas del medio de cultivo.

Las bacterias se resuspendieron en solución salina reguladora-tris (TBS) que contiene 2.0% de N-lauroil sarcosinato de sodio (SARKOSYL™, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), densidad óptica 5%, 540 nm. La suspensión se incubó a 4°C por 45 minutos con agitación continua. Las células luego se desestabilizaron utilizando un baño de ultrasonidos de células de flujo-continuo (Banson 450, Danbury, CT) a 4°C, con una velocidad de flujo máxima de 5 gph. La suspensión celular desestabilizada se centrifugó a 16,000 x g por 20 minutos.

El afluente del baño de ultrasonidos de células de flujo-continuo que contiene las proteínas de la membrana exterior se colectó y concentró utilizando una precipitación con etanol a -20°C. Se entiende que el sobrenadante también puede ser concentrado por concentración de membrana utilizando una membrana diaflow 50,000 MW límite (Amicon, Danvers, MASS). El material concentrado (10% T a 540 nm) se solubilizó utilizando dodecil sulfato de sodio 0.2 por ciento (SDS) en TBS a pH 7.4.

El perfil de elución del material concentrado tratado con SDS al 0.2% se muestra en la Figura 1. El material solubilizado se aplicó a una columna Vantage (Amicon, Danvers, MA) que contiene 3.2-L de gel matriz GC-700 de

ES 2 279 511 T3

flujo rápido cellufine (Amicon, Danvers, MA) equilibrada con TBS que contiene 0.2% de SDS a 25°C. La purificación de la proteína se monitoreo por absorción UV a 280 nm. La velocidad de flujo a través de la columna fue de 3,000 ml/hr y se colectaron fracciones de 15-ml utilizando un Detector UA-5 y un colector de fracciones Retriever 5 (ISCO, Inc., Lincoln, NE). Las fracciones de cada pico se combinaron y concentraron utilizando un equipo de ultrafiltración Diaflo con una membrana 50,000 MWCO. El material concentrado de cada pico se analizó por electroforesis en gel. Como se muestra en la Figura 1, el pico 1 contenía aproximadamente un 85% de proteínas sideróforo puras. Esta solución se precipitó con etanol a -20°C por 24 horas para retirar el SDS, y luego se resuspendió en solución salina reguladora fosfato (PBS). La cantidad de proteína se determinó utilizando un ensayo de proteína Pierce BCA (Pierce, Rockford, IL).

Ejemplo 2

Preparación de una Vacuna con Proteínas Receptor Sideróforo

El precipitado del Ejemplo 1, arriba mencionado, que contiene las proteínas receptor de sideróforo del serotipo 078 de la *E. coli*, se resuspendió en suero fisiológico (0.85%) que contiene 0.1% de formalina como preservativo. La concentración de la proteína fue de 300 µg/ml. La suspensión acuosa de la proteína (1,000 ml) se emulsificó en un adyuvante de agua-en-aceite mineral que contiene 972 ml de aceite mineral Drakeol 6 y 28 ml de Anlcel A como un emulsionante. La mezcla se emulsificó utilizando un emulsionante Ultra-Turnax T50 (KIKI Works, Inc., Cincinnati, OH) a 4°C. La emulsión agua-en-aceite se almacenó a 4°C.

Ejemplo 3

Vacunación de Aves de Corral con la Vacuna de Proteína Receptor Sideróforo

Setenta-dos pavipollos se criaron en aislamiento de un día de edad. A las tres semanas de edad, las aves se dividieron en dos grupos iguales. El grupo 1 fue vacunado vía subcutánea con la vacuna del Ejemplo 2 de arriba, en un nivel de dosificación de 150 µg de proteína receptor de sideróforo por ave. El grupo 2 permaneció como controles no-vacunados. Al grupo 1 se le dio un refuerzo de vacunación con la vacuna en un nivel de dosificación de 250 µg de proteína receptor de sideróforo por ave, a los 18 días después de la primera vacunación.

Las aves vacunadas y no-vacunadas igualmente se dividieron entre cuatro cuartos de aislamiento. Los Cuartos A y B contenían las aves vacunadas, y Los Cuartos C y D contenían los controles no-vacunados. A las siete semanas de edad, las aves en los Grupos A y C se desafiaron vía subcutánea con *Salmonella agona* a 1.0×10^8 cfu/ave. A las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-desafío, dos aves controles y dos aves vacunadas se mataron. Los bazos se extrajeron en forma aséptica de cada ave e individualmente se pesaron, y ajustaron a 4 gramos/bazo, 10 gramos/hígado. Cada muestra luego se homogenizó en suero fisiológico estéril utilizando un Stomacher Lab Blender, Model 3500 (Seward Medical, London). Las diluciones en serie diez-veces de cada homogeneizado se colocaron en placas por duplicado sobre las placas de verde azufre brillante (Difco Laboratories, Detroit, MI).

Los resultados muestran el aclaramiento cuantitativo de *Salmonella agona* en bazos de pavos SRP-vacunado y no-vacunados (Figura 2). El tiempo 0 representa el número de bacterias dados a cada ave. A las 24-horas del post-desafío en las aves vacunadas, el nivel de bacterias se redujo a cero y permaneció en ese nivel a través del periodo de muestreo. En contraste, los controles no-vacunados permanecieron positivos por la duración del experimento.

Ejemplo 4

Reactividad en Cruz de IROMPS Sideróforo Producidos por Escherichia coli (Serotipo 078)

El suero hiperinmunizado producido contra las proteínas receptor de sideróforo purificadas se analizó para su reactividad cruzada en bacterias de diferente género y especie. Las proteínas receptor sideróforo se produjeron en las siguientes bacterias: *Escherichia coli* (serotipos Ola, 02a y serotipo 078 (ATCC #55652)), *Salmonella agona*, *Salmonella blockley*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella hadar*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella choleraesuis*, y *Pasteurella multocida* (serotipo A: 3,4; depositado con ATCC como ATCC #_____, en Febrero _____, 1995. Estas bacterias, a excepción de la *S. choleraesuis*, se aislaron del campo obtenidas de las aves diagnosticadas clínicamente y serotipadas por el State Poultry Testing Laboratory, Willmar, MN (*Salmonella spp.*) y Pennsylvania State University (*E. coli*). *Salmonella choleraesuis* fue obtenida de University de Minnesota Diagnostic Laboratory. Los aislados bacterianos se cultivaron en 100 ml de caldo BHI con dipiridil (175 mM), y sin dipiridil pero que contiene 200 µm de cloruro férrico.

Las bacterias se colectaron de los cultivos celulares por centrifugación a 16,000 x g por 10 minutos a 4°C. El pellet de las células se lavó dos veces en solución salina reguladora-tris (TBS) a pH 7.4 y se resuspendió en 30 ml de TBS. Las células se desestabilizaron vía ultrasonido por 2 minutos a 4°C utilizando un Baño de ultrasonidos Branson Ultrasonic (Danbury, CT). La suspensión celular desestabilizada se centrifugó a 16,000 x g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante colectado se centrifugó a 30,000 x g por 2 horas a 4°C. El pellet se resuspendió en 10 ml de TBS que contiene n-lauroil sarcosinato de sodio al 2% y se colocó en un agitador giratorio por 45 minutos a 4°C. La fracción de la proteína-enriquecida de la membrana exterior insoluble en detergente se colectó por centrifugación a 30,000 x g por 2 horas a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 ml de TBS y se almacenó a -90°C. Las proteínas se separaron por

ES 2 279 511 T3

SDS-PAGE con un 4% de gel de carga sobre un 12% de gel de resolución. Laemmli, U.K., Nature, 227: 680-685 (1970).

5 Las proteínas de membrana exterior de las diferentes *E. coli*, *Salmonella* y *Pasteurella* aisladas se transfirieron de los geles SDS-PAGE a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas se probaron con antisuero negativo (control) y positivo para las proteínas receptor de sideróforo.

10 El control antisuero se colectó de las aves en el grupo 2, según lo descrito en el Ejemplo 3 arriba mencionado. El antisuero positivo se colectó de las aves en el grupo 1 del Ejemplo 3 arriba mencionado, a los 5 días después de la segunda vacunación. El suero, cada 50 ml, se absorbió con la bacteria de la célula completa muerta (*E. coli* 078, *Salmonella heidelberg*, *Pasteurella multocida*) creció en medios saturado de hierro (BHI que contiene 200 μ m de cloruro férrico) por 1 hora a 4°C.

15 Los patrones SDS-PAGE de los extractos de proteína de membrana exterior de los diferentes aislados bacterianos, mostraron expresión de proteínas receptor de sideróforo cuando crecieron bajo condiciones de restricción de hierro, en contraste con los controles sin-hierro restringido las cuales no expresan las proteínas receptor de sideróforo. La *Pasteurella multocida* produjo tres proteínas receptor de sideróforo bajo condiciones de restricción de hierro que tienen pesos moleculares de aproximadamente 96 kDa, 84 kDa y 80 kDa. La *E. coli* aislada produjo una ligera variación en su perfil IROMP. El serotipo 078 produjo cuatro proteínas receptor de sideróforo con peso molecular aproximado de 20 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa y 72 kDa. El serotipo 02a produjo tres bandas con pesos moleculares de 89 kDa, 78 kDa y 72 kDa. El serotipo Ola produjo dos bandas con pesos moleculares de 84 kDa y 78 kDa. Todos los aislados de la *Salmonella* examinada produjeron tres proteínas receptor de sideróforo con diagramas de bandas idénticos con pesos moleculares aproximados de 89 kDa, 81 kDa y 72 kDa.

