

VACUNA SUBUNITARIA, POLIVALENTE ALTAMENTE INMUNOGÉNICA CONTRA MASTITIS EN MAMÍFEROS.

CAMPO DEL INVENTO

La invención se refiere a una vacuna subunitaria, polivalente, altamente inmunogénica contra mastitis en mamíferos, que consiste en una formulación que comprende una mezcla de fragmentos de pared y membranas celular y pequeños liposomas originados desde la membrana celular de patógenos seleccionados de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*, donde dichos fragmentos de pared celular y membranas liberan al menos uno de proteínas de membrana, lipopolisacárido, peptidoglicano, exopolisacáridos, DNA, entre. La invención también enseña un procedimiento para preparar dicha vacuna y que permite obtener los elementos intracelulares inmunoestimulantes antes mencionados se obtienen sin desnaturar.

ARTE PREVIO

El consumo y la producción mundial de leche en los últimos 10 años han crecido sobre el 20% y se proyecta que la demanda crecerá por sobre la oferta a una tasa superior al 2% anual. Más de 6.000 millones de personas en el mundo consumen leche y productos lácteos, con tasas que van desde los 150 Kg per cápita anual, hasta 30 Kg en los países con menos desarrollo. Se espera que la producción del leche al 2014 alcance los 747 millones de toneladas.

La mastitis bovina es uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto económico para la industria lechera. Esta se ocasiona por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, principalmente de origen bacteriano. En general, las mastitis causan entre un 40 a 50% de disminución en los márgenes económicos netos por vaca.

Según estudios realizados en los Estados Unidos los costos

8
pierden anualmente entre 162 a 204 millones de litros de leche a nivel nacional por concepto de esta patología.

Se entiende por mastitis, la inflamación de la glándula mamaria caracterizada por alteraciones patológicas del epitelio glandular mamario, que generan cambios físicos y químicos de la leche. La magnitud de las lesiones y de la pérdida de productividad láctea, así como la claridad de los síntomas de inflamación, constituyen las bases para el diagnóstico clínico, permitiendo distinguir entre cuadros clínicos y subclínicos.

La mastitis puede ser causada por agentes físicos o infecciosos. Existen al menos 140 microorganismos que causan mastitis, la mayoría de los cuales son de difícil erradicación. Estos son: bacterias, micoplasmas, hongos, algas y virus, siendo las bacterias el grupo de mayor importancia, actuando como agente causal del 95% de los cuadros de mastitis clínica y subclínica, específicamente un pequeño grupo de bacterias, entre las que destacan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus coagulasa* negativos, *Streptococcus uberis* (*St. uberis*), *Streptococcus agalactiae* (*St. agalactiae*), *Mycoplasma* spp. y *Escherichia coli* (*E. coli*).

La mastitis subclínica, que pasa fácilmente desapercibida para el productor, es la causante de la mayor parte de las pérdidas. Según la mayoría de los autores, por lo menos un 70% de las pérdidas económicas relacionadas con la mastitis se expresan en mermas en la producción de leche y eliminación de la leche procedente de animales enfermos.

La severidad de la lesión glandular está directamente relacionada con la disminución productiva y con el recuento de células somáticas en la leche. Hoblet et al., en 1991, calcularon que las pérdidas por leche descartada y el gasto en medicamentos pueden variar entre US\$ 1 y 27 por episodio de mastitis, dependiendo de la severidad de los casos.

En particular, en el arte previo, el problema de tratar o prevenir la mastitis en animales o humanos, se ha resuelto de

la siguiente forma en base a las publicaciones indicadas a continuación, relacionadas con diferentes solicitudes de patentes:

5 EP0038265 describe específicamente una vacuna dirigida a infecciones de *Streptococcus* Grupo B, tanto en infantes como en animales lecheros. La vacuna se basa en polisacáridos específicos.

10 US4762712 describe la generación de una vacuna polivalente, donde se realiza un cultivo de la leche obtenida de un animal con mastitis clínica de manera de hacer proliferar los microorganismos presentes, inactivar dichos microorganismos y usarlos como vacuna.

15 US5198214 es muy similar a US4762712, pero incorpora la indicación de que son al menos 3 especies distintas de microorganismos, los que no son identificados.

20 WO9635793 describe un método de terapia génica, donde se implantan células que incorporan secuencias específicas de ADN/constructos a un animal. En la descripción, se indican distintas opciones de secuencias que podrían incluirse en los constructos, por ejemplo, ver reivindicaciones 10 y 11. Además, se indica que el método serviría para tratar una amplia variedad de infecciones, en particular mastitis, ver resumen.

