

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 675**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/05** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2010 E 10739632 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2461823**

54 Título: **Una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina y un método para obtener dicha vacuna**

30 Prioridad:

**06.08.2009 EP 09167342**

**06.08.2009 US 231820 P**

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

**10.09.2014**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)**

**Wim de Körverstraat 35**

**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**KLAASEN, HENRICUS LEO BERNARDUS MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 492 675 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina y un método para obtener dicha vacuna

## 5 Descripción

La presente invención se refiere a una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina, una enfermedad de distribución mundial que causa unas pérdidas económicas sustanciales a la industria porcina. El agente etiológico de la pleuroneumonía porcina es *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), una bacteria gramnegativa que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*. La enfermedad se transmite por la vía del aerosol o por contacto directo con un cerdo infectado, y se caracteriza por lesiones pulmonares hemorrágicas, fibrinosas y necróticas. El cuadro clínico puede variar desde hiperagudo hasta crónico y los cerdos portadores asintomáticos pueden transmitir la enfermedad cuando son introducidos en piaras no infectadas. Se han descrito 15 serovares según los componentes polisacáridos y los lipopolisacáridos (LPS) de cadena-O capsulares. El serotipado y otros métodos de tipado genético para *Actinobacillus pleuropneumoniae* han contribuido grandemente a la vigilancia y a los estudios epidemiológicos. Estas herramientas proporcionan información importante para la toma de decisiones en programas de control destinados a la erradicación de los tipos virulentos de la bacteria. En Norteamérica, se describen los serovares 1, 5 y 7 como los más prevalentes, mientras que los serovares 2 y 9 son más aislados más comúnmente en Europa, y el serovar 15 es la cepa predominante de los cerdos australianos.

Los factores de virulencia descritos para *A. pleuropneumoniae* incluyen los LPS, los polisacáridos capsulares, las toxinas Apx I-IV (las denominadas repeticiones en las toxinas o toxinas RTX), las proteínas de membrana externa (PMEs) y varios sistemas de adquisición de hierro. Sin embargo, la contribución global de cada componente al proceso de la infección permanece dudosa, al igual que los mecanismos de patogenia de esta bacteria. Casi todas las vacunas disponibles actualmente contra *A. pleuropneumoniae* son bien de bacterinas de células completas inactivadas o bien de combinaciones de subunidades de toxinas y proteínas Apx, opcionalmente combinadas con fracciones de la membrana externa. En cualquier caso, se ha convertido en comúnmente entendido que para obtener una protección adecuada, preferiblemente entre diferentes serovares, el lipopolisacárido (LPS) tiene que estar presente en una vacuna (Julien Gouré y col. en: BMC Genomics 2009, 10: 88, publicado el 24 de febrero de 2009; Dubreuil y col. en: Animal Health Research Reviews 1 (2): 73 - 93, diciembre de 2000). Aún más, desde la década de los 80 se sabe que una vacuna basada en lipopolisacárido solo ya tiene un efecto positivo en la reducción del nivel de infección o de los signos clínicos de la enfermedad e induce una protección cruzada (Fenwick y col. en: the American Journal of Veterinary Research, volumen 47, número 9, septiembre de 1986; Rapp y col. en: Canadian Veterinary Journal, 1988, volumen 29, número 7, págs.. 585 - 587; Rioux y col. en: Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 20 (1):63 - 74, enero de 1997).

