

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 699**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 09725988 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2262828**

54 Título: **Composiciones, procedimientos y kits**

30 Prioridad:

28.03.2008 US 40260

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

23.11.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS TIERGESUNDHEIT AG (100.0%)
Werk Rosental, Schwarzwaldallee 215
WRO-1032, 4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**PLOCHER, THOMAS;
CAMPOS, MANUEL;
HARLAND, RICHARD;
JOHNSON, TODD;
HARBISON, TRENT y
KEIL, DAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 551 699 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

Composiciones, procedimientos y kits

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para determinar moléculas de reacción inmunológica cruzada que comprenden un determinante antigénico de reacción cruzada, en particular para determinar proteínas que comprenden determinantes antigénicos de reacción cruzada, en particular para determinar proteínas que tienen reacción cruzada que se basa en las exploraciones serológicas que utilizan desafíos inmunológicos secuenciales a un animal, que incluyen las proteínas de *H. parasuis* de reacción cruzada. También se proporcionan composiciones, vacunas, y kits que utilizan las moléculas para diagnósticos y procedimientos para 10 prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntomas de los mismos asociados con agentes infecciosos, en particular microorganismos infecciosos, en particular para prevenir y tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de los mismos asociados con la infección por *H. parasuis*.

Antecedentes de la invención

15 El principio de la vacunación se basa esencialmente en dos elementos clave de la inmunidad, a saber la especificidad y la memoria. La activación y diferenciación de los linfocitos B en respuesta a la mayoría de los antígenos requieren varias señales que dirigen los linfocitos B para formar o células plasmáticas que segregan anticuerpos o linfocitos B de memoria que están preparados para mediar una respuesta más rápida en la exposición secundaria al antígeno. Las células de memoria permiten que el sistema inmunitario produzca una respuesta mucho más fuerte en el segundo encuentro con los antígenos. Esta respuesta secundaria es tanto más rápida en aparecer 20 como más eficaz que la respuesta primaria. Sin embargo, debido a que los anticuerpos son muy específicos por naturaleza, y en vista de la diversidad de agentes infecciosos, el desarrollo de anticuerpos que presenten reactividad cruzada a lo largo, o con los numerosos tipos diferentes de agentes patógenos sigue siendo un problema significativo.

25 Un ejemplo de un agente infeccioso para el que sigue existiendo un desafío significativo en el desarrollo de anticuerpos que presenten reactividad cruzada es el *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), el agente etiológico de la poliserositis y artritis porcina (enfermedad de Glässer). El *H. parasuis* es una bacteria Gram-negativa, encapsulada ocasionalmente, no mótil, pleomórfica que se aísla de los exudados serosos de cerdos afectados por pleuritis serofibrinosa, pericarditis, peritonitis, artritis, y meningitis. Este organismo que describió inicialmente Glässer en 1919, fue aislado probablemente por primera vez por Schermer y Ehrlich en 1922, aunque el organismo sospechoso se denominó originalmente *Haemophilus suis*. En 1969, sin embargo, Biberstein y White demostraron que el agente causal de la enfermedad de Glässer solo necesitaba el dinucleótido nicotinamida adenina (NAD). Por lo tanto el 30 *Haemophilus suis*, un organismo que necesita tanto la porfirina de hierro como dinucleótidos nicotinamida adenina (NAD) no era el carácter insidioso de esta enfermedad y el nuevo organismo se renombró, añadiendo el prefijo "para", al *H. parasuis*.

35 La caracterización de *H. parasuis* ha evolucionado significativamente durante las pasadas cinco décadas. Bakos y col. utilizaron un ensayo de precipitación para identificar cuatro serovares, que se designaron A-D (Nordic Veterinary Medicine, 4:241-255 (1952)). Estos cuatro, crecieron a siete en 1986 (J Clin Microbiol, 23:1022-1025 (1986)). Kielstein y col., Zentralbl Veterinarmed B, 38:315-320 (1991) añadieron seis más y, trabajando con Rapp-Gabrielson, Am J Vet Res, 53:659-664 (1992), incluso otros cinco. Eventualmente, esta clasificación se refinó. Todos los 40 serovares, incluyendo algunos con múltiples designaciones, se caracterizaron en base a un ensayo de inmunodifusión que se llevó a cabo con sueros específicos de conejo. El resultado fue una lista de al menos quince serovares que se han llegado a aceptar globalmente. Desafortunadamente, también existe un número significativo de aislados no tipificables. Además, varias publicaciones han descrito los perfiles de serotipos de *H. parasuis* en países específicos. Se ha propuesto que en los EE. UU., Alemania, Japón, España, Canadá y China, los serotipos 4 y 5 son bastante comunes. Se ha expuesto que los serotipos 5 y 13 son prevalentes en Australia y Dinamarca.