25 EP0887410 describe secuencias particulares de proteínas activadoras de plasminógeno (PauA) de *St. uberis*, que finalmente pueden usarse como vacuna en la protección de mastitis.

30 WO9916892 describe terapia génica basada en un vector de herpesvirus bovino (bHV-2) para usarse en una o como una vacuna, específicamente contra mastitis en bovinos. El vector se complementa con otra secuencia como por ejemplo de citoquinas, por ejemplo, ver reivindicaciones 1, 2, 3.

35 WO9927109 describe proteínas de unión a matriz extracelular de *S. aureus* (ClfB, SdrC, SdrD, SdrE). Se realiza una mención específica para mastitis en la reivindicación 38. Se destaca

además la indicación de que existe un dominio conservado entre las proteínas de unión a matriz (TYTFTDYVD).

5 WO0012131 describe vacunas multicomponentes, donde se indica que incluye (similar a WO9927109) algunos fragmentos de *Clumping Factor A* o *B* (ClfA o ClfB). En las reivindicaciones se indica que el fin es combatir infecciones de origen *Staphylococcus* o *Streptococcus*, ver reivindicaciones 13 y 14.

10 WO0012689 describe polipéptidos y polinucleótidos de *Staphylococcus coagulasa negativos* (*Staphylococcus epidermidis*). Se menciona la misma secuencia consenso (TYTFTDYVD) que en el documento WO9927109. En la memoria descriptiva se indica una amplia variedad de condiciones infecciosas que podrían diagnosticarse usando anticuerpos contra las proteínas identificadas que mantienen la secuencia
15 consenso. Entre las muchas alternativas de condiciones infecciosas, se menciona mastitis.

20 WO02074324 describe proteínas de adhesión de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) que se unen a colágeno. En particular, dicha proteína es una lipasa, y se postula que puede usarse en la prevención o tratamiento de infecciones por *Staphylococcus*. En la memoria descriptiva se indica que esta proteína podría usarse en el diagnóstico de una gran variedad de infecciones, entre las cuales se menciona mastitis en bovinos, ver párrafo 35, y también se indica que
25 estas proteínas o fragmentos de ellas, o anticuerpos contra ellas, podrían usarse como vacunas.

US2005019345 de manera similar a WO02074324, este documento describe proteínas de adhesión a colágeno, pero provenientes de *Streptococcus pyogenes*. Así mismo, indica métodos de
30 diagnóstico de infecciones. También menciona, entre muchas otras, mastitis en bovinos como una de las enfermedades a diagnosticar o tratar, ver párrafo 47 y su uso como vacuna, ver párrafo 57.

35 WO2008019162 describe proteínas de *Staphylococcus* que se pueden usar para estimular la respuesta inmune. Menciona factores de virulencia: EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB

SdrC, Spa, IsdC, ClfA, ClfB, SasF. En la reivindicación 47, se menciona el uso de EsxA y EsxB como vacuna, y en la memoria descriptiva se menciona el uso contra mastitis y otras infecciones.

- 5 US2010113349 describe proteínas de unión a matriz extracelular, en particular SdrE, provenientes de *S. aureus*. Indica el uso de dichas proteínas o fragmentos en el tratamiento, prevención, inhibición o diagnóstico de infecciones por *S. aureus*. En el párrafo 106, se menciona que
10 puede usarse contra mastitis en rumiantes o humanos.

- US2010150956 describe específicamente vacunas multicomponentes. Se menciona particularmente infecciones de origen *S. aureus*, y los componentes corresponden al dominio A de una proteína (ClfA9), y un polisacárido capsular del tipo
15 5, tipo 8, y combinación de estos componentes. En el párrafo 21, se menciona un modelo de mastitis en ratón, y en el párrafo 237, se indica que las vacunas pueden usarse en infecciones en rumiantes o humanos, particularmente, mastitis causada por *S. aureus*.

- 20 WO2010079464 describe antígenos para usar como vacunas en contra de bacterias Gram positivas (*St. agalactiae*, *St. pyogenes*, *St. pneumoniae*, *S. aureus*, *St. suis* y *St. equi*). El antígeno corresponde a un dominio B de Cna. En el párrafo 209 y 210, se indica que una de las enfermedades que pueden
25 tratarse es mastitis en ganado, aunque aparece limitado a mastitis producida por *St. uberis* y *St. dysgalactiae*.