Una desventaja importante del lipopolisacárido es su naturaleza endotóxica, estando por tanto asociado con múltiples efectos secundarios no deseados tales como letargia, diarrea, vómitos, pérdida de apetito e incluso la muerte. A primera vista es por lo tanto tentador disminuir la cantidad de LPS en una vacuna o destoxificar el LPS. Sin embargo, una vacuna contra la APP adecuada depende de la presencia del LPS y por lo tanto, como se sabe comúnmente, una disminución en la cantidad de LPS disminuye inherentemente la eficacia de la vacuna. Además, se han hecho varios intentos de reducir la naturaleza endotóxica del LPS y aun así llegar a una vacuna efectiva. Rioux y col. (mencionado en el presente documento anteriormente) investigaron el efecto de la destoxicación del LPS sobre la eficacia de una vacuna contra la APP y concluyeron que los ratones inmunizados con LPS (no destoxicado) estaban protegidos, mientras que una vacuna basada en el LPS destoxicado no consiguió proteger a los ratones (véase la página 71 de la publicación de Rioux, tercer párrafo). Este estudio se repitió en cerdos (Research in Veterinary Science 1998, 65, 165 - 167). Se demostró que una vacuna bacterina comercial (que contiene el LPS no destoxicado) proporcionó buena protección frente a una prueba con la APP natural. Una vacuna basada en el LPS destoxicado pareció ser mucho menos efectiva (el 60 % de los cerdos aún presentaba lesiones pulmonares). De hecho, esto está en línea con el entendimiento común que cuando el LPS está destoxicado es mucho menos inmunogénico.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina, que tiene una eficacia comparable a la de las vacunas obtenibles comercialmente, pero que tiene unos síntomas de choque endotóxico significativamente reducidos, en particular que no muestra ningún o casi ningún signo de diarrea, vómitos y respiración incrementada en cerdos después de la administración de una dosis eficaz de la vacuna.

Para este fin, se ha ideado una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina, que comprende por ml 25 unidades de las repeticiones en toxinas ApxI, ApxII, ApxIII y una proteína de membrana externa de 42 kD, y el LPS en una cantidad de  $5 - 6 \times 10^5$  UI/ml, caracterizada porque la vacuna además comprende 30 pg/ml de polimixina B o 30 µg/ml de polimixina E. Sorprendentemente se ha encontrado que la destoxicación del LPS mediante una polimixina no tiene un efecto negativo significativo en la inmunogenicidad del LPS, y por lo tanto en la eficacia de la vacuna. Parece que mediante el uso de una polimixina los síntomas del choque endotóxico, tales como diarrea, vómitos y respiración incrementada, se pueden reducir significativamente mientras que se mantiene la eficacia de la vacuna en un nivel adecuado. En particular, parece que la vacuna puede tener incluso la misma eficacia que una vacuna sin polimixina añadida.

Una vacuna en el sentido de la presente invención es una constitución que tiene por objeto prevenir o reducir una infección por un microorganismo o los síntomas clínicos de la enfermedad o el trastorno causado por esa infección a través de la inducción de anticuerpos que interfieren con el microorganismo o con sus procesos metabólicos (ya sea dentro del microorganismo, o inducida por él) en el hospedador. Una vacuna puede contener una subunidad del microorganismo (tal como, por ejemplo, un LPS) como antígeno básico, pero puede comprender también microorganismos completos atenuados o muertos, o por ejemplo, un metabolito del organismo (tal como una toxina excretada). La vacuna contiene una cantidad inmunológicamente eficaz del antígeno (es decir, una cantidad capaz de estimular el sistema inmunitario del animal objetivo lo suficiente como para al menos reducir los efectos negativos de una prueba con microorganismos natural, normalmente combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un líquido que contiene agua (a menudo suero salino tamponado con fosfato), que comprende opcionalmente agentes inmunoestimulantes (adyuvantes), estabilizantes, modificadores de la viscosidad u otros componentes dependiendo del uso previsto o de las propiedades requeridas de la vacuna. Además, los antígenos adicionales de otros microorganismos pueden estar presentes de tal forma que la vacuna proteja contra múltiples organismos naturales.

Las polimixinas son compuestos con propiedades antibacterianas que se pueden aislar a partir de *Bacillus polymyxa* (*B. aerospora*), o producirse artificialmente, y los compuestos con propiedades antibacterianas derivables directamente de las mismas. Las polimixinas producidas por *B. polymyxa* tienen una estructura general que consiste en un péptido cíclico con una cola hidrófoba larga. Las polimixinas típicas son: polimixina A (también llamada aerosporina), polimixina B (a menudo también denominada polimixina), polimixina E (también llamada colistina), polimixina M (también conocida como maticina) y el nonapéptido de polimixina.