25 Los análisis Western blot revelaron que el antisuero positivo preparado contra las proteínas receptor de sideróforo purificadas de *E. coli* 078 reaccionaron intensamente con las proteínas receptor de sideróforo de *E. coli* serotipos 01a, 02a y las proteínas receptor de *Salmonella*. La proteína receptor 96 kDa y 84 kDa de *Pasteurella* reacciona con la proteína antisuero positiva *E. coli*. Estos resultados mostraron que las proteínas receptor de sideróforo de *E. coli* tienen homología antigénica completa a la *Salmonella* y homología parcial a la *Pasteurella multocida*. El suero control no 30 reacciona con ninguna de las proteínas receptor de sideróforo de aquellas especies.

Ejemplo 5

Reactividad en Cruz de las Proteínas Receptor Sideróforo de *Escherichia coli* (Serotipo 078)

35 Los aislados de *Escherichia coli* (150 aislados) originados de las aves colisepticémicas se seleccionaron por reactividad con el antisuero positivo del Ejemplo 4, mencionado arriba. Los aislados se analizaron por aglutinación directa utilizando el antisuero receptor de sideróforo y el suero de referencia negativa. Noventa y ocho por ciento (98%) de los aislados *E. coli* se aglutinaron utilizando el antisuero positivo en contraste con el suero negativo. El antisuero positivo 40 también reacciona con *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y cinco sero grupos de *Salmonella* (serotipo B, C₁, C₂, D₁ y E₃).

Ejemplo 6

45 *Respuesta Serológica a las Proteínas Receptor Sideróforo (SRP) de la E. coli en una Parvada Vacunada y No-Vacunada Bajo Condiciones Naturales de Campo*

50 Cincuenta mil, pavipollos de un-día de edad igualmente se dividieron entre dos galpones designados como galpones 1 y 2. A las seis semanas de edad, las aves en el galpón 1 se inyectaron vía subcutánea con una vacuna agua-en-aceite según lo descrito arriba en el Ejemplo 2. Cada ave recibió 0.5 cc que contenían 300 μ g de la proteína receptor de sideróforo (SRP) del serotipo 078 de *E. coli* en la región inferior del cuello. El galpón 2 permaneció como controles no-vacunados. La sangre se extrajo de 15 aves por galpón en intervalos semanales.

55 La Figura 3 representa la respuesta serológica a las SRPs de *E. coli* entre parvadas vacunadas y no- vacunadas. La respuesta del anticuerpo a las SRPs en la parvada vacunada incrementó regularmente con cada periodo de muestreo en comparación con los controles no-vacunados. A los 35 días seguidos de la vacunación, el grupo vacunado tuvo una respuesta de anticuerpo 7.1 veces mayor que el grupo control.

60 La Tabla 1, abajo, muestra el peso promedio de las aves tratadas entre las parvadas vacunadas y no- vacunadas. Hubo una ventaja en peso mayor estadísticamente entre la parvada vacunada (12.2 lbs/ave) en comparación con la parvada no- vacunada (11.8 lbs/ave).

TABLA I

EL PROMEDIO DEL PESO CORPORAL ENTRE PAVOS SRP-VACUNADOS Y NO-VACUNADOS EN EL TIEMPO DEL PROCESO			
Galpón 2 (no-vacunado)		Galpón 1 (SRP-vacunado)	
# de Aves/lote	Promedio del peso corporal (Lbs)	# de Aves/lote	Promedio del peso corporal (Lbs)
2772	11.85	1986	12.00
3103	11.91	3168	12.11
3024	11.92	3072	12.04
3168	11.97	3060	12.25
3256	11.98	3072	12.36
3136	11.75	3072	12.57
3136	11.65	3024	12.31
2112	11.42	3024	12.16
Total 23762	Promedio 11.8	Total 23460	Promedio 12.2
	SD 0.192		SD 0.18
	CV 1.63		CV 1.54

Las Figuras 4 y 5 muestran el porcentaje total de mortalidad y seleccionados en parvadas hermanas *E. coli* SRP-vacunadas (i.e., originarias del mismo criador de gallinas o compañeros de nacimiento), y los controles no-SRP-vacunados, de 3-13 semanas de edad. Estos resultados muestran la verdadera mortalidad en campo después de la vacunación, excluyendo la mortalidad del pavipollo temprana lo que podría dar resultados erróneos. Como puede ser visto, hubo una reducción significativa en la mortalidad y las aves seleccionadas en las parvadas SRP-vacunadas. Estos resultados demuestran la utilidad de la *E. coli*-derivada de proteínas receptor de sideróforo en una vacuna para controlar las infecciones sistémicas causadas por la *E. coli* bajo condiciones naturales de campo.

Ejemplo 7

Reactividad en Cruz de las SRPs de Salmonella senftenberg y Pasteurella multocida

Cuarenta y ocho pavipollos Nicholas se criaron en aislamiento de un día de edad. A las tres semanas de edad, las aves se dividieron en dos grupos iguales designados como Grupo 1 y Grupo 2. Doce aves en el Grupo 1 se vacunaron vía subcutánea con (0.5 cc) 300 µg de SRP purificada aislada de la *Salmonella senftenberg*. La vacuna se preparó según lo descrito en el Ejemplo 2 arriba. Las doce aves remanentes se utilizaron como controles no-vacunados. Las aves en el Grupo 2 se trataron igual que el Grupo 1, excepto que 12 de las aves se vacunaron con 300 µg de SRP purificada aislada de la *Pasteurella multocida*.

Se toma sangre de todas las aves en ambos grupos en intervalos de 5 días. Quince días después de la primera inyección, las aves vacunadas recibieron una segunda inyección de la SRP apropiada. Cada ave vacunada recibió 500 µg, (0.5 cc) de SRP vía subcutánea en un adyuvante agua-en-mineral. Todas las aves no-vacunadas permanecieron como controles. Las aves se sangraron en intervalos de 5-días.

Quince días después de la segunda inyección, las aves vacunadas en el Grupo 1 se desafiaron vía intravenosa con 100 µg de SRP *S. heidelberg* (Figura 7). La sangre se tomó en intervalos de 2-días post desafío. Hubo una alta respuesta del anticuerpo al desafío a 2-y 4-días post desafío. Este dato muestra la reactividad cruzada de *S. heidelberg* al *S. senftenberg*. Estas proteínas, a sus vez, ambas reaccionaron en cruz con la *E. coli*, según se demuestra por el ELISA utilizando SRPs de *E. coli* como el antígeno de captura de acuerdo con el protocolo descrito arriba en el Ejemplo 5.

Igualmente, 15 días después de la segunda inyección, todas las aves en el Grupo 2 se desafiaron vía intramuscular con 1.1×10^6 CFU de *P. multocida*, ATCC cepa P-1059. La mortalidad se registró diariamente por 2 semanas post-desafío. La Figura 6 y la Tabla 2 abajo también muestran la mortalidad entre las aves vacunadas y no-vacunadas siguiente al desafío.

TABLA 2

Mortalidad de los Pavos Vacunados y No-Vacunados Siguiendo el Desafío con Pasteurella multocida P-1059

Números de muertes/total analizado

No-vacunado	Vacunado
11/12 (91.6 %)	1/12 (8.3 %)

Once (91.6%) de las aves no-vacunadas murieron dentro de 14 días después del desafío (ver, Figura 6). En contraste, solo 1 (8.3%) de las aves en el grupo vacunado murió. Estos resultados demostraron que las proteínas receptor de sideróforo pueden ser utilizadas como inmunógenos protectores.

Las Figuras 7 y 8 muestran la respuesta serológica de las aves vacunadas con proteínas receptor de sideróforo aisladas de *S. senftenberg* y *P. multocida*, respectivamente. Las proteínas receptor de sideróforo inducen respuesta inmune primaria y secundaria en ambos grupos vacunados a los 10 y 20 días post-vacunación en comparación con las aves control no-vacunadas. Estas respuestas del anticuerpo demuestran la naturaleza de reactividad cruzada de estos la proteína, la cual fue confirmada en el ensayo de ELISA utilizando SRPs aisladas de la *E. coli* como antígenos de captura.

Ejemplo 8

Reactividad en Cruz de las Proteínas Receptor Sideróforo según se Evaluaron por ELISA

La reactividad cruzada de las proteínas receptor de sideróforo de la *E. coli* del Ejemplo 7 arriba fue además analizada utilizando un Ensayo con Sustancias Inmunoabsorbentes Unidas a enzimas (ELISA). Las proteínas receptor de sideróforo (SRPs) se purificaron de los geles de poliacrilamida utilizando un electro-eluter modelo 422 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las proteínas entonces se utilizaron como moléculas de captura en el análisis de ELISA indirecto.