- WO2011138636 describe composiciones que comprenden polisacárido capsular tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus*, para usarlos como vacuna en contra de una variedad de enfermedades
30 causadas por *S. aureus*, dentro de las cuales se menciona mastitis.

- WO2012138570 describe composiciones para prevenir o inhibir infecciones bacterianas causadas por bacterias que expresan un polipéptido MAM. Se menciona dentro de las bacterias,
35 bacterias Gram negativas, donde las bacterias pueden ser *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia*

pseutotuberculosis, *E. coli* enteropatógena. En particular, se menciona mastitis entre varias otras infecciones causadas por *E. coli*. El método consiste en administrar un microorganismo no patológico que expresa un polipéptido MAM nativo o heterólogo, y donde el microorganismo se agrega a productos alimenticios (leche, yogurt, etc.)

WO2012140417 describe composiciones inmunogénicas con dos o más polipéptidos provenientes de una cepa de *Staphylococcus*. En la memoria descriptiva, se menciona una amplia variedad de *Staphylococcus*. Al menos, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. gallinarum*, *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, que podrían causar distintas infecciones, dentro de las cuales se menciona mastitis en bovinos. No hay una indicación clara sobre cuáles son los polipéptidos específicos que se usan en la composición de vacuna, pero si se entregan las secuencias asociadas. En la sección titulada "Materiales y Métodos", en el documento, se mencionan las siguientes proteínas que darían origen a los polipéptidos considerados en la vacuna: PheP, YdiE, DivlB, DivIC y FtsL.

WO2013066733 y WO2013066731 son similares en cuanto a que describen composiciones para inducir respuesta inmune frente a *S. aureus*. En particular, la diferencia se basa en que el primero utiliza una proteína de *S. aureus* sa2074, y el segundo, WO2013066731 una proteína *S. aureus* sa2451. En la memoria descriptiva, se señala que las proteínas indicadas pueden usarse como vacunas en varias enfermedades y, entre ellas, se menciona mastitis en bovinos.

Luego, los documentos antes mencionados aunque refieren vacunas contra mastitis, no enseñan o sugieren vacunas basadas en fragmentos de pared y membrana celular y liposomas originados desde la membrana celular bacteriana o vacunas polivalentes que presenten o describan específicamente los microorganismos de la presente invención. Esto aunque

US5198214 describe una vacuna que se produce con al menos 3 especies distintas, pero falla en indicar tales especies.

Por otra parte, la aplicación de vacunas ha emergido como una herramienta interesante para el control y la prevención de la mastitis. Sin embargo, las vacunas actuales de naturaleza inactivada o vacunas muertas, son poco efectivas y débiles inmunogénicamente, ya que en el proceso de inactivación por calor o un agente químico, se van desnaturalando los antígenos proteicos, lo que impacta negativamente en la correcta presentación antigénica y, por lo tanto, en una adecuada eficacia protectora. Por otro lado, el uso de únicamente algunos de los factores de virulencia de la bacteria como antígenos recombinantes en la formulación de una vacuna, limita la respuesta protectora únicamente a aquellos microorganismos patógenos que expresen el gen y deja abierta la posibilidad a infecciones por agentes oportunistas, por lo que la elección de cuales antígenos deben estar incorporados en la vacuna es sumamente crítico.

Este invención no altera los antígenos, ya que no son tratados con agentes desnaturalantes, mejorando la inmunogenicidad de la vacuna. Además, la presente invención permite la obtención de fragmentos de pared y membranas celular y liposomas originados desde la membrana celular, y así utiliza todos los antígenos de superficie del patógeno, y además utiliza proteínas de membrana, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, exopolisacáridos, ADN, entre otros elementos moleculares intracelulares inmunoestimulantes, que potencian la respuesta inmunológica y aumentan las posibilidades de protección que induce la vacunación.