Los factores de virulencia de *H. parasuis* no se han definido. La mayoría de las asociaciones a la virulencia se hacen de acuerdo con el serotipo, como los que corresponden a las tasas de alta morbilidad y mortalidad. Se ha expuesto que tras la infección intraperitoneal, los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14 producen altas tasas de morbilidad y mortalidad en 4 días. Como tales, estas cepas se consideran altamente virulentas. Tres serotipos (es decir, 2, 4, y 50 15) presentaban niveles de virulencia intermedios produciendo poliserositis sin mortalidad. Los serotipos restantes se consideran avirulentos ya que los cerdos afectados no manifestaban enfermedad clínica.

Se han hecho intentos para determinar los factores de virulencia específicos de *H. parasuis*. Siendo un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, se cree que algunos candidatos incluirían cápsulas, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), y proteínas de la membrana externa (OMP). Hasta ahora, sin embargo, se han perfilado pocas correlaciones entre 55 estos rasgos de *H. parasuis* y la virulencia. Las cepas encapsuladas son comunes tanto en cavidades nasales de cerdos sanos como en los animales en que se manifiestan clínicamente. La importancia de los LPS fue de alguna manera desbancada por los informes que sugerían que no había diferencia significativa en la producción de LPS entre serotipos virulentos y avirulentos y demostraron que las presentaciones que contenían tanto LPS como OMP

daban lugar a una respuesta exclusivamente a OMP. Sun y col. (Infection and Immunity, 2001, 69(1):336-344) desvelaron un procedimiento de identificación de un anticuerpo de reacción cruzada y un grupo de determinantes de reacción cruzada implicados en la producción de una respuesta inmunitaria en ratones BALB/c utilizando el polisacárido pneumocócico 6B. Beal y col. (Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 114:84-93) desvelaron un procedimiento para analizar la reactividad cruzada de una respuesta inmunitaria que comprende la administración de presentaciones antigénicas de Salmonella.

Las OMP han demostrado que generan una fuerte respuesta humoral y se han propuesto como candidatas a inmunógenos protectores de esta categoría. Hay dos perfiles generales de OMP presentes y se pueden asociar con la virulencia. La mayoría de los serotipos virulentos se caracterizan por el segundo perfil, que es dominado por una proteína de 37 kDa. Los serotipos avirulentos muestran múltiples bandas, con una banda fuerte entre los 23-40 kDa, así como una proteína de aproximadamente 68 kDa.

Se han sugerido otras varias proteínas en las infecciones por *H. parasuis*. Se ha informado de dos proteínas de colonización, designadas P2 y P5, que son ambas inmunógenas. La P2, sorprendentemente, parece que se diferencia dependiendo de la virulencia del serotipo. Está presente predominantemente como una proteína de 55 kDa en serotipos avirulentos y 49 kDa en serotipos virulentos. Esta proteína muestra una homología con la proteína P2 de *Haemophilus influenzae*. Otros han identificado y descrito la regulación positiva de la región TonB del genoma de *H. parasuis*. Esta región contiene varios genes que responden a ambientes agotados de hierro. Como el hierro se secuestra en el huésped, se ha propuesto que tales genes pueden ser importantes para la supervivencia del agente patógeno en el huésped.

Adicionalmente, se detectó una proteína mayor de membrana externa (MOMP) de 42 kDa utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la MOMP de *Pasteurella multocida* de 35 kDa. El análisis de una proteína de 42 kDa potencialmente similar de *Haemophilus dicreya*, una especie estrechamente relacionada, caracterizaba la proteína como similar antigénicamente a OmpA. Esta clase de proteína de membrana modificable por calor se investigó en profundidad por medio del desarrollo de anticuerpos monoclonales contra preparaciones de membrana de *H. parasuis*. Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales en este experimento, uno contra una OMP de 35 kDa y un segundo contra LPS. Se informó que estos anticuerpos monoclonales reaccionaban específicamente con los serotipos comunes y se ha sugerido su valor potencial como herramientas diagnósticas o dianas para potenciales vacunas.

La neuraminidasa es otro factor potencial de virulencia. Más del 90% de los aislados de campo parecen producir neuraminidasa. Esta enzima se expresa tardíamente en la fase de crecimiento de *H. parasuis* y se correlaciona tanto con la exposición de los receptores necesarios para la colonización como con la ruptura de la mucina del huésped.

El *H. parasuis* puede infectar múltiples sitios del huésped. Como resultado, los síntomas se manifiestan de manera diferente en base al sitio de infección. Las cuatro formas primarias de infección son la enfermedad de Glässer (poliserositis fibrinosa), septicemia (sin poliserositis), miositis aguda (músculo masetero), y enfermedad respiratoria. Independientemente del sitio de infección o tipo de infección, se ha informado de síntomas de la infección por *H. parasuis* que son de alguna manera generales. Aumento de temperatura, apatía, y pérdida de peso se informan comúnmente. Otros síntomas clínicos comunes que se han informado son tos, disnea (acortamiento de la respiración), pérdida de peso, cojera, falta de coordinación, cianosis y ahogo.