Las concentraciones óptimas de trabajo de SRP y del conjugado se determinaron por varias titulaciones chequer-board utilizando los sueros control positivo y negativo del Ejemplo 6 de arriba. Entonces se estableció una curva de la predicción para calcular los títulos ELISA de SRP en una dilución 1:200. Todas las pruebas subsiguientes se realizaron en una sola dilución del suero (1:200) y los títulos SRP se calcularon del promedio de los valores de absorbancia de las pruebas por duplicado.

El ELISA se realizó adicionando 100 μ l de SRP de *E. coli* diluido en 0.05 M (0.1 μ g) solución reguladora carbonato (pH 9.6) para cada pozo de una placa microtituladora de 96-pozos de fondo plano, fácil de lavar (Corning, Corning, NY). Después de la incubación durante la noche a 4°C, el exceso de SRP se extrajo y la placa se lavó. Todas las etapas de lavado subsiguientes se hicieron tres veces en solución salina reguladora fosfato (pH 7.4) con 0.05% Tween 20. Las placas se bloquearon por una hora a 37°C con 4% de Fish Gelatin (Sigma) en PBS y luego se lavaron.

Las muestras de suero por duplicado del Ejemplo 7 se probaron en paralelo en diluciones de un solo punto utilizando 100 μ l/pozo y se incubaron por 40 minutos a 37°C. Cada placa contenía el suero control positivo y negativo obtenido de las aves del Ejemplo 4 de arriba. Después del lavado, se adicionaron 100 μ l del conjugado peroxidasa-marcado a cada pozo. Después de la incubación por 40 minutos a 37°C, las placas se lavaron y se adicionaron 100 μ l de sustrato peroxidasa ABTS en solución reguladora H₂O₂ (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) a cada pozo. El sustrato se dejó reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó con 50 μ l de SDS al 1% y se lee la absorbancia directamente utilizando un lector de placa microtituladora MR650 (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA).

Ejemplo 9

Protocolo de Fermentación para la producción de las proteínas receptor de sideróforo

El siguiente protocolo se utilizó para cultivar la *E. coli* 078 (ATCC #55652) resultando en la expresión de seis (6) proteínas receptor de sideróforo.

Una semilla maestra *E. coli* stock se preparó cultivando el organismo en 2000 ml de caldo BHI estéril que contiene 1-500 μ g 2,2'-dipiridil por 8 horas a 37°C. La bacteria se cosechó por centrifugación a 10,000 x g durante 30 minutos. El cultivo se lava dos veces por centrifugación y el pellet se resuspende en PBS estéril. El pellet final se resuspendió en 500 ml de BHI estéril que contiene 20% de estéril glicerol. Un mililitro del cultivo se transfirió a un criovial de 2-ml y se almacenó a -85°C.

ES 2 279 511 T3

Un crivial (1 ml) de la semilla maestra de *E. coli* stock se utilizó para inocular un matraz de cultivo de 100-ml que contiene triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), dextrosa (2 g/l), NaCl (10 g/l), y 2,2'-dipiridil (15.0 µg/ml). El cultivo se incubó a 37°C por 7 horas, en cuyo caso se inoculó en 2 litros del medio de arriba y se dejó crecer por 4 horas adicionales a 37°C. El cultivo de 2-litros se utilizó para inocular un fermentador de sobremesa Virtis de 20-litros (Model 233353, Virtis, Gardiner, NY) cargado con 13 litros del medio descrito arriba. El pH se mantuvo constante entre 6.9 y 7.2 por titulación automática con 30% de NaOH y 10% de HCl. La velocidad de agitación fue 250 rev/minuto, y el cultivo se ventiló con 11 litros/minuto a 34°C. La producción de espuma se controló automáticamente por la adición del antiespumante de silicona 0.4% (Antifoam- B, J.T Baker, NJ). El cultivo se dejó crecer continuamente en estas condiciones por 12 horas (O.D. 600 nm = 7.10) en el tiempo que se introdujo bombeando en un fermentador de 150-litros (W. B. Moore, Easton PN) cargado con 110 litros del medio descrito arriba que contiene 26.7 µg/ml de dipiridil y 0.2% del antiespumante. Las condiciones en el fermentador fueron las siguientes: 450 rpm, 50 slpm aire, presión diferencial 10 psi, 34°C, y pH mantenido a 6.9 con NaOH.

Después de 12 horas de fermentación, la bacteria se inactivó por la adición de 0.15% de formalina. La bacteria se cosechó por centrifugación de flujo continuo (20,000 x g a 4°C) utilizando dos centrífugas Beckman (Model J2-21M) equipadas con rotores de flujo continuo JCF-Z.

Las bacterias pelletizadas luego se lavaron para retirar las proteínas del medio de cultivo contaminantes y además se procesaron según lo descrito arriba en el Ejemplo 1. El material concentrado se trató con 0.2% de SDS y eluyó según lo descrito arriba en el Ejemplo 1. El pico del perfil de elución que contiene aproximadamente 85% de proteínas receptor de sideróforo puras se precipitó con etanol para retirar el SDS, y se resuspendió en PBS.

El material se separó por SDS-PAGE según lo descrito arriba en el Ejemplo 4 con un 4% del gel de carga sobre 12.5% de gel acrilamida. El patrón SDS-PAGE del extracto de la proteína de la membrana exterior mostró la expresión de las SRPs que tienen pesos moleculares de 91-92 kDa, 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa, 74 kDa y 72 kDa.

Ejemplo 10

Eficacia de la vacuna de las SRPs a partir de la Escherichia coli bajo condiciones de campo naturales

La eficacia de la vacunación de pavos con proteínas receptor de sideróforo (SRPs) de *E. coli* bajo condiciones de campo naturales se mostraron como sigue. Una granja compleja con una historia de enfermedad fue seleccionada para pruebas experimentales. La facilidad fue una operación de tres condiciones, teniendo dos galpones de cría de pollos y ocho granjas de acabado.

Los datos se colectaron por un año previo a la vacunación para establecer un perfil exacto sobre la mortalidad y el rendimiento de las aves (parvadas 1-16 antes de la vacunación). La vacunación con SRPs se evaluó por un periodo de 6 meses (parvadas 17-24 después de la vacunación). Se analizó un total de 24 parvadas que comprenden 1,160,864 aves. Las pruebas de vacunación iniciaron en enero y marcharon a través de Julio, considerando que es un periodo de tiempo crítico para las infecciones de *E. coli* y otros desafíos naturales en campo.

Los galpones incubadora 1 y 2 se dividieron por la mitad y se designaron como A y B (galpón-1) y C y D (galpón-2). Aproximadamente 50,000 gallinas aleatoriamente se colocaron en cada galpón de tal manera que cada parvada contenía 25,000 aves. Todas las parvadas se vacunaron por inyección subcutánea a las 3 semanas de edad con una preparación de la vacuna que contiene SRPs (MW 91-92 kDa, 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa, 74 kDa y 72 kDa, SDS-PAGE sobre 12.5% de gel acrilamida) aisladas y purificadas de la *E. coli* 078 según lo descrito arriba en el Ejemplo 1. Las parvadas A y C se vacunaron con un nivel de dosificación de 300 µg SRP y 10⁹ del Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) TCID₅₀ en una emulsión agua-en-aceite. Las parvadas B y D fueron los controles, y se les administró un nivel de dosificación de 10⁹ NDV TCID₅₀ solo.

A las 4 semanas de edad, las aves se movieron en cuatro galpones de segunda-etapa mientras que mantenían la identidad. A las nueve semanas de edad, las aves se movieron a cuatro galpones de acabado, manteniendo la identidad en cada 25,000 aves de la parvada. Las aves se comercializaron a las 12- y 14-semanas de edad y la identidad fue mantenida a través del proceso.

La Tabla 3 muestra la historia de la granja acumulativa antes y después de la SRP-vacunación. Veinte-cuatro parvadas se evaluaron, la 16 antes de la vacunación (1-16) y las 8 parvadas vacunadas (17-24) incluyendo los controles. Las parvadas 1-16 no se SRP vacunaron e se incluyen como una historia de la granja para mostrar la ventaja del rendimiento en las parvadas SRP-vacunadas 17-24.

La Tabla 3 abajo, muestra la edad a la cual cada parvada fue comercializada, el conteo por unidades head count, porcentaje total de mortalidad, condem (i.e., censura al proceso), y peso promedio del ave/lote procesado.