30 **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una vacuna subunitaria polivalente altamente inmunogénica contra mastitis que consiste de una formulación que comprende una mezcla de fragmentos de pared y membranas bacterianas y pequeños liposomas originados desde la membrana celular del patógeno, fisicoquímicamente estables (mediante medición de tamaño promedio de vesícula y potencial Z, concentración de

proteínas, concentración de DNA, cuantificación de exopolisacárido capsular, cuantificación de LPS, cuantificación de exopolisacárido capsular y visualización de patrón proteico en SDS-PAGE), menores a 1 μ m de tamaño, que liberan gran cantidad de antígenos y moléculas inmunoestimulantes (tales como proteínas de membrana, lipopolisacárido, peptidoglicano, exopolisacáridos, DNA, entre otras) al sistema inmune del animal. Además, el proceso de formulación evita que los antígenos sean destruidos o desnaturalados, lo que es muy frecuente cuando se utilizan vacunas en base a microorganismos muertos, ya que el proceso de inactivación del patógeno mediante calor o agentes químicos altera las propiedades inmunogénicas de estos antígenos, con la consecuente disminución en la efectividad, la cual se observa en la mayoría de las vacunas inactivadas que se comercializan en la actualidad.

La presente invención se refiere a una vacuna subunitaria polivalente altamente inmunogénica contra mastitis que consiste de una formulación que comprende una mezcla de fragmentos de pared y membranas bacterianas y pequeños liposomas originados desde la membrana celular del patógeno, menores a 1 μ m de tamaño, que liberan gran cantidad de antígenos y moléculas inmunoestimulantes (tales como proteínas de membrana, lipopolisacárido, peptidoglicano, exopolisacáridos, DNA, entre otras) al sistema inmune del animal, y así, comprende antígenos contra 3 microorganismos patógenos seleccionados del grupo consistente de *S. aureus*, *E. coli* y *St. uberis*, mejorando la efectividad y duración de la respuesta inmune en el animal. La vacuna entrega, además, la capacidad de estimular la inmunidad local en mucosas, favoreciendo la protección del individuo vacunado frente a la ruta más común de ingreso de patógenos al organismo, y la principal en el caso de mastitis. La inmunidad es mediada por la secreción de inmunoglobulinas altamente específicas capaces de proteger, evitando la invasión y proliferación de microorganismos que producen la inflamación de la glándula mamaria.

La presente vacuna preferentemente, puede ser usada en mamíferos de crianza para la producción de carne o sus derivados, leche o productos utilizados en alimentación humana tales como bovinos, porcinos, ovejas, caprinos, 5 camélidos, equinos, entre otros.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1A-C Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de proteoliposomas y fragmentos de pared y membrana celular, formulados a partir de cepas de campo de *E. coli* (A), *S. aureus* (B) y *St. uberis* (C). 10 43.000X

Figura 2 Electroforesis en geles desnaturalantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Muestras corresponden a formulación de proteoliposomas y 15 fragmentos de pared y membrana celular de origen bacteriano, visualizándose el patrón proteico de cada una de ellas.

Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa-TAE 1,5%. Muestras corresponden a formulación de proteoliposomas y 20 fragmentos de pared y membrana celular de origen bacteriano, visualizándose la presencia de fragmentos de DNA genómico en cada una de ellas.

Figura 4 Recuento bacteriano promedio (Log_{10} UFC/mL) en glándulas mamarias de ratonas tratadas con vacuna v/s placebo y luego infectadas experimentalmente 25 por vía intramamaria, según microorganismo inoculado/glándula mamaria.

Figura 5 Recuento bacteriano total promedio (Log_{10} UFC/mL) en glándulas mamarias de ratonas tratadas con vacuna v/s placebo y luego infectadas experimentalmente 30 por vía intramamaria, según tratamiento.

Figura 6A-B Niveles (absorbancia a 450 nm) de inmunoglobulinas (IgG) específicas contra (A) *E. coli*, (B) *St. uberis* y (C) *S. aureus* en vacas

inmunizadas por vía subcutánea, según días post vacunación.

Figura 7A-B Porcentaje de vacas primíparas y multíparas, sanas y con infecciones intramamarias, 30 días post segunda inmunización, según estatus sanitario y tratamiento.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La Solicitante ha desarrollado un proceso que mejora la inmunogenicidad de diferentes vacunas, utilizando una formulación que comprende una mezcla de fragmentos de pared y membranas bacterianas y pequeños liposomas originados desde la membrana celular del patógeno, menores a 1 μ m de tamaño, de *S. aureus*, *E. coli* y *St. uberis* (ver Figura 1), los cuales son considerados los antígenos y patrones moleculares asociados a patógenos más importantes para la generación de inmunidad protectora contra un agente infeccioso. El producto son fragmentos de membrana y pared celular y pequeños liposomas, menores a 1 μ m de tamaño, que transportan los antígenos al sistema inmune del animal. La presente invención ha sido validada a nivel de ensayos preclínicos en animales de laboratorio (ver figuras 4 y 5), y en ensayos clínicos fase I y II en ganado lechero (ver figuras 6 y 7).