El *H. parasuis* se ha convertido en un problema principal después de que se volvieran prevalentes las piaras libres de patógenos específicos (SPF). En parte debido a la evolución de la industria porcina, que incluye el establecimiento de piaras libres de patógenos específicos, el *H. parasuis* ha aparecido como un agente patógeno económicamente significativo. Típicamente, la infección se dirige a animales intactos, que están albergados con una higiene adecuada, o los que se alimentan escasamente. Además, el transporte insalubre y la combinación de cerdos de diferentes edades han contribuido significativamente a los brotes. La combinación de grandes concentraciones de animales y la virginidad relativa de la población porcina en estas piaras protegidas se ha informado que da lugar a un aumento en la incidencia de la enfermedad inducida por *H. parasuis*. Lo que complica más el asunto es el hecho de que el *H. parasuis* existe en varios serotipos regionalmente específicos diferentes. Se informó de que la exposición o vacunación a un serotipo no necesariamente protegía contra la infección por otros. Por lo tanto, se propuso el desarrollo de una vacuna autógena como control contra la diseminación de un serotipo desconocido. Debido en parte a tales problemas y al retraso entre la generación de bacterinas autógenas y la exposición a los cerdos, surgió la necesidad de una vacuna de protección cruzada que se pudiera administrar con confianza con respecto a la prevalencia de un serotipo regional.

Se ha propuesto el tratamiento de la infección por *H. parasuis* con antibióticos con aplicación inmediata tras el desarrollo de síntomas clínicos. Desafortunadamente, la naturaleza penetrante del agente patógeno requiere altas dosis de antibióticos para que sean eficaces y a menudo el coste es prohibitivo.

Se ha intentado el control por medio de vacunación tanto con vacunas comerciales como autógenas. La diversidad de serotipos de *H. parasuis* ha complicado los regímenes de vacunación, y es rara la protección cruzada. En combinación con las cepas no tipificables, esta plétora de perfiles antigénicos hacen que el desarrollo de vacunas sea difícil.

También se ha propuesto la protección por vacunación contra desafío homólogo. Un trío de estudios sugerían que un producto de bacterina muerta podría proteger contra el desafío homólogo cuando se creaba con serotipos conocidos y asilados de campo sin tipificar. Los estudios arrojan luz sobre el uso de vacunas autógenas para controlar los brotes para reducir las tasas de mortalidad.

- 5 Algunos han propuesto el uso de cepas virulentas para proteger contra el desafío heterólogo de otras cepas virulentas. Un estudio informaba que una vacuna bivalente que contenía los serotipos 4 y 5 protegía contra los serotipos 13 y 14. Otros, sin embargo, no mostraban una reacción cruzada entre los serotipos 2 y 5.

10 Otros más han propuesto la exposición controlada de los lechones a bajas dosis de *H. parasuis* virulento, vivo. Sin embargo, debido en parte a las co-infecciones dañinas con otros agentes patógenos, tales como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo (PRRSV), esta estrategia no se ha recomendado como un procedimiento de control funcional.

15 Como procedimientos actualmente disponibles de control de varias infecciones causantes de enfermedad tienen una eficacia limitada, en parte debido a la diversidad de agentes causales de enfermedad tales como *H. parasuis*, se necesitan procedimientos y composiciones eficaces para el tratamiento y la prevención, particularmente se necesitan identificar proteínas que tengan reacción cruzada que permitan el desarrollo de vacunas eficaces, en particular para el tratamiento y prevención de la infección por *H. parasuis*.

Sumario de la invención

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar polipéptidos que comprenden una determinante antigénico de reacción cruzada, comprendiendo el procedimiento la obtención de al menos un anticuerpo de un animal expuesto secuencialmente a un primer desafío inmunológico producido por una primera composición inmunogénica que comprende un primer determinante antigénico de un primer polipéptido, seguido por un segundo desafío inmunológico producido por una segunda composición inmunogénica que comprende un segundo determinante antigénico de un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, y donde el primer y segundo microorganismo se caracterizan o que son diferentes serotipos de la misma especie, y entonces se ponen en contacto el al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico, en el que la unión del al menos un anticuerpo al primer y segundo determinantes antigénicos es indicativo de reacción cruzada, identificando de esta manera los polipéptidos que tienen un determinante antigénico de reacción cruzada.