ES 2 279 511 T3

TABLA 3

Antecedentes de la Parvada Antes de la vacunación-SRP

Parvada	Edad (días)	Conteo por Unidades	(%) de Mortalidad	(%)Condem	Peso promedio
1	97	47818	8.37	1.13	13.88
2	94	45638	12.53	1.17	13.80
3	95	51443	12.87	3.44	13.58
4	96	49999	4.20	1.23	13.86
5	92	49733	4.68	0.96	13.25
6	96	48303	7.36	1.25	13.49
7	101	48722	16.50	2.12	15.10
8	103	51456	12.26	1.41	15.60
9	98	50423	7.84	1.63	14.73
10	96	50880	7.04	1.59	13.81
11	95	46710	14.85	1.16	14.04
12	98	48994	11.32	1.09	13.89
13	92	43433	21.28	1.74	13.23
14	94	49806	9.59	1.08	13.64
15	93	39216	28.08	2.35	12.92
16	96	46119	15.95	1.45	13.76

Parvada	Edad (días)	Conteo por Unidades	(%) de Mortalidad	(%) Condem	Peso promedio
17	99	48323	8.08	1.45	15.37
18	96	48091	8.15	1.16	14.93
19	96	48748	6.89	1.07	16.16
20	90	48462	7.36	1.06	14.11
21	92	49175	6.11	1.00	15.08
22	90	48261	7.86	0.83	14.38
23	94	51813	5.95	0.92	15.52
24	98	49296	9.44	1.08	16.10
Promedio	96/94	48043/49021	12.2/7.5	1.6/1.07	13.9/15.3
	SD 2.9/3.5		6.2/1.2	0.63/0.18	0.70/0.77
	CV 3.1/3.7		51.4/15.5	40.9/17.2	5.0/5.0

Como se muestra arriba en la Tabla 3, el porcentaje promedio de mortalidad antes de la vacunación fue de 12.2 ± 6.2 con un coeficiente de variación (cv) de 51.4% en comparación con la mortalidad promedio después de la vacunación de 7.5 ± 1.2 con un cv de 15.5%. Esto es una disminución del 4.7% en la mortalidad, lo que equivale a 4700 aves por cada 100,000. La disminución en el coeficiente de variación (51.4% en comparación con 15.5%) sobre la mortalidad total ilustra un efecto positivo sobre habitabilidad y uniformidad del ave. La Figura 9 es una representación gráfica de mortalidad en las parvadas consecutivas antes y después de la vacunación.

La censura también se efectuó positivamente mostrando 1.6 ± 0.63 por ciento antes de la vacunación en comparación con 1.07 ± 0.18 por ciento después de la vacunación (Tabla 3 arriba). La diferencia, 0.53% es significativa considerando el número de aves procesadas.

Un efecto dramático que se observó por la vacunación de SRP fue la ventaja del incremento de peso, según lo considerado arriba en la Tabla 3. Antes de la vacunación el peso promedio del ave fue de 13.9 ± 0.70 libras, con un tiempo de crecimiento promedio de 96 días. El peso promedio por ave después de la vacunación fue de 15.3 ± 0.77 libras, con un tiempo de crecimiento promedio de 94 días. Estos resultados demuestran la ventaja en el rendimiento que se puede obtener con la vacunación-SRP.

La Figura 10 muestra la respuesta serológica a la SRPs de *E. coli* entre las parvadas SRP-vacunado y no-SRP-vacunadas según se determinó por ELISA, utilizando SRPs de *E. coli* purificadas como la molécula de captura. El ensayo se condujo según lo descrito arriba en el Ejemplo 8. El perfil fue consistente entre las parvadas vacunadas y no-vacunadas bajo condiciones de campo naturales. Como el perfil ilustra, una vez el sistema inmune del ave se enfoca para reconocer estas proteínas, el desafío en campo continuo por la bacteria que expresan las SRPs causa una subida constante en título del anticuerpo a un nivel que proporciona la protección y/o al punto donde el desafío sistémico no ocasiona el rendimiento.

El uso de las IROMPs purificadas en una vacuna optimiza el sistema inmune del animal para centrarse en aquellas proteínas. Las aves vacunadas con $300 \mu\text{g}$ de SRP purificada a las tres semanas de edad demostraron un incremento en el título a las 11 semanas de edad el cual fue 10,000 veces mayor que el título en los controles no-SRP-vacunados. Este incremento en el título es el resultado de centrar el sistema inmune para reconocer estas proteínas. Una vez vacunada, el ave establece una población de células de la memoria que se activan bajo cada desafío de campo. Bajo condiciones de campo naturales, el ave continuamente se desafía por la bacteria gram negativa tal como *E. coli*, que expresan las SRPs que reaccionan en cruz y causan una subida continua en el título del anticuerpo (como se vio en las aves SRP-vacunadas). Por comparación, las aves control bajo las mismas condiciones, muestran títulos bajos del anticuerpo aún cuando están expuestas a los mismos desafíos de campo.

Ejemplo 11

Vacunación con SRP-vacuna y vacuna hecha con células bacterianas completas

Una comparación se hizo entre los pavos inyectados con una vacuna hecha de SRPs purificadas derivadas de la *Salmonella heidelberg* preparada según lo descrito arriba en el Ejemplo 1, y una vacuna hecha de células bacterianas completas del mismo organismo creció bajo restricciones de hierro así como para expresar SRP en la superficie celular. La bacteria de la célula completa se preparó según lo descrito en el Ejemplo 1, excepto por la siguiente modificación: después del proceso de fermentación se adicionaron 0.3% de formalina al recipiente para matar el organismo. Las bacterias muertas se colectaron según lo descrito en el Ejemplo 1, se lavaron y resuspendieron en suero fisiológico, y se ajustaron a una densidad óptica de 35% T a 540 nm para dar aproximadamente 10^7 bacterias/ml. La vacuna se preparó según lo descrito arriba en el Ejemplo 2.

Cuarenta y cinco mil pavipollos (gallinas) híbridos de un-día de edad se criaron a 4 semanas de edad, en una instalación de cría de pollitos. A cuatro semanas de edad, las aves se movieron a una instalación de crecimiento e igualmente se dividieron entre dos galpones designados como galpones 1 y 2. En las 6 semanas de edad, las aves en el galpón 1 se vacunaron vía subcutánea en el cuello inferior con 0.5 cc de la vacuna SRP mientras las aves en el galpón 2 se vacunaron con la preparación de la célula completa. La sangre se tomó de 12 aves/galpón en intervalos semanales para monitorear la respuesta serológica a SRP entre los dos grupos.

La Figura 11 muestra el título para SRP entre la célula completa y las aves SRP-vacunadas. La respuesta inmunológica para SRP fue significativamente mayor en el grupo SRP-vacunado purificado en comparación con el grupo vacunado de célula completa. Estos resultados demuestran claramente la eficacia de utilizar una preparación sustancialmente pura de SRP para inducir una respuesta inmune en un animal en contraste con el uso de la célula completa que expresa el mismo SRP.

Ejemplo 12

Transferencia de anticuerpos anti-SRP a la Progenie de la Gallina de Criadero

La mortalidad de 10-días en progenie de gallinas de criadero SRP-vacunadas y no-vacunadas se evaluó para determinar la transferencia de los anticuerpos anti-SRP del adulto a la progenie.

Veinte mil pavipollos Nicholas (gallinas) seleccionadas al azar se dividieron igualmente entre dos galpones de incubadora designados como galpones 1 y 2. A las cuatro semanas de edad, todas las aves en el galpón 1 se vacunaron con $300 \mu\text{g}$ de *E. coli* SRP y Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) en una vacuna agua-en-aceite. Las aves en el galpón 2 se dieron solo NDV y actuaron como controles. A las 24 semanas de edad, las aves del galpón 1 se dieron una segunda inyección de SRP a $300 \mu\text{g}/\text{ave}$. Las aves del galpón 2 permanecieron como controles no-vacunados. A las treinta semanas de edad, las aves se colocaron en los galpones 1 y 2 de una instalación de la granja. En midday, los huevos se colectaron de las gallinas SRP-vacunadas y no-vacunadas. Los huevos se recogieron en incubadoras y nacederos separados. En el tiempo de la salida del pollo, todos los pavipollos se trataron igual y su identidad fue mantenida a través del sexado y el mantenimiento.

Cinco mil pavipollos (gallinas) de cada grupo se colocaron en un galpón comercial de cría de pollitos y se mantuvieron en círculos de cría de pollitos a 7 círculos/grupo que contienen 714 pavipollos/círculo. La mortalidad del pavipollo se monitoreo por cada círculo/grupo por un periodo de 10 días.

5 La mortalidad total de 10-días en los pavipollos que originaban de las gallinas SRP-vacunadas fue 105 (2.1%) en comparación con 160 (3.2%) en la progenie no-vacunada (Figura 12). Esto es una ventaja del 1.1% en habitabilidad de pavipollo, que equivale a 1100 pavipollos por cada 100,000. Esto es significativo considerando que hay 200 millones de pavos en los Estados Unidos y 7 mil millones de parrillas por todo el mundo.

10 Estos resultados demuestran el efecto benéfico de vacunar los animales reproductores para inducir el anticuerpo maternal a SRP en la progenie para reducir las infecciones gram-negativas que son responsables de mucha de la mortalidad temprana del pavipollo.

Ejemplo 13

15 *La naturaleza de Reactividad en Cruz y Protección Cruzada de las proteínas receptor de sideróforo (SRP) entre diferentes serogrupos de salmonella*

20 La SRP de *Salmonella enteritidis* (Se), serogrupo D₁ y *Salmonella typhimurium* (St), serogrupo B se analizaron por su capacidad para reaccionar en cruz y proteger en cruz. Brevemente, 160 pavipollos híbridos (gallinas) seleccionados al azar se criaron en aislamiento. A las tres semanas de edad, las aves igualmente se dividieron entre 4 cuartos de aislamiento, 40 aves/cuarto, designado como A, B, C y D. Las aves en el grupo C se inyectaron vía subcutánea con una vacuna agua-en-aceite, según lo descrito arriba en el Ejemplo 2, que contiene 300 µg SRP de *S. typhimurium*. Las aves en el cuarto D se inyectaron vía subcutánea con 300 µg SRP de *S. enteritidis*. Las aves en los cuartos A y B permanecieron como controles no-vacunados. La sangre se tomó de 10 aves/grupo en intervalos semanales para monitorear la respuesta serológica a la SRP.