Así, la solución propuesta es una vacuna subunitaria, polivalente y altamente inmunogénica contra mastitis basada en los patógenos más frecuentemente involucrados en el desarrollo de la mastitis bovina en Chile y el mundo, como *S. aureus*, *E. coli* y *St. uberis*. La vacuna subunitaria desarrollada es de tipo polivalente, que a diferencia de lo que actualmente existe en el mercado, incluye los agentes causantes de mastitis tanto ambientales (*E. coli* y *St. uberis*) como infecciosos (*S. aureus*) responsables de la mayoría de las mastitis clínicas y subclínicas que afectan al ganado lechero.

La presente invención ha sido evaluada a nivel preclínico en ratones de laboratorio vacunados y luego desafiados por vía intramamaria con los diferentes patógenos en forma

individual, observándose reducciones en el recuento bacteriano a nivel glandular superiores a 2 unidades logarítmicas, respecto a animales inyectados con un placebo (ver figuras 4 y 5). A nivel clínico, se ha evaluado la seguridad de la formulación y la capacidad de elevar inmunidad específica contra los 3 patógenos incluidos en la formulación, tras su administración por vía subcutánea en hembras bovinas primíparas y multíparas (ver figuras 6 y 7), observándose un aumento del doble en el título de anticuerpos específicos (IgG) contra los patógenos de interés 30 días post inmunización, y una reducción en el porcentaje de hembras con infecciones intramamarias del 40% (primíparas) y 14% (multíparas), respecto a hembras no vacunadas.

Así, la presente invención se refiere a una vacuna subunitaria polivalente que consiste de una formulación que comprende una mezcla de fragmentos de pared y membranas bacterianas y pequeños liposomas originados desde la membrana celular del patógeno, fisicoquímicamente estables (mediante medición de tamaño promedio de vesícula y potencial Z, concentración de proteínas, concentración de DNA, cuantificación de LPS, cuantificación de exopolisacárido capsular y visualización de patrón proteico en SDS-PAGE), menores a 1 μ m de tamaño, que liberan gran cantidad de antígenos y moléculas inmunoestimulantes (tales como proteínas de membrana, lipopolisacárido, peptidoglicano, exopolisacáridos, DNA, entre otras) al sistema inmune del animal. Además, el proceso de formulación evita que los antígenos sean destruidos o desnaturalados, lo que es muy frecuente cuando se utilizan vacunas en base a microorganismos muertos, ya que el proceso de inactivación del patógeno mediante calor o agentes químicos altera las propiedades inmunogénicas de estos antígenos, con la consecuente disminución en la efectividad, la cual se observa en la mayoría de las vacunas inactivadas que se comercializan en la actualidad.

A continuación, se proporciona a modo de ejemplo, una descripción de desarrollo experimental realizado conforme a

la invención aplicada en ganado bovino, particularmente, vacas.

Los liposomas de membranas bacterianas, se formularon de la siguiente manera:

5 Crecimiento de patógenos de interés:

Las cepas de *E. coli* seleccionadas para la vacuna, se hicieron crecer en un Biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 415 Fermentor en un medio químicamente definido compuesto por:

- 10 - Triptona 1,2% (p/v)
- Extracto de Levadura 2,4% (p/v)
- Fosfato de Magnesio 0,12% (p/v)
- Cloruro de Sodio 0,12% (p/v)
- Cloruro de Potasio 0,02% (p/v)
- 15 - Sulfato de Amonio 0,7% (p/v)
- Glucosa 1,5% (p/v)
- Fosfato de Potasio Monobásico 0,4% (p/v)
- Fosfato de Potasio Bibásico 1,2% (p/v)
- Micronutrientes 0,1% (v/v)
- 20 - Sulfato de Nickel 0,1% (p/v)
- Cloruro de Manganeso 1,5% (p/v)
- Cloruro de Cobre 0,2% (p/v)
- Ácido Bórico 0,3% (p/v)
- Molibdato de Sodio 0,1% (p/v)
- 25 - Cloruro de Zinc 0,8% (p/v)
- Cloruro de Hierro 1,4% (p/v)
- Sulfato de Aluminio 0,1% (p/v)
- Cloruro de Calcio 0,1% (p/v)