Se observa que se ha descrito antes que las polimixinas se pueden utilizar para destoxificar lipopolisacáridos con éxito en composiciones inmunogénicas que contienen bacterias gramnegativas. Por ejemplo, Cooperstock y col. desvelan en la revista "Infection and Immunity", de julio de 1981, págs. 315 - 318 que mediante el uso de la polimixina B, disminuía marcadamente la actividad endotóxica de suspensiones de varias bacterias gramnegativas (a saber *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*). Sin embargo, Cooperstock también observa claramente que "sigue siendo incierto si las propiedades inmunogénicas de las bacterias tratadas con polimixina permanecen intactas" y también s "la capacidad de varios... componentes de la membrana externa para unir el anticuerpo preformado en un sistema de inmunoelectroforesis se perdió parcialmente después del tratamiento, ya sea de bacterias completas o de membranas aisladas con una alta concentración de polimixina B". En otras palabras: las propiedades inmunogénicas de los LPS destoxificados se cuestionaron seriamente, y se previó la pérdida de al menos una parte de estas propiedades. De hecho, también Bannatyne y col. desvelan en el Journal of Hygiene (Cambridge), 1981, 87, págs. 377 - 381, que la polimixina, a una concentración de 5.000 µg (sulfato de polimixina B) por ml (que equivale a alrededor de 42.000 unidades internacionales por dosis de la vacuna) tuvieron éxito en la supresión del efecto tóxico del LPS. Sin embargo, también afirma que "Siguen existiendo, sin embargo, reservas sobre dicha vacuna que contiene polimixina-. Más importante es si la reducción en el contenido de endotoxina se acompaña de una reducción en la cantidad de antígeno protector y se asocia con un descenso en la eficacia protectora." Pocos años más tarde Larter y col. (en el American Journal of Diseases of Children, Vol. 138, marzo de 1984) encontraron que de hecho en una vacuna contra la tosferina, los títulos de anticuerpos en los animales que recibieron la vacuna contra la tosferina y la polimixina concomitantemente (más de 150.000 UI por dosis) eran menores y subieron más despacio, o no estaban presentes en absoluto.

Estos hallazgos en la década de los 80 podrían explicar por qué para una vacuna contra APP eficaz, en la que la vacuna del LPS desempeña un papel dominante, nunca se creyó que la destoxificación con polimixina tenga una probabilidad razonable de éxito para obtener una vacuna segura pero eficaz. Esto está fuertemente apoyado por el hecho de que han transcurrido más de 25 años desde las observaciones mencionadas anteriormente en el presente documento, hasta la presente solicitud de una polimixina en una vacuna contra la APP que comprende el LPS como componente esencial.

La vacuna comprende el lipopolisacárido purificado a partir de un cultivo bacteriano (es decir, que se concentra con respecto a los demás componentes celulares tales como los orgánulos celulares, el núcleo, los componentes de la pared celular, etc.) complejo con una o más repeticiones en toxinas. Se sabe que una vacuna contra la APP basada en bacterinas ofrece menos protección que una vacuna basada en una combinación de subunidades del LPS y de Apx en forma de un complejo. Por lo tanto, se prefiere una vacuna con dicha combinación de subunidades, que comprende el LPS purificado a partir de un cultivo bacteriano complejo con una o más toxinas Apx. Se sabe que la unión específica entre el LPS y estas toxinas desempeña un papel importante en la inmunogenicidad mejorada de las toxinas (véase, entre otros, Ramjeet y col. en Molecular Biology, 2008, 70 (1), págs. 221 - 235) que puede explicar la protección mejorada de una vacuna con dicha combinación de subunidades. Sorprendentemente, ahora se ha averiguado que la polimixina, a pesar de sus fuertes propiedades de unión al LPS, no parece interferir negativamente con este complejo de LPS-toxina, ya que una vacuna combinada de subunidades que comprende la polimixina ofrece una protección equivalente a la misma vacuna combinada de subunidades que no comprende una polimixina. Las repeticiones en toxinas pueden ser, por ejemplo, las conocidos por el documento EP 453 024. Además, puede estar presente cualquiera de las otras repeticiones en toxinas ApxII o ApxIV. Esto puede depender, entre otros, del serovar o serovares, de la APP contra los que se quiere proteger. Se sabe que junto con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, las toxinas Apx (I y II) también son producidas por *Actinobacillus suis*. Las últimas

toxinas también se pueden usar en la vacuna de acuerdo con esta realización. Preferiblemente una o más de las toxinas Apx I, Apx II y Apx III están comprendidos en la vacuna, más preferiblemente cada una de éstas.