30 Veinte y uno días después de la primera inyección, a las aves en los grupos C y D se les aplico una segunda inyección que contiene 300 µg de la SRP apropiada. La sangre se tomó al 5 y 10 días después de la segunda inyección. La respuesta serológica para SRP se analizó por ELISA utilizando la SRP de *E. coli* como la molécula de captura según lo descrito arriba en el Ejemplo 8.

35 Las Figuras 13 y 14 muestran la respuesta serológica de las aves vacunadas con SRP aislada de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. La respuesta inmunológica a la SRP incrementa regularmente en ambos grupos con cada periodo de muestreo en comparación con los controles no-vacunados, que mostraron la inmunogenicidad de estas proteínas. Considerablemente, estos resultados muestran reactividad cruzada natural de estas proteínas dado que el ELISA está utilizando la SRP de la *E. coli* como la molécula de captura.

40 Quince días después de la segunda inyección, todas las aves se desafiaron vía intravenosa con una cepa de *S. enteritidis* o *S. typhimurium* resistente al ácido nalidíxico a 5.0×10^7 unidades formadoras de colonia (CFU)/ave. Estas bacterias se hicieron resistentes al ácido nalidíxico para mejorar su aislamiento incorporando el ácido nalidíxico en los medios de recuperación que eliminan cualquier contaminación. Las bacterias resistentes al ácido nalidíxico se prepararon como sigue: Un ml de un cultivo de Caldo de Soja Trípico (TSB) de 12-horas de *S. enteritidis* y/o *S. typhimurium* que contiene aproximadamente 10^8 organismos viables, se diseminaron sobre la superficie de una 45 placa (Difco) de agar verde azufre brillante (BSG) que contiene 500 µg/ml de ácido nalidíxico (Sigma). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y las colonias que crecieron se clonaron colocándolas en placas sobre BSG que contiene 250 µg/ml de ácido nalidíxico. Las cepas de salmonella resistentes al ácido nalidíxico se incubaron en 100 ml de TSB a 37°C por 12 horas. En el final de la incubación, el cultivo se centrifugó ($10,000 \times g$) y se lava dos veces en PBS (pH 7.4), y la densidad óptica se ajusta al 35% de transmisión a 540 nm para obtener 5.0×10^7 CFU/ml. Estos 50 aislados entonces se utilizaron para el desafío.

55 Para evaluar la protección homóloga y heteróloga, veinte aves en el cuarto C (vacunadas con St-SRP) se agruparon y trasladaron al cuarto D, y 20 aves en el cuarto D (vacunado con Se-SRP) se agruparon y trasladaron al cuarto C. Todas las aves en el cuarto C (20 St-vacunado y 20 Se-vacunado) se desafiaron con *S. typhimurium*, mientras la aves en el cuarto D (20 Se-vacunado y 20 St-vacunado) se desafiaron con *S. enteritidis*.

60 A las 24, 48, 72 y 96 horas del post-desafío, dos aves de cada grupo se mataron. Los bazoos se extrajeron en forma aséptica de cada ave e individualmente se pesaron, y ajustaron a 4 gramos/bazo. También se tomo una muestra fecal de la unión cecal de cada ave. Cada muestra se pesó y ajustó a 0.5 gramos. Cuatro mililitros de solución salina estéril se adicionaron a cada bazo y 0.5 ml a cada muestra fecal. Cada muestra se homogenizó utilizando un Mezclador Stomacher Lab (Sewert Medical, London) por 1 minuto. Las diluciones en serie de diez-veces de cada homogeneizado se colocaron en placas por duplicado en placas de BSG que contienen 250 µg/ml de ácido nalidíxico.

65 Los resultados muestran el aclaramiento cuantitativo de *S. typhimurium* (St) (Figura 15) y *S. enteritidis* (Se) (Figura 16) en los bazoos de los pavos SRP-vacunado y no-vacunado. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, hubo un estado de declinación en el número de bacterias/bazo. A las 96 horas después del desafío (chlg), la diferencia entre el grupo vacunado y no-vacunado fue aproximadamente 2.5 logs. Un aspecto importante de estos resultados es la naturaleza de protección cruzada inducida por estas proteínas. La Figura 15 muestra la naturaleza de protección cruzada de las aves

ES 2 279 511 T3

vacunadas con la SRP de Se pero desafiados con St. La Figura 16 muestra este mismo efecto de protección cruzada de aves vacunadas con SRP de Se y luego desafiadas con St. Todos los grupos vacunados mostraron una reducción significativa en el número de bacteria en bazos en contraste a las aves no-vacunadas.

5 A las 72 y 96 horas después del desafío, el vertimiento intestinal de la *Salmonella* fue detectado en las aves no-vacunadas en el mayor entonces 4 log. En contraste, todas las aves vacunadas eran negativas para la *Salmonella* dentro de este mismo periodo de muestreo. Estos resultados indican que estas proteínas pueden tener algún efecto benéfico en la prevención de la colonización intestinal de *Salmonella*.

10 Ejemplo 16

Preparación y uso de la transmembrana 37-38 kDa y las proteínas porinas en una vacuna

15 Las transmembranas y proteínas porinas (MW 34-38 kDa), identificadas como OmpA, OmpC, OmpD y OmpF se expresan con y sin hierro. Estas proteínas pueden ser purificadas según lo descrito arriba en el Ejemplo 1, colectando las fracciones 1650-2250 como se muestra en la Figura 1. Estas proteínas se pueden combinar con el pico 1 (Figura 1) para obtener una combinación de SRP y las proteínas porinas que se conservan entre la *Salmonella*, *E. coli*, y *Pasteurella*.

20 Una vacuna que contiene las SRPs de *E. coli* (MW 89 kDa, 84 kDa, 78 kDa y 72 kDa) se combinó con las porinas (MW 34 kDa-38 kDa) para dar el contenido total de proteína de 600 µg/ml, y se prepara según lo descrito arriba en el Ejemplo 2. La vacuna se utilizó para inducir el suero hipermunizado. En resumen, seis (6) pavos de tres-semana de edad se les aplicaron una sola inyección subcutánea en la región inferior del cuello seguido por una segunda inyección 15 días después. El suero se colectó 10 días después de la segunda inyección.

25 El análisis Western blot, según lo descrito arriba en el Ejemplo 4, utilizando extractos de sarcosina de la pared celular de *E. coli*, *Salmonella* y *Pasteurella* y probados con el suero de arriba reveló las proteínas cruzadas-negativas en la región 34 kDa y 38 kDa así como las SRPs de cada aislado analizado.

30 Estos resultados indican el potencial de utilizar la proteína conservada (SRP y porinas) como un método efectivo para la vacunación contra infecciones gram-negativas.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para utilizar en la inmunización un animal contra una infección por bacterias gram negativas que comprende:

cuatro o más proteínas receptor de sideróforo sustancialmente puras, en donde las proteínas se derivan de la membrana exterior de dos o más cepas diferentes o especies de bacterias gram-negativas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* y/o *Pseudomonadaceae*, en donde la vacuna previene la infección del animal por una bacteria gram negativa es decir de una cepa, especie o género diferente de las dos o más bacterias gram-negativas utilizadas para obtener las proteínas receptor de sideróforo.

2. El uso de la composición de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para la inmunización de una especie aviar contra una infección por una bacteria gram-negativa.

3. Un suero para utilizar en el tratamiento de un animal contra la infección por una bacteria gram-negativa, que comprende:

un suero de sangre semi-purificado de un animal inoculado con la composición de la reivindicación 1; en donde el suero previene la infección del animal por una bacteria gram negativa la cual es de un serotipo, especie o género diferente de las dos o más bacterias gram-negativas presentes en la composición de la reivindicación 1.

4. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición comprende cuatro proteínas receptor de sideróforo de una *E.coli*.

5. Una vacuna de la reivindicación 1 o 4, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de la *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp.*

6. Una vacuna para utilizar en la inmunización de un animal contra una infección gram-negativa que comprende:

cuatro o más proteínas receptor de sideróforo sustancialmente puras, de la membrana exterior de dos o más bacterias gram negativas en combinación con un excipiente fisiológico aceptable y una proteína porina derivada de las bacterias gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* o *Pseudomonadaceae*.

7. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición comprende de 5-15 proteínas receptor de sideróforo.

8. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición es efectiva para estimular la producción de anticuerpos para las proteínas receptor de sideróforo en un animal adulto y la transferencia subsiguiente de dichos anticuerpos a la progenie del adulto.

9. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición además comprende un excipiente líquido, y una cantidad de las proteínas receptor de sideróforo de aproximadamente 25-5000 µg/ml.

10. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición está en la forma de una solución, de una emulsión agua-en-aceite, de liposomas, o de una matriz sólida metabolizable.

11. Una vacuna de la reivindicación 1, 6 o 9, en donde la composición está en una forma para ser administrada por inyección subcutánea, inyección intramuscular, depósito de liberación controlada, aplicación con aerosol, o inoculación en un huevo.

12. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo seleccionadas del grupo que consiste de las proteínas receptor aerobactina, enteroquelina, citrato, multocidina y ferricromo.

13. Una vacuna de la reivindicación 4, en donde la *E.coli* es *E.coli* 078.

14. Una vacuna de la reivindicación 6, en donde la composición comprende una proteína porina con un peso molecular de 34-38 kDa.

15. Una vacuna de la reivindicación 6, en donde la composición está en la forma de una solución, de una emulsión agua-en-aceite, de liposomas o de una matriz sólida metabolizable.

16. Una vacuna de la reivindicación 6, en donde la composición comprende una cantidad de proteínas receptor de sideróforo de aproximadamente 25-5000 µg/ml.

17. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende cuatro proteínas receptor de sideróforo a partir de una *E.coli*.

ES 2 279 511 T3

18. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp.*

19. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende 5-15 proteínas receptor de sideróforo.

20. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición es efectiva para estimular la producción de anticuerpos para las proteínas receptor de sideróforo en un animal adulto y la transferencia subsiguiente de dichos anticuerpos a la progenie del adulto.

21. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición además comprende un excipiente líquido, y un cantidad de proteínas receptor de sideróforo de aproximadamente 25-5000 µg/ml.

22. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición está en la forma de una solución, de una emulsión agua-en-aceite, de liposomas, o de una matriz sólida metabolizable.

23. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo seleccionadas del grupo que consiste de aerobactina, enteroquelina, citrato, multocidina y proteínas receptor de ferricromo.

24. El uso de la reivindicación 17, en donde la *E.coli* es *E.coli* 078.

25. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende una proteína porina con un peso molecular de 34-38 kDa.

26. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición comprende una cantidad de proteínas receptor de sideróforo de aproximadamente 25-5000 µg/ml.

27. Un uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende una cantidad de proteínas receptor de sideróforo de aproximadamente 25-5000 µg/ml.

28. Una vacuna de las reivindicaciones 1 o 6, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Escherichia coli*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, o *Pasteurella multocida*.

29. Un uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Escherichia coli*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, o *Pasteurella multocida*.

30. Una vacuna de las reivindicaciones 1 o 6, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de una especie de *Pasteurella*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Salmonella spp.* o *Escherichia coli*.

31. Un uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de una especie de *Pasteurella*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Salmonella spp.* o *Escherichia coli*.

32. Una vacuna de las reivindicaciones 1 o 6, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de una especie de *Salmonella*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, o *Pasteurella multocida*.

33. Un uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de una especie de *Salmonella*, y la composición además comprende las proteínas receptor de sideróforo obtenidas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, o *Pasteurella multocida*.

34. Una vacuna de la reivindicación 1, en donde la composición comprende tres proteínas receptor de sideróforo a partir de *Salmonella spp.*

35. El uso de la reivindicación 2, en donde la composición comprende tres proteínas receptor de sideróforo a partir de *Salmonella spp.*

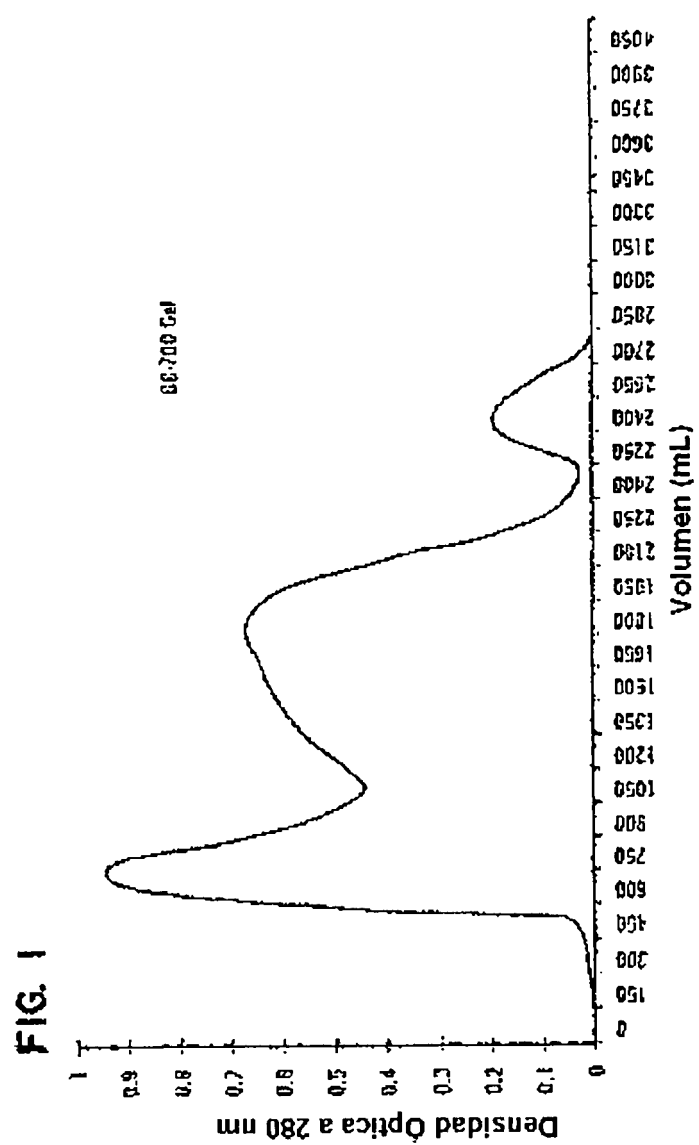
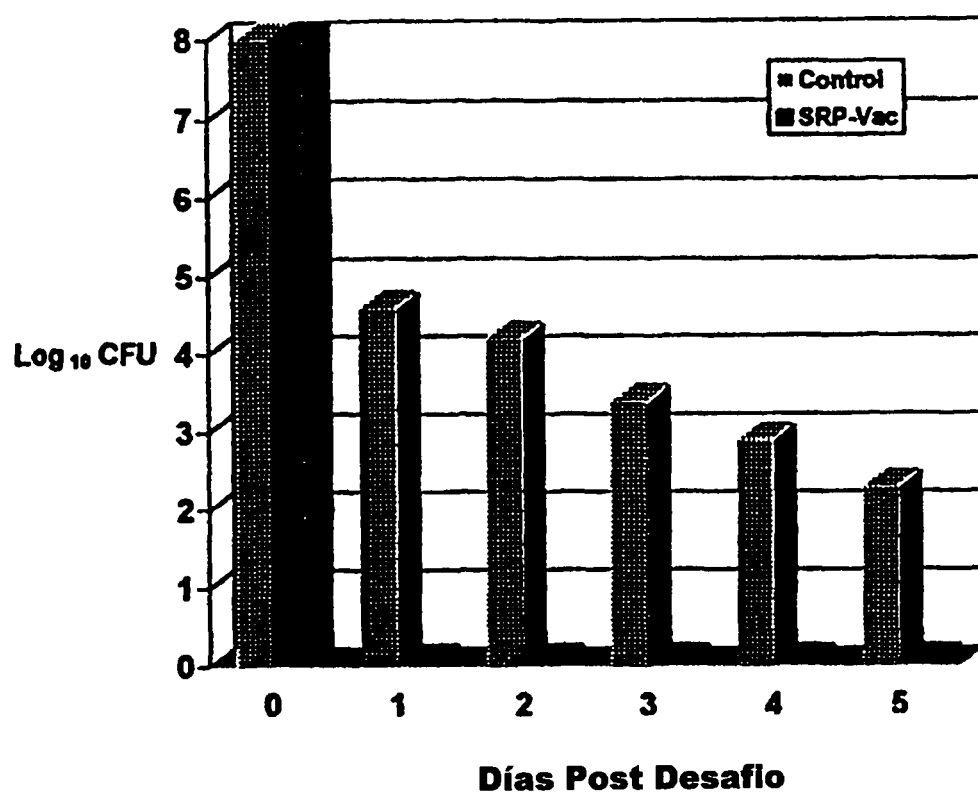