- El crecimiento se realizó a pH 7,0 por 20 horas, con una
- 30 temperatura de 37°C, oxígeno disuelto $\geq 45\%$ y agitación variable entre 200 y 500 rpm para mantener el valor del oxígeno. Pasado el tiempo de crecimiento se cosecharon las bacterias al centrifugar a 4.000 rpm (2.811 g) por 20 minutos a 4°C, almacenando el sedimento a -80°C

Las cepas de *S. aureus* seleccionadas para la vacuna, se hicieron crecer en un Biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 415 Fermentor en medio Todd-Hewitt comercial (Bacto, N° catalogo 249240) compuesto por:

- 5 - Triptona 2% (p/v)
- Infusión de corazón 0,31% (p/v)
- Glucosa 0,2% (p/v)
- Cloruro de Sodio 0,2% (p/v)
- Fosfato Di Sódico 0,045% (p/v)
- 10 - Carbonato de Sodio 0,25% (p/v)

El crecimiento se realizó a pH 7,8 por 24 horas con una temperatura de 37°C, oxígeno disuelto $\geq 30\%$ y agitación variable entre 200 y 500 rpm para mantener el valor del oxígeno. Pasado el tiempo de crecimiento se cosecharon las

- 15 bacterias al centrifugar a 4.000 rpm (2.811 g) por 20 minutos a 4°C, almacenando el sedimento a -80°C.

Las cepas de *St. uberis* seleccionadas para la vacuna, se hicieron crecer en un Biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 415 Fermentor en medio M17 comercial (Bacto, N° catalogo 218561) compuesto por:

- 20 - Triptona 0,5% (p/v)
- Peptona de Soya 0,5% (p/v)
- Extracto de carne 0,5% (p/v)
- Extracto de levadura 0,25% (p/v)
- 25 - Ácido ascórbico 0,05% (p/v)
- Sulfato de Magnesio 0,025% (p/v)
- Glicerolfosfato de Sodio 1,9% (p/v)
- Lactosa 0,5% (p/v)

- 30 El crecimiento se realizó a pH 6,9 por 24 horas con una temperatura de 37°C, oxígeno disuelto $\geq 30\%$ y agitación variable entre 200 y 500 rpm para mantener el valor del oxígeno. Pasado el tiempo de crecimiento se cosecharon las bacterias al centrifugar a 4.000 rpm (2.811 g) por 20 minutos a 4°C, almacenando el sedimento a -80°C.

- 35 Purificación de Membranas y fragmentos de pared celular:

Para la purificación de las membranas, se aplicó el siguiente protocolo:

1. El sedimento congelado de cada microorganismo se descongeló a 40-50°C.
- 5 2. Se resuspendió en solución tampón de lisis estéril (Imidazol 20 mM; Fosfato Disódico 20 mM; Cloruro de Sodio 500 mM; pH 7,4; esterilizado mediante filtración), a razón de 1 g de sedimento en 10 mL de tampón de lisis. Además, se agregaron perlas de Zirconia/Silica 0,1 mm (BioSpec
10 Products, N° catálogo 11079101Z), a razón de 1 g de perlas en 10 mL de tampón de lisis.
3. Luego se congeló a -80°C por 2 horas.
4. Se descongeló con sonicación al 100% de capacidad del
15 sonicador Hielscher Ultrasonic Processor UP400S (250 V) por 6 minutos continuos.
5. Luego se congeló a -80°C por 2 horas.
6. Se repitieron los pasos del 4 al 5, hasta completar 6 pasos de sonicación. Tras la 6° sonicación, se sembraron en duplicado 100 µL del sonificado en Agar Plate Count.
- 20 7. Una vez verificada la ausencia de microorganismos viables conforme a lo expuesto en el punto inmediatamente anterior se centrifugó a 2.811g por 20 minutos a 4 °C, reservando el sobrenadante y descartando el sedimento.
8. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 17.319g por 30
25 minutos a 4 °C, reservando el sedimento (*pellet* de membranas) y descartando el sobrenadante

Preparación de los liposomas de membranas y fragmentos de pared y membrana celular:

Para la preparación, se siguió el protocolo a continuación:

- 30 1. El sedimento se resuspendió en solución tampón para solubilización de membrana (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 25 mM; Deoxicolato de Sodio 15 mM; esterilizado mediante filtración), a razón de 1 g de sedimento en 20 mL de tampón de solubilización de membranas.
- 35 2. Se incubó a 17°C con agitación de 270 rpm por 18 horas.
3. Se centrifugó a 15°C por 30 minutos a 4.500 rpm.