30 También se desvela un procedimiento para determinar una molécula que comprende un determinante antigénico de reacción cruzada, comprendiendo el procedimiento:

- 35 a) activar un linfocito B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en el que la activación comprende el desafío inmunológico del animal con una molécula para producir una respuesta inmunológica que activa el linfocito B de memoria; y
 b) poner en contacto el al menos un anticuerpo con una segunda molécula, en el que la unión del al menos un anticuerpo con la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

También se desvela un polipéptido aislado. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

40 El péptido aislado comprende además un determinante antigénico de reacción cruzada presente en una proteína que se expresa por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

También se desvela un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

En que el polipéptido aislado comprende además un determinante antigénico de reactividad cruzada y se expresa por el serotipo 5 de *H. parasuis*.

- 5 También se desvela una vacuna que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un péptido aislado, y un vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

El polipéptido aislado comprende además un determinante antigénico presente en una proteína que se expresa por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

- 10 En otro aspecto, también se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad, afección, o síntoma de las mismas asociado con la infección por *H. parasuis* en un animal. El procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de una vacuna que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un polipéptido aislado, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

- 15 El polipéptido aislado comprende además un determinante antigénico de reacción cruzada presente en una proteína que se expresa por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otros aspectos, se desvelan las composiciones, procedimientos, y kits para el diagnóstico.

Las ventajas y beneficios de la presente invención serán aparentes para el experto en la técnica a partir de la lectura de esta especificación.

20 **Descripción detallada**

- Se proporcionan los distintos aspectos y realizaciones de la presente invención que comprende procedimientos para la identificación de moléculas que pueden proporcionar anticuerpos de reacción cruzada que reconocen moléculas relacionadas antigénicamente, y que pueden por tanto emplearse en vacunas, aplicaciones diagnósticas, y procedimientos de tratamiento o prevención de un amplio intervalo de afecciones o enfermedades que incluyen las asociadas con agentes infecciosos tales como, pero sin limitarse a bacterias, virus, etc. La nueva estrategia que se describe en el presente documento utiliza el huésped para identificar moléculas de reacción cruzada utilizando un modelo de desafío inmunológico escalonado en el que se desafía un huésped secuencialmente, por ejemplo con un serotipo de *H. parasuis*, se permite que se recupere, y luego se le desafía con un serotipo diferente.

I. Definiciones

- 30 El término “molécula”, a menos de que se establezca específicamente otra cosa, incluye polipéptidos y proteínas que incluyen, por ejemplo, glucoproteínas y lipoproteínas, polisacáridos que incluyen por ejemplo, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, y fragmentos de los mismos.

El término “inmunógeno” o “inmunogénico” se refiere a una molécula que induce una respuesta inmunitaria específica.

- 35 La expresión “determinante antigénico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la estructura primaria, secundaria, terciaria, o cuaternaria de una molécula (por ejemplo, un polipéptido) que es reconocido por células B (es decir, linfocitos B) y los anticuerpos segregados por los linfocitos B.

- 40 La expresión “determinante antigénico de reacción cruzada”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un determinante antigénico presente en dos o más moléculas (por ejemplo, variantes proteicas bacterianas) para unirse al mismo anticuerpo. Además, se tiene que entender que las dos o más moléculas que comprenden el determinante antigénico capaz de unirse por el mismo anticuerpo pueden ser: la misma molécula o

partes de la misma, variantes de cada una, o moléculas diferentes. A modo de ejemplo, en referencia a las proteínas (por ejemplo, variantes proteicas bacterianas) que comprenden un determinante antigénico capaz de unirse al mismo anticuerpo, las proteínas pueden tener la misma secuencia de aminoácidos primaria o una diferente, sin embargo, cada proteína comprende un determinante antigénico (es decir, "reactividad cruzada") que pueden unirse al mismo anticuerpo.

La expresión "anticuerpo de reacción cruzada", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo capaz de unirse a un determinante antigénico de reactividad cruzada.

El término "tratamiento", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la mejoría, mejora o remedio de una enfermedad, trastorno, afección o síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección.

El término "prevención" significa parar o dificultar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección.

II. Determinación de la reactividad cruzada

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar polipéptidos que comprenden un determinante antigénico de reactividad cruzada, comprendiendo el procedimiento la obtención de al menos un anticuerpo de un animal expuesto secuencialmente a un primer desafío inmunológico producido por una primera composición inmunogénica que comprende un primer determinante antigénico de un primer polipéptido, seguido por un segundo desafío inmunológico producido por una segunda composición inmunogénica que comprende un segundo determinante antigénico de un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, y en el que el primer y segundo microorganismos se caracterizan por que son diferentes serotipos de la misma especie, y luego poniendo en contacto el al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico, en el que la unión del al menos un anticuerpo al primer y el segundo determinantes antigénicos es indicativa de reactividad cruzada, identificando de esta manera los polipéptidos que tienen un determinante antigénico de reactividad cruzada.

En una realización, el primer y segundo microorganismo es una bacteria. En algunas realizaciones, la bacteria es *H. parasuis*.