La vacuna comprende menos de 2.000 UI de la polimixina por dosis. Sorprendentemente, se ha encontrado que se puede llegar a una reducción eficaz de los síntomas endotóxicos mediante el uso de tan pocas como 2.000 UI/dosis (a la que se puede llegar, por ejemplo, añadiendo aproximadamente 60 µg de sulfato de polimixina B por ml de vacuna para una dosis de 4 ml). En las referencias citadas anteriormente en el presente documento, las cantidades eficaces al vacunar se encuentran en el intervalo de 42.000 a 160.000 UI de polimixina por dosis, que es aproximadamente el intervalo para el uso de la polimixina como un conservante (véase también la novena edición del Merck Veterinary Manual, ed. 2005, que recomienda una dosis de al menos 50.000 UI por dosis para un animal de 10 kg). El solicitante encontró, sorprendentemente, que sólo una fracción (menos del 5 %) parece ser suficiente para reducir los síntomas de un choque endotóxico. Dado que generalmente las polimixinas no son estables indefinidamente, la cantidad presente en la vacuna será menor que la cantidad añadida, normalmente de entre el 50 y el 80 % cuando se mide hasta un año después de la formulación. Se observa que se puede utilizar tan poca polimixina como sea necesaria para reducir los síntomas clínicos. Por ejemplo, puede ser que en una raza de cerdo que sufre menos por el LPS en una vacuna, una cantidad de aproximadamente 15 - 30 UI por dosis sea eficaz para reducir adecuadamente los síntomas de un choque endotóxico. El efecto positivo de una cantidad tan baja se ha confirmado experimentalmente. Se observa que la cantidad mínima eficaz no sólo puede depender de la raza de los cerdos, pero también en la reducción de los síntomas clínicos requerida, la cantidad de LPS en la vacuna, el tipo de polimixina, etc. La vacuna comprende menos de 1.000, o incluso menos de 500 UI por dosis.

En una realización, el lipopolisacárido procede de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. De hecho, como se sabe comúnmente, el LPS de la vacuna no tiene que ser extraído necesariamente de bacterias de la APP para que sea eficaz en una vacuna contra la pleuroneumonía porcina. puede proceder, por ejemplo, de *Escherichia coli*, ser expresado de forma recombinante en una bacteria huésped, una célula animal u otro tipo de huésped. Sin embargo, encontramos que el LPS que procede de la APP da muy buenos resultados de vacunación. Dicho LPS puede ser extraído directamente de bacterias de la APP pero también puede ser expresado por un hospedador adecuado.

La vacuna comprende una proteína de membrana externa de 42 kD de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tal como se sabe a partir del documento EP 453 024.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

### Diseño experimental

En un primer estudio se utilizaron 150 cerdos libres de patógenos específicos (SPF) de 6 semanas de edad, y se formaron tres grupos de 50 animales cada uno. Se vacunó cada grupo por vía intramuscular una vez con una dosis de 4 ml a la edad de 6 semanas. El Grupo 1 recibió una vacuna contra la APP estándar (Porcilis APP, disponible en Intervet International BV, Boxmeer, Países Bajos), sin polimixina. Esta vacuna contiene (por ml) 25 unidades de las repeticiones en toxinas Apx I, II y III, así como una proteína de membrana externa de 42 kD. El LPS está presente en una cantidad de aproximadamente  $5 - 6 \times 10^5$  UI/ml. El grupo 2 recibió la misma vacuna pero con polimixina B añadida (en forma de sal de sulfato), en la cantidad de 30 µg/ml (aproximadamente 250 UI por ml). El grupo 3 recibió la misma vacuna estándar, pero con polimixina E añadida (en forma de sal de sulfato), también en la cantidad de 30 µg/ml (aproximadamente 250 UI por ml). Las polimixinas se añadieron en la etapa final de la formulación de la vacuna, es decir, cuando todos los otros antígenos estaban siendo mezclados con el vehículo Diluvac Forte (disponible de Intervet International BV, Boxmeer, Países Bajos). Las temperaturas rectales se midieron 20 horas antes de la vacunación, justo antes de la vacunación, y 2, 4, 7 y 24 horas después de la vacunación. Todos los animales por grupo se monitorizaron para controlar los síntomas clínicos específicos (indicativos de un choque endotóxico) a los 30 min y a las 1, 2, 4, 7 y 24 horas después de la vacunación. En particular, se revisaron los siguientes síntomas de los animales de: menos activo, escalofríos, tos, diarrea, vómitos, aumento de la frecuencia respiratoria, respiración abdominal, disnea y muerte. En los días 2 a 6 después de la vacunación se realizó solo un chequeo al día. Los valores de la temperatura y síntomas clínicos de los grupos 2 y 3 se compararon con los del grupo 1.