4. Se agregaron Bio-Beads® (BioRad, número catalogo 152-3920), previamente resuspendidos en un volumen mínimo de solución Tris-HCl 20 mM + KCl 25 mM, pH 7,5; y esterilizados mediante autoclavado, a razón de 50 mg de Bio-Beads en 1 mL de solución.
5. Se incubó a 20 °C por 90 minutos con agitación de 50 rpm.
6. Se agregaron Bio-Beads® estériles, a razón de 450 mg de Bio-Beads® en 1 mL de solución.
7. Se incubó a 20°C por 90 minutos con agitación de 50 rpm.
- 10 8. Se dejaron decantar los Bio-Beads® y el sobrenadante se traspasó a un tubo estéril.
9. Se agregaron 9 µL/mL de Alcohol Bencílico, esterilizado mediante filtración, y 100 µL/mL de EDTA 100 mM esterilizado mediante filtración.

15 Caracterización de formulación vacunal:

La formulación de liposomas y fragmentos de pared y membrana celular fueron caracterizados a través de las siguientes técnicas:

- Visualización de liposomas y fragmentos de pared y membrana celular a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).
- Medición de tamaño promedio de vesículas y fragmentos mediante NanoBrook ZetaPlus Zeta Potential Analyzer, Broohaven Instruments Corp.
- 25 - Medición de potencial Z de vesículas y fragmentos mediante NanoBrook ZetaPlus Zeta Potential Analyzer, Broohaven Instruments Corp.
- Medición de concentración total de proteínas, mediante BCA Protein Assay Kit, Novagen.
- 30 - Extracción y cuantificación de exopolisacárido capsular, según método descrito por Haskell y Hanessian (1964) y Elson y Morgan (1933), modificado por Rondle y Morgan (1955).
- Medición de lipopolisacárido (LPS), mediante Purpald Assay.
- 35 - Extracción y cuantificación de DNA, mediante AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit, AXYGEN y espectrofotometría a 260-280 nm.

- Visualización de perfil proteico mediante Electroforesis en Geles Desnaturantes de Poliacrilamida (*SDS-PAGE*).
- Visualización de fragmentos de DNA mediante Electroforesis en Geles de Agarosa-TAE.

5 Ensayo pre clínico:

- 12 hembras y 4 machos de la cepa *BALB/c*, de 12 semanas de edad, fueron incluidos en el ensayo. Se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos, de 2-4 hembras y 1 macho por jaula.
- 10 - 48 horas post inicio de reproducción, 6 hembras seleccionadas aleatoriamente fueron vacunadas subcutáneamente en la zona de la nuca con 1 dosis de la vacuna, conteniendo 15 µg de proteoliposomas, medido como proteína total mediante *BCA Protein Assay*, Novagen, de
- 15 *St. uberis*, *S. aureus* y *E. coli* (45 µg totales) más 0,55 mg de hidróxido de aluminio, contenidos en un volumen total de 110 µL. Las 6 hembras restantes sirvieron como grupo placebo, siendo inyectadas con 0,55 mg de hidróxido de aluminio más NaCl 0,9% en un volumen total de 110 µL.
- 20 - Luego de 14 días, las hembras fueron revacunadas utilizando la misma formulación y bajo el mismo protocolo aplicado en la primera inmunización.
- 21 días posteriores a la segunda inmunización, las ratonas paridas (2 vacunadas y 2 placebos) fueron desafiadas por
- 25 vía intramamaria con 50 µL/glándula de una suspensión bacteriana de *E. coli* (2° par de glándulas), *St. uberis* (4° par de glándulas) y *S. aureus* (5° par de glándulas), a una concentración en el rango de 10⁵ UFC/mL. El 1° par de glándulas mamarias sirvió como control negativo de
- 30 infección intramamaria).
- Para ello, las ratonas fueron separadas de sus crías 2 horas previas al procedimiento y luego anestesiadas ligeramente con isoflurano. Cada pezón y la zona circundante fue desinfectado con una tórula embebida en
- 35 etanol 70%. Cada pezón fue tomado y extendido suavemente con una pinza anatómica, inyectándose a través de su centro con una aguja de 30G ingresada hasta 2/3 de la longitud del pezón extendido y depositando suavemente los