En general, el procedimiento implica dos o más desafíos inmunológicos secuenciales al animal que incluyen un tiempo de recuperación entre los desafíos. Después, en un momento posterior al último desafío, se obtiene el al menos un anticuerpo a partir del animal, por ejemplo, por recolección de los ganglios linfáticos del animal y/u otro tejido rico en células de memoria, que comprende el al menos un anticuerpo. Si estar ligados por ninguna teoría en particular, se cree que recolectando ganglios linfáticos y/u otro tejido rico en células de memoria, los linfocitos B de memoria generados por el primer desafío se pueden recolectar después de su activación en respuesta a un desafío posterior. Los linfocitos B de memoria activados son responsables del aclaramiento del primer determinante antigénico que produce el primer desafío, y los anticuerpos que producen en respuesta a un segundo desafío producido por el segundo determinante antigénico se puede ensayar para determinar su reactividad cruzada con el primer y segundo determinante antigénico determinando de esta manera sus respectivas moléculas de reactividad cruzada.

Los animales adecuados para su uso en el procedimiento incluyen, pero no se limitan a, suidos (por ejemplo, cerdos), bovinos, ovinos, cobayas, conejos, ratones, ratas, cabras y caballos. En una realización, el animal es un animal privado de calostros derivado de cesárea. En otra realización, el animal es un cerdo. En algunas realizaciones, el animal privado de calostros derivado de cesárea es un cerdo privado de calostro derivado de cesárea. En otras realizaciones, el animal tiene al menos una semana de edad, de manera ilustrativa, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 semanas de edad.

El animal puede exponerse al primer y segundo desafío inmunológico por cualquier número de maneras siempre que se generen linfocitos B de memoria contra el primer desafío y se activen con un desafío posterior del animal con el segundo determinante antigénico. Preferentemente, el antígeno está contenido en la composición de desafío. Por ejemplo, una composición de primer desafío comprenden el primer determinante antigénico y una segunda composición de desafío comprenden el segundo determinante antigénico se puede administrar al animal por cualquier vía de administración conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral e intranasal.

Otras formas de exposición a un desafío también que están dentro del alcance de la invención incluyen las vacunaciones y la exposición natural a un inmunógeno (por ejemplo, un agente infeccioso). Por lo tanto, un desafío inmunológico puede incluir un desafío producido por una exposición natural del animal a un determinante antigénico, tal como or medio de la exposición del animal a un agente infeccioso (por ejemplo, bacterias, virus, parásitos). Por lo tanto, por ejemplo, un primer desafío inmunológico puede ser un desafío producido por una infección natural del animal por una cepa de bacterias que pertenecen a un primer serotipo, que continúa entonces con un segundo desafío que comprende la administración intranasal de una segunda composición de desafío que tiene un segundo

serotipo (es decir, el segundo determinante antigénico) de la cepa.

Una composición de desafío que comprende un antígeno, opcionalmente, puede comprender también un tampón y/o además comprende otros componentes que ayudan a conseguir la potencia de desafío deseada y/o minimizar los efectos adversos en el animal que recibe el desafío.

- 5 En una realización, la primera y segunda composición de desafío comprende un tampón peptona o una solución salina normal. En otra realización, la primera y segunda composición de desafío comprende un tampón peptona, en el que la primera composición de desafío comprende además una primera bacteria, en el que la segunda composición de desafío comprende una segunda bacteria, en el que la primera y segunda bacteria pertenece a diferentes serotipos de la misma especie.
- 10 En una realización, el segundo desafío se administra al animal al menos aproximadamente 1 semana después del primer desafío, ilustrativamente, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 10 meses, aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses, y aproximadamente 2 meses a aproximadamente 4 meses después del primer desafío.
- 15 Por lo tanto, la memoria inmunológica proporciona la base de la presente invención. En consecuencia, el procedimiento comprende además proporcionar una muestra biológica del animal después del segundo desafío inmunológico, en el que la muestra biológica comprende células de memoria que producen anticuerpos. La muestra biológica puede ser de cualquier tipo. La muestra biológica puede ser de tejidos, órganos, sangre, linfa o ganglios linfáticos del animal. La muestra biológica también se puede tomar del sitio infectado o un área de la lesión que puede formarse o un área cercana al sitio infectado o la lesión tal como en los ganglios linfáticos. Preferentemente, la muestra biológica se obtiene recolectando los ganglios linfáticos del animal y/u otros tejidos ricos en células de memoria que proporcionan linfocitos B de memoria.
- 20

En general, la muestra biológica se toma del animal en un momento posterior al segundo desafío. Tal momento en el que se toma la muestra puede variar dependiendo de varios factores que incluyen el animal, la composición de desafío, cualquiera de las etapas posteriores que se contemplan para que se tome la muestra (por ejemplo, las condiciones de cultivo posteriores), etc., y se pueden predeterminar or experimentación de rutina. Preferentemente, la muestra biológica se toma del animal después del segundo desafío en un momento en el que se ha producido una activación suficiente de células de memoria. En una realización, la muestra biológica se toma del animal a las 24 horas tras el segundo desafío, de manera ilustrativa, en aproximadamente 1 día a aproximadamente 14 días, aproximadamente 2 días a aproximadamente 12 días, aproximadamente 4 días a aproximadamente 10 días, y aproximadamente 6 días a aproximadamente 8 días después del último desafío.