FIG. 2



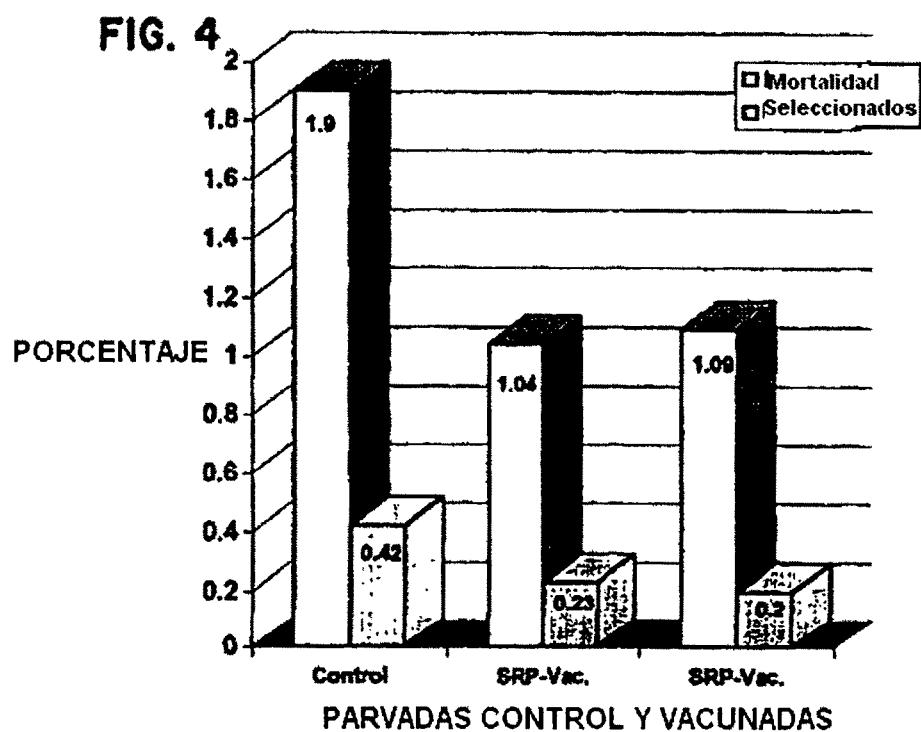
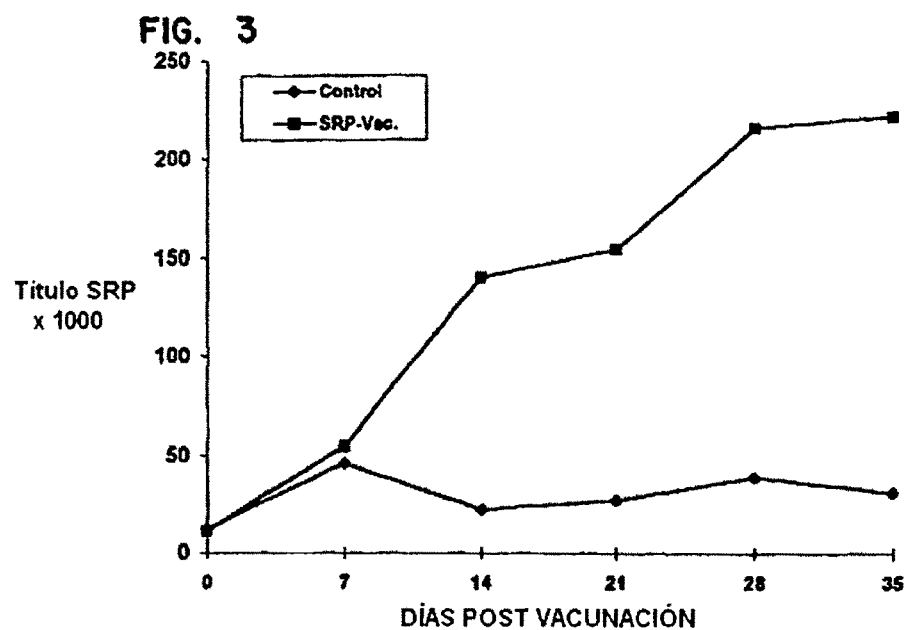


FIG. 5

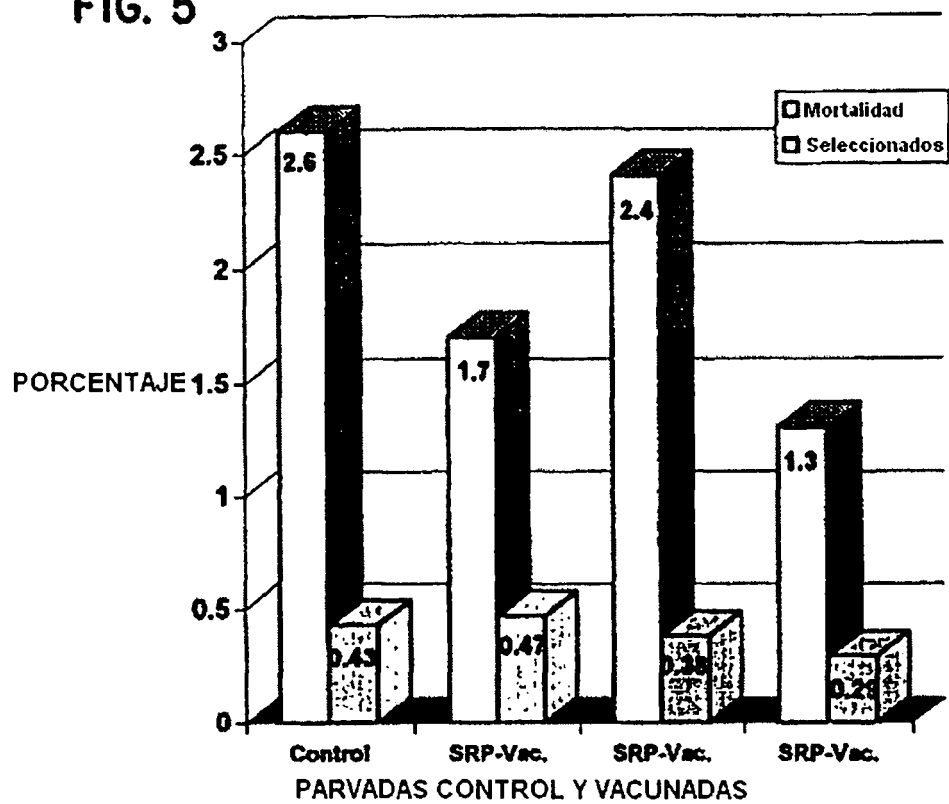
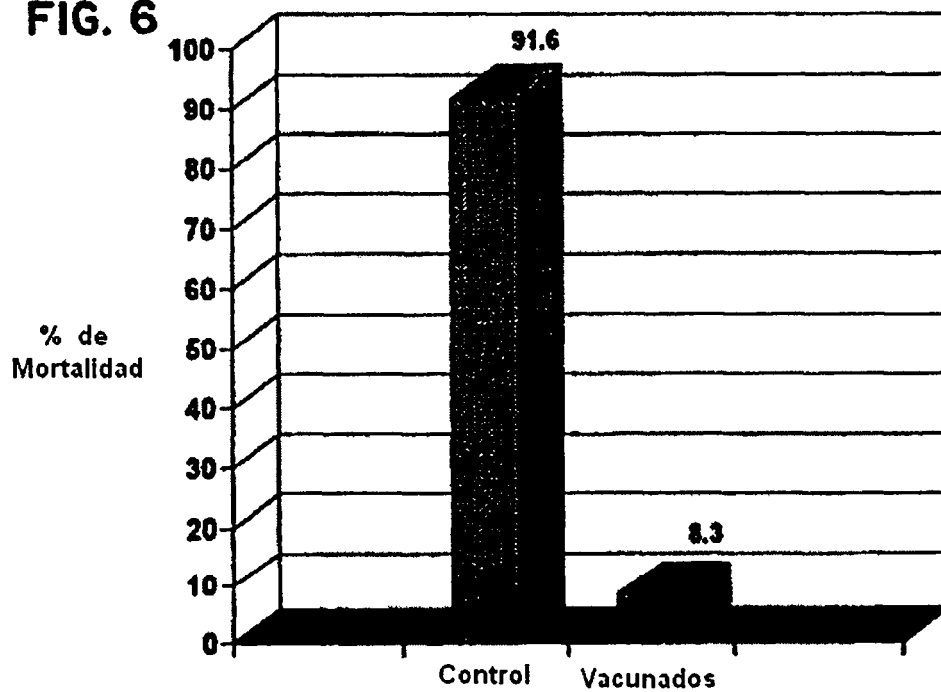