50 µL del inóculo. A las 24 horas post desafío bacteriano, las ratonas fueron sacrificadas

- Bajo condiciones asépticas (bajo campana de flujo laminar y previa desinfección de la línea media ventral con etanol 70%) se extrajo individualmente cada glándula mamaria en estudio; se depositaron individualmente en placas de Petri estériles y fueron disgregadas y suspendidas en agua peptonada fosfatada (APF) a razón de 10 mL/g de tejido mamario.
- A partir de esta suspensión se realizaron diluciones al décimo en APF y fueron sembradas en placas de agar tripticasa soya (*St. uberis*), agar manitol salado (*S. aureus*) y agar McConkey (*E. coli*). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24-72 hrs, tras las cuales se realizó el recuento bacteriano y su expresión en UFC/mL.

Tabla 1:

Aislamiento y recuento (Log10 UFC/mL) de *E. coli*, *St. uberis* y *S. aureus* desde glándulas mamarias de ratonas vacunadas y luego infectadas experimentalmente por vía intramamaria, según microorganismo inoculado/glándula mamaria.

Glándula mamaria		Tratamiento		Ratonas				Promedio vacunadas	Promedio placebo
				Vacunadas		Placebo			
				A	B	C	D		
1 Derecha	Sin tratamiento	3,301	1,477	5,623	1,699	2,389	3,661		
2 Derecha	<i>E. coli</i>	0	4,738	7,006	4,743	2,369	5,874		
4 Derecha	<i>St. uberis</i>	0	4,905	6,324	0	2,452	3,162		
5 Derecha	<i>S. aureus</i>	4,785	2,301	7,000	5,640	3,543	6,320		
1 Izquierd	Sin tratamiento	3,47	0	5,43	1,47	1,739	3,454		

a	o	7		1	7		
2 Izquierd a	<i>E. coli</i>	0	2,17 6	6,62 9	3,72 9	1,088	5,179
4 Izquierd a	<i>St. uberis</i>	0	2,41 5	5,53 1	0	1,207	2,766
5 Izquierd a	<i>S. aureus</i>	3,77 8	3,49 0	6,43 9	6,16 7	3,634	6,303
Promedio ratonas		1,91 8	2,68 8	6,24 8	2,93 2		
		2,303		4,590			

donde A, B, C y D se refiere al grupo de animal estudiado.

Se observa en la Tabla 1 y Figuras 4 y 5, que en todos los casos y para todos los patógenos inoculados, en las hembras que fueron vacunadas con la vacuna experimental polivalente el recuento bacteriano disminuyó en aproximadamente 2,5 unidades logarítmicas (2,5 log₁₀) UFC en comparación con el grupo control inyectado con placebo. Esta disminución en el recuento bacteriano, significa inhibición de la proliferación de bacterias inoculadas directamente en la glándula mamaria, producto de la respuesta inmune que estimula a vacunación.

Estudio de eficacia en terreno de vacas inmunizadas versus placebo:

Treinta hembras bovinas (10 primíparas y 20 multíparas) fueron mantenidas bajo condiciones productivas e inmunizadas tres veces (45 días preparto, 15 días preparto y 45 días postparto) con una formulación vacunal conteniendo 500 µg de proteoliposomas (medido como proteína total mediante *BCA Protein Assay*, Novagen) de *St. uberis*, *S. aureus* y *E. coli* (1.500 µg totales) más 8 mg de hidróxido de aluminio, contenidos en un volumen total de 2 mL. Un grupo control de 30 animales (10 primíparas y 20 multíparas) fue mantenido bajo las mismas condiciones productivas e inyectadas solamente con placebo (8 mg de hidróxido de aluminio,

contenidos en un volumen total de 2 mL). Posterior al parto, se extrajeron periódicamente muestras de leche, las cuales fueron sometidas a recuento de células somáticas y recuento microbiológico total, para determinar la presencia de mastitis clínicas y subclínicas en ambos grupos experimentales.

En la figuras 6 y 7 se observa una marcada alza en los niveles de inmunoglobulinas (IgG) específicas contra los patógenos *E. coli*, *St. uberis* y *S. aureus*, a partir de los 15-30 días post inmunización. Además, se observa una marcada disminución (40% primíparas y 14% multíparas) en el porcentaje de hembras que presentaron infecciones intramamarias dentro de los 30 días post parto en las hembras vacunadas, respecto al grupo placebo.