En un segundo estudio, se probaron dos concentraciones diferentes de polimixina. Este estudio se realizó con 42 cerdos, que se asignaron aleatoriamente a 3 grupos de tratamiento de 14 cerdos cada uno. El grupo 1 recibió Porcilis APP (sin polimixina), el grupo 2 la misma vacuna con 30 µg de polimixina B por ml de vacuna y el grupo 3 la misma vacuna con 60 µg de polimixina B por ml de vacuna. El montaje experimental adicional era el mismo que en el primer estudio.

En un tercer estudio se probó la eficacia de una vacuna contra la APP basada en el LPS y que contiene polimixina B. La polimixina B se conoce comúnmente como la polimixina con las mejores propiedades de unión al LPS, y por lo tanto, teóricamente, la polimixina B tiene el impacto negativo más fuerte sobre la eficacia de la vacuna. Así, si una vacuna formulada con esta polimixina es eficaz, esta es la prueba de que con otra polimixina se puede obtener al menos una vacuna igualmente eficaz. La vacuna para este estudio se formuló mediante la adición de 30 µg de polimixina B por ml de vacuna a la vacuna estándar Porcilis APP. Se vacunaron catorce cerdos por vía intramuscular

a la edad de 6 y 10 semanas con 2 ml de la vacuna, recibiendo, por lo tanto, una dosis de aproximadamente 500 UI de polimixina. Siete cerdos recibieron una vacuna de placebo (tampón de Tris-HCl 40 mM). Se determinaron los títulos de anticuerpos contra las toxinas RTX Apxl, ApxlII y Apx III, así como de PME a las 13 semanas. Tres semanas después de la segunda vacunación, los cerdos se expusieron con *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 2.

En un cuarto estudio probamos la seguridad de una vacuna a la que se añade la polimixina durante la parte final del procesamiento de un lote de fermentación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, llegando finalmente a un contenido mucho menor de polimixina en la vacuna (de aproximadamente 2 - 4 µg / ml). En este estudio, la vacuna se preparó mediante la adición de 30 µg de polimixina B o sulfato de polimixina E por ml de sobrenadante del caldo de fermentación de los respectivos cultivos, después de lo cual las toxinas Apxl, II, III complejadas con LPS, y la PME de 42 kD fueron aisladas de estos sobrenadantes. Estas subunidades aisladas se formularon en Diluvac forte para llegar, por ml de vacuna, a aproximadamente 25 unidades para las toxinas y las PME y aproximadamente  $1 \times 10^6$  UI de LPS. En estas vacunas se encontró una concentración de polimixina de aproximadamente 22 UI (2,6 µg / ml) para la polimixina E y de aproximadamente 35 UI (4,2 µg / ml) para la polimixina B por ml. Para probar la seguridad, dos grupos de diez cerdos LPE de 6 semanas de edad recibieron cada uno 4 ml de la respectiva vacuna. Los síntomas clínicos se evaluaron como en el primer estudio.

## Resultados

No hubo ningún efecto significativo de ninguna de las polimixinas sobre las temperaturas rectales. Sin embargo, hubo efectos significativos con respecto a los síntomas de choque endotóxico. En la Tabla 1 del presente documento, a continuación, se ofrece un resumen de los síntomas por grupo. En el grupo 1 se observaron unos síntomas clínicos típicos en más de la mitad de los animales, como los vómitos (60 %) y el aumento de la frecuencia respiratoria (66 %). En este grupo, dos cerdos (4 %) fallecieron como consecuencia del choque endotóxico. Por el contrario, sólo se observaron síntomas muy leves en los grupos 2 y 3. En ambos grupos, el 2 % de los cerdos (uno de cada 50 animales) tuvo vómitos. Además, el 2 % de los cerdos del grupo 3 tuvo un aumento en la frecuencia respiratoria. Por lo tanto, se concluyó que las polimixinas son adecuadas para reducir los síntomas del choque endotóxico graves causadas por el LPS de la vacuna contra la APP.