25

30

Después de la retirada de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpos presentes en la muestra biológica se pueden procesar adicionalmente para obtener el al menos un anticuerpo. En una realización después de la retirada de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpos que están presentes en la muestra biológica se cultivan in vitro. El cultivo in vitro de las células de memoria que producen anticuerpos se puede llevar a cabo con o sin etapas previas para separar sub-poblaciones de células. Las técnicas de cultivo se conocen en la técnica.

35

El sobrenadante del cultivo puede contener anticuerpos segregados por las células de memoria durante el cultivo in vitro, por lo tanto, la recolección del al menos un anticuerpo se puede llevar a cabo recolectando el sobrenadante del medio de cultivo. Los anticuerpos producidos por las células cultivadas también pueden liberarse a partir de las células cultivadas, por ejemplo por lisis de los linfocitos B para liberar el al menos un anticuerpo.

40

La producción y/o secreción in vitro del al menos un anticuerpo en el medio de cultivo por las células de memoria activadas se puede aumentar añadiendo reactivos al cultivo celular para promover la proliferación celular, y/o aumentar la producción y/o secreción de anticuerpos. Tales reactivos, solos o en combinación, incluyen citoquinas tales como, pero sin limitarse a interleucinas, por ejemplo, IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, factores estimulantes de colonias, interferones, y cualquier otro factor que se ha demostrado que tienen un efecto de aumento de la activación, proliferación, y/o producción y/o secreción de anticuerpos de linfocitos B. Por ejemplo, la activación celular puede incluir la adición al medio de cultivo de un agente activador que incluye, pero no se limita a, mitógenos y factores producidos por los leucocitos, o sus equivalentes sintéticos o combinaciones de los mismos. Opcionalmente, se incluyen agente anti-microbianos en el medio de cultivo.

45

50

El sobrenadante del cultivo celular que comprende el al menos un anticuerpo se puede utilizar directamente para determinar la unión del al menos un anticuerpo al primer y el segundo determinante antigénico. En otras palabras, el al menos un anticuerpo se puede utilizar simplemente en forma del sobrenadante recolectado del medio de cultivo.

En otras realizaciones, la muestra biológica se puede recolectar del animal y los linfocitos B contenidos en el mismo se immortalizan y/o clonan. Se conocen parejas de fusión en la técnica, que son capaces de immortalizar linfocitos B. Los procedimientos que se emplean para la fusión incluyen la combinación de linfocitos B con una pareja de fusión en presencia de un fusógeno, por ejemplo, un detergente no iónico, durante un tiempo suficiente para que se produzca la fusión, seguido por la selección de los hibridomas resultantes por medio de marcadores presentes en la

55

pareja de fusión. Las células se pueden someter entonces a dilución limitante para proporcionar clones libres de células contaminantes, proporcionando de esta manera una composición de anticuerpo homogéneo. Los hibridomas se pueden entonces proliferar en un cultivo o introducirse en un animal huésped, por ejemplo, un ratón o una rata para producir un fluido ascítico rico en anticuerpo.

- 5 Si se desea, el al menos un anticuerpo se puede someter a esquemas de purificación y/o fraccionamiento. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas tales como las que se utilizan para purificar inmunoglobulinas del suero o el plasma, por ejemplo, absorción, precipitación con sulfato amónico, fraccionamiento con ácido caprílico, cromatografía de intercambio iónico, o por unión y elución a partir de proteína G o proteína A inmovilizadas, dependiendo de la configuración o aplicación particular, el al menos un anticuerpo también se puede acoplar a un soporte adecuado, por ejemplo, un soporte de cromatografía de afinidad.

10 Por lo tanto, por ejemplo, una solución que comprende el al menos un anticuerpo también puede contener al menos un anticuerpo no específico indeseado, que puede ser no deseable durante la etapa de poner en contacto el al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico. Por lo tanto si se desea, se puede retirar el anticuerpo no deseado de la solución por absorción de la solución que comprende el al menos un anticuerpo con varios reactivos que incluyen, por ejemplo, yema de huevo, tejido en polvo, suspensiones de microorganismos, etc. El suero pre-inmune recolectado del animal también se puede utilizar para la absorción. De manera ilustrativa, a modo de otro ejemplo, una solución que comprende el al menos un anticuerpo producido en respuesta a un desafío con una especie de bacterias se puede incubar con, por ejemplo, una suspensión celular bacteriana extraída con un detergente de otras especies, luego se centrifuga y se recolecta el sobrenadante que comprende el al menos un anticuerpo. La absorción se puede llevar a cabo más de una vez para minimizar la unión no específica debido a anticuerpos no relevantes.