FIG. 6



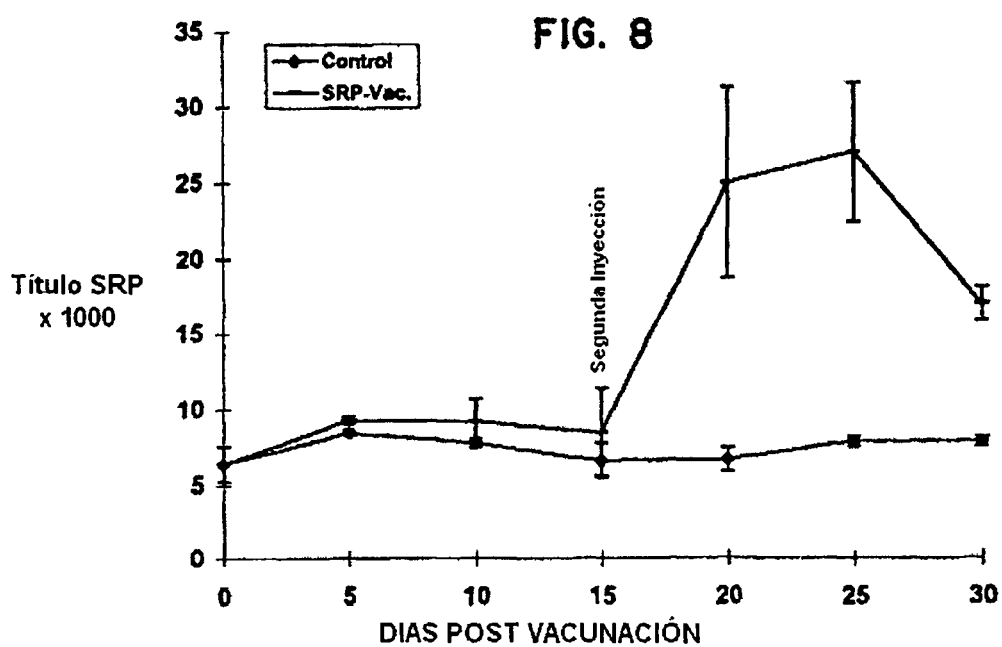
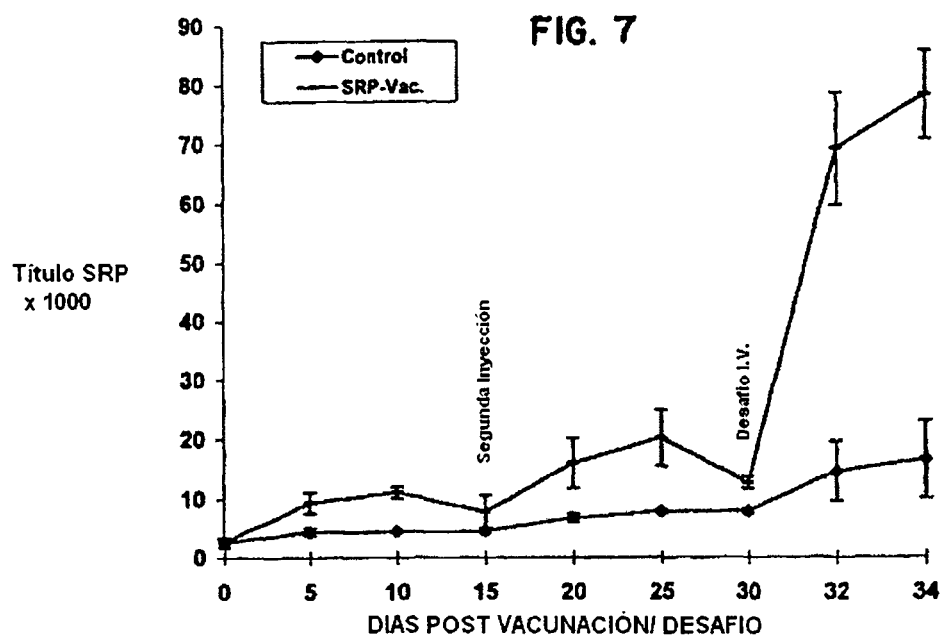


FIG. 9

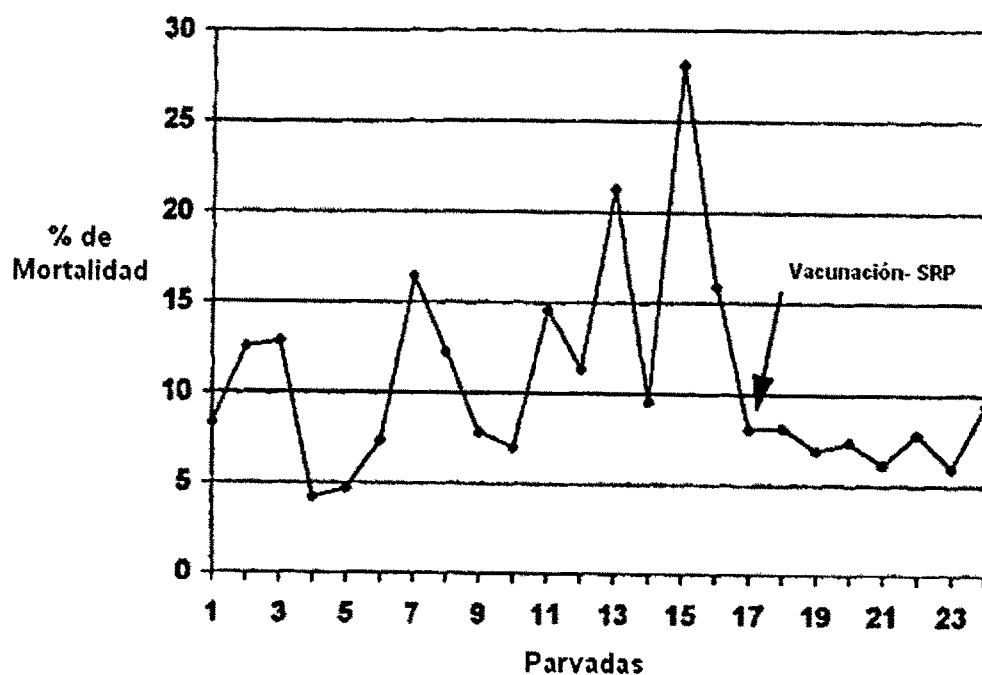


FIG. 10

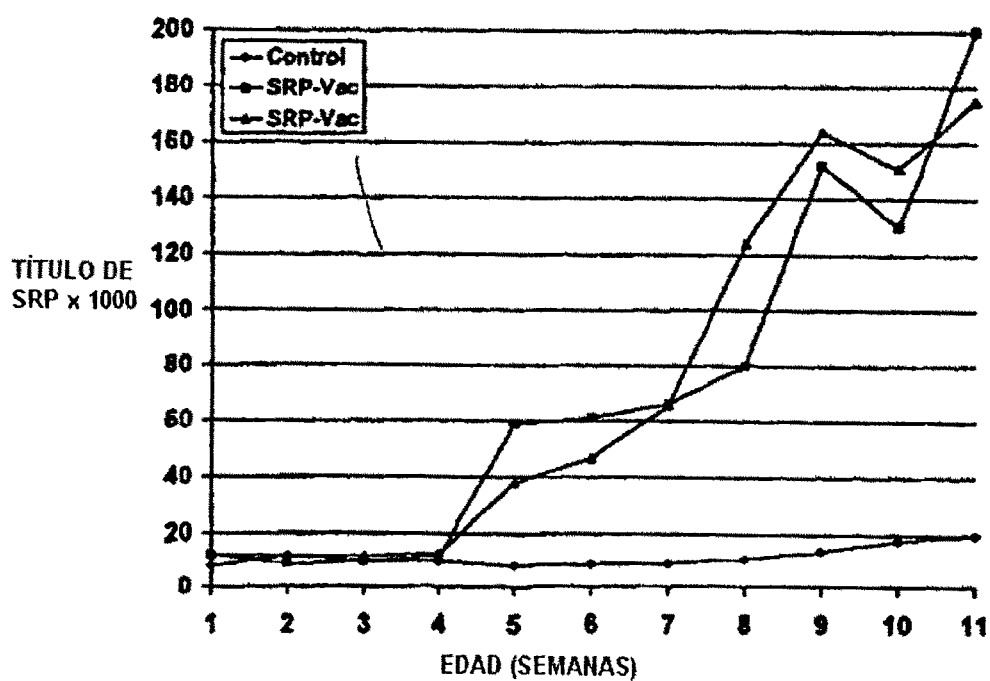


FIG. 11

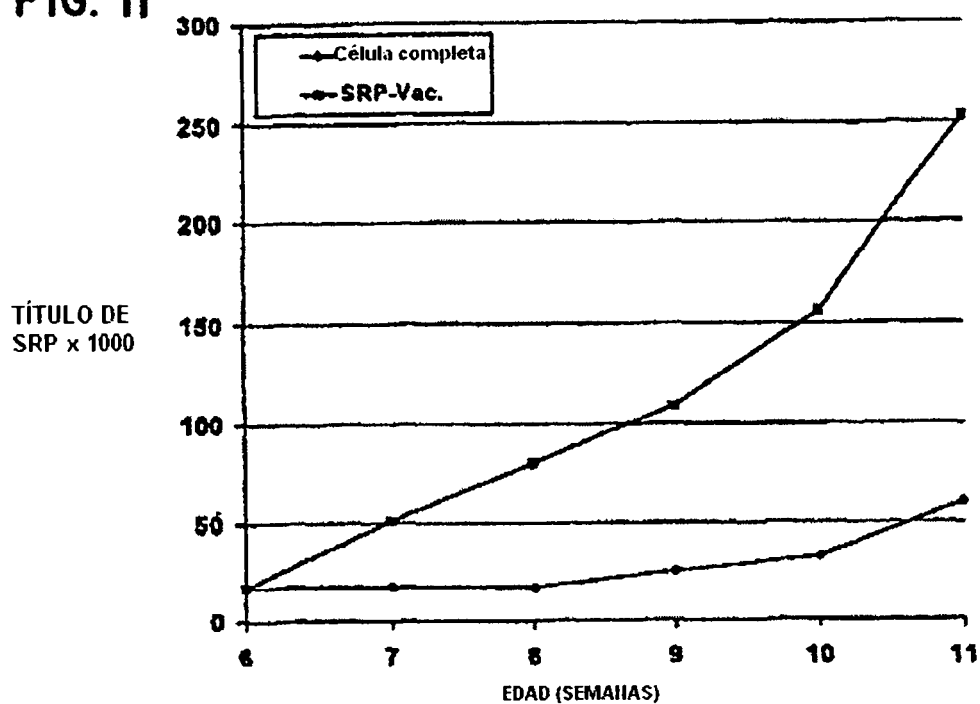


FIG. 12