**Tabla 1.** Síntomas de choque endotóxico después de la vacunación con varias vacunas contra la APP

Vacuna	diarrea	vómitos	aumento de la frecuencia respiratoria	muerte
Porcilis APP	10 %	60 %	66 %	4 %
Porcilis APP + 30 µg/ml de polimixina B	0 %	2 %	0 %	0 %
Porcilis APP + 30 µg/ml de polimixina E	0 %	2 %	2 %	0 %

La Tabla 2 muestra los resultados del segundo estudio. En el grupo 1 (vacuna estándar) se observaron síntomas clínicos típicos como vómitos (54 %) y un aumento de la frecuencia respiratoria (15 %). En los grupos 2 y 3 se observaron desde síntomas leves a casi ningún síntoma. Basándose en estos resultados, se concluye que la adición de tan poco como 60µg de un polimixina por ml de vacuna, o incluso tan poco como 30µg/ml es eficaz para casi bloquear completamente el LPS en la inducción de síntomas graves de choque endotóxico.

**Tabla 2.** Síntomas de choque endotóxico después de la vacunación con varias vacunas APP

Vacuna	diarrea	vómitos	aumento de la frecuencia respiratoria	muerte
Porcilis APP	15 %	54 %	15 %	0 %
Porcilis APP + 30 µg/ml de polimixina B	0 %	0 %	8 %	0 %
Porcilis APP + 60 µg/ml de polimixina B	0 %	0 %	0 %	0 %

En el tercer estudio, los buenos resultados de eficacia (equivalentes a los resultados obtenibles con la vacuna Porcilis estándar contra la APP que tiene la misma formulación excepto por la polimixina) se obtuvieron con la vacuna que contenía polimixina B. Los resultados se resumen en la tabla 3. En el grupo de control, casi el 60 % de los animales murió, mientras que los animales del grupo vacunado estuvieron todos protegidos frente a la exposición. Los títulos de este último grupo fueron comparables con los que se pueden obtener con la vacuna estándar Porcilis APP que no contenga una polimixina ("n. d." significa no detectable en la prueba utilizada). Dados los resultados extremadamente buenos con una vacuna contra la APP que contiene la polimixina B, y el hecho de que esta polimixina tiene las propiedades de unión más fuertes al LPS, se entiende que con otras polimixinas se puede conseguir una vacuna que es al menos igual de eficaz.

**Tabla 3.** Resultados promedio de eficacia de una vacuna que contiene la polimixina B

Vacuna	Título Apx I	Título Apx II	Título Apx III	Título PME	muerte
Porcilis APP + 30 µg/ml de polimixina B	9,3	10,1	8,5	9,1	0 / 14
control	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	4 / 7

5 En el cuarto estudio se demostró que, incluso con una vacuna que comprende tan poco como aproximadamente 20 UI de polimixina por ml, se pueden obtener unos buenos resultados de seguridad. Los datos medios se muestran en la Tabla 4. Dado que incluso con un contenido en polimixina significativamente mayor (véase el estudio 3) aún se pueden obtener unos buenos resultados de eficacia, es evidente que con las vacunas del cuarto estudio se pueden obtener también unos buenos resultados de eficacia.

**Tabla 4.** Síntomas de choque endotóxico después de la vacunación con varias vacunas contra la APP

Vacuna	diarrea	vómitos	aumento de la frecuencia respiratoria	muerte
Porcilis APP	50 %	90 %	70 %	0 %
Porcilis APP ctg 4.2 µg/ml de polimixina B	0 %	10 %	10 %	0 %
Porcilis APP ctg 2.6 µg/ml de polimixina E	0 %	20 %	30 %	0 %

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna dirigida contra la pleuroneumonía porcina, que comprende por ml 25 unidades de las repeticiones en toxinas ApxI, ApxII, ApxIII y una proteína de membrana externa de 42 kD, y el LPS en una cantidad de aproximadamente  $5 - 6 \times 10^5$  UI/ml, caracterizada por que la vacuna comprende además 30 µg/ml de polimixina B o 30 µg/ml de polimixina E.