15 De acuerdo con la presente invención, el procedimiento para determinar una molécula que comprende un determinante antigénico de reactividad cruzada comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con un primer determinante antigénico y un segundo determinante antigénico. La unión del al menos un anticuerpo al primer y segundo determinante antigénico determina la molécula. La puesta en contacto se puede llevar a cabo utilizando una técnica, o combinación de técnicas, conocidas en la técnica. En una realización, el procedimiento comprende además determinar si el al menos un anticuerpo se une al primer determinante antigénico y al segundo determinante antigénico o no. Técnicas ejemplares que se pueden utilizar, solas o en combinación, incluyen, sin limitación, transferencia de Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y ensayo de inmunofluorescencia. Tales técnicas se prefieren particularmente cuando la molécula que comprende el determinante antigénico es una proteína. En una realización, poner en contacto comprende la utilización de una técnica de transferencia de Western para determinar la unión del al menos un anticuerpo al primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico en que una primera y una segunda proteína comprenden el primer y el segundo determinante antigénico, respectivamente.

25 Por ejemplo, cuando la molécula que se va a determinar es una proteína, una primera composición que comprende una primera proteína que tiene el primer determinante antigénico y una segunda composición que comprende una segunda proteína que tiene el segundo determinante antigénico se pueden mezclar cada uno por separado con una solución tampón de referencia y someterse a electroforesis en gel de sulfato dodecil de poliacrilamida (SDS/PAGE), y luego transferirse en nitro-celulosa, nilón, u otras membranas antes de poner en contacto el al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico. La unión del al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico se puede visualizar entonces, por ejemplo añadiendo un anticuerpo secundario, que se puede marcar y seleccionar de acuerdo con la fuente (es decir, el animal) del al menos un anticuerpo. Luego, se pueden llevar a cabo análisis comparativos de de las bandas detectables que corresponden a la primera y segunda proteína para detectar la unión del al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico, en que la unión del al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico indica que el al menos un anticuerpo tienen reactividad cruzada con el primer y el segundo determinante antigénico. En consecuencia, el primer y el segundo determinantes antigénicos tienen reactividad cruzada, determinando de esta manera las moléculas (es decir, las proteínas), que se pueden caracterizar adicionalmente utilizando técnicas conocidas en la técnica.

30 A modo de ejemplo, cuando el determinante antigénico con reactividad cruzada se crea por una proteína, se conocen varias técnicas en la técnica para caracterizar adicionalmente la proteína determinada que comprende el determinante antigénico que tiene reactividad cruzada. Por ejemplo, después de la SDS/PAGE o transferencia en gel a una membrana, una región del gel o la membrana que corresponde a la proteína se puede extirpar o eluir del gel o la membrana, y al menos purificarse parcialmente para posteriores análisis utilizando técnicas conocidas que incluyen espectroscopia de masas y secuenciación de aminoácidos del extremo N (por ejemplo, degradación de Edman). Además, se puede comparar la información de secuencia de aminoácido con cualquiera de las secuencias de aminoácidos conocidas (por ejemplo, por comparación de homología) para determinar y/o caracterizar adicionalmente la identidad de la proteína. Además, la información de la secuencia de aminoácidos se puede utilizar para deducir una información de secuencia de ácidos nucleicos correspondiente, que puede proporcionar, entre otras cosas, cebadores y sondas para la amplificación de ácido nucleico específico y/o fines de clonación. Por lo tanto, en otras realizaciones, el procedimiento comprende además la determinación de la secuencia de aminoácidos

de al menos una parte de la molécula, en que la molécula es una proteína.

5 En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar una proteína que comprende un determinante antigénico con reactividad cruzada. El procedimiento comprende poner en contacto el al menos un anticuerpo con un primer determinante antigénico y un segundo determinante antigénico, en que el al menos un anticuerpo se obtiene de un animal expuesto secuencialmente a un primer desafío inmunológico producido por una primera composición inmunogénica que comprende el primer determinante antigénico seguido por un segundo desafío inmunológico producido por una segunda composición inmunogénica que comprende el segundo determinante antigénico, en que la unión del al menos un anticuerpo con el primer y el segundo determinante antigénico es indicativo de reactividad cruzada determinando de esta manera la proteína. La
10 puesta en contacto es como se ha descrito anteriormente.

En una realización, la proteína se expresa por *H. parasuis*. En otra realización, la primera composición inmunogénica comprende además bacterias de *H. parasuis* de un primer serotipo, en que la segunda composición inmunogénica comprende *H. parasuis* de un segundo serotipo. En algunas realizaciones, el primer serotipo es *H. parasuis* serotipo 5 y el segundo serotipo es *H. parasuis* serotipo 13.

15 En consecuencia, en otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar una molécula que comprende un determinante antigénico con reactividad cruzada, comprendiendo el procedimiento:

- a) activar un linfocito B de memoria en una animal para producir al menos un anticuerpo, en el que la activación comprende desafiar inmunológicamente al animal con una segunda molécula para producir una respuesta inmunológica que activa el linfocito B; y
- 20 b) poner en contacto el al menos un anticuerpo con la molécula y la segunda molécula, en que la unión del al menos un anticuerpo con la molécula y la segunda moléculas determina la molécula.

III. Molécula aislada

25 En otros aspectos, también se desvela una molécula aislada, o un fragmento de la misma, que comprende un determinante antigénico con reactividad cruzada. En una realización, la molécula aislada es una proteína. En otra realización, el determinante antigénico con reactividad cruzada está presente en una proteína que se expresa en al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En una realización, también se desvela un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

30 en el que el polipéptido aislado comprende además un determinante antigénico con reactividad cruzada presente en una proteína que se expresa por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otra realización, también se desvela un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

ELANAI	(SEC ID N° 1);
TVLAEKQEII	(SEC ID N° 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEC ID N° 3);
MKNLISI	(SEC ID N° 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEC ID N° 5).

35 en que el polipéptido aislado comprende además un determinante antigénico con reactividad cruzada y se expresa por *H. parasuis* serotipo 5.

40 La comparación de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°s 1-5 con varios segmentos de las secuencias de aminoácidos de *H. parasuis* remitidas a GENBANK revela al menos las siguientes homologías: SEC ID N° 1 y N° de registro: ZP_02478744; SEC ID N° 2 y N° de registro: ZP_02477919; SEC ID N° 3 y N° de registro: ZP_02478157; SEC ID N° 4 y N° de registro: ZP_02478801; y SEC ID N° 5 y N° de registro: ZP_02477404.

IV. Composiciones, vacunas, diagnóstico, y kits

También se desvelan procedimientos, composiciones y kits basados en la molécula determinada que comprende el determinante antigénico con reactividad cruzada. Preferentemente, la molécula determinada es una proteína que se expresa por un agente patógeno causante de una enfermedad. El agente patógeno causante de una enfermedad preferentemente es una bacteria, preferentemente, *H. parasuis*, sin embargo, la invención no se restringe a este y la siguiente descripción se simplemente ilustrativo en referencia a *H. parasuis* y las proteínas y polipéptidos de *H. parasuis* de la presente invención.

Vacunas para la inmunización activa

También se desvelan vacunas para la inmunización activa diseñadas para tratar o proteger contra las infecciones por *H. parasuis*, y estas vacunas se pueden preparar a partir de proteínas de *H. parasuis*, o un fragmento de las mismas, que comprenden el determinante antigénico con reactividad cruzada como se ha expuesto anteriormente utilizando procedimientos convencionales de preparación de vacunas bien conocidos en este campo. Típicamente, una cantidad inmunogénica de proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico con reactividad cruzada se combina con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y una cantidad de esta vacuna eficaz para inmunizar un ser humano o animal se administra según sea apropiado. Por cantidad inmunogénica se entendería por un experto habituado en esta técnica que se refiere a una cantidad de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico con reactividad cruzada que se suficiente para originar una respuesta inmunogénica en el ser humano o el animal.

Se pueden preparar los polipéptidos deseados comprenden el determinante antigénico con reactividad cruzada que sirve como los principios activos de las vacunas de la invención, dependiendo de su tamaño, por una cualquiera de varias estrategias que se conocen en la técnica.

Por ejemplo, si la secuencia polipeptídica es relativamente corta, por ejemplo, que corresponde con la secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en el determinante antigénico con reactividad cruzada, es factible la síntesis química, utilizando procedimientos ahora de referencia en la técnica. En un procedimiento típico, el aminoácido del extremo C se puede unir a un soporte sólido, y reacciona con el próximo aminoácido de la secuencia que se ha protegido en el grupo amino para evitar la auto-condensación. Tras el acoplamiento inicial, el grupo que protege el NH₂ se puede eliminar, y repetirse el proceso de acoplamiento con el próximo aminoácido por orden.

O, por ejemplo, los polipéptidos desvelados en el presente documento se puede preparar por purificación de la proteína nativa, de por ejemplo, cultivos en fermentador, seguido por generación del fragmento deseado por varias técnicas, y la purificación del fragmento deseado. La metodología de ADN recombinante proporciona otra forma de sintetizar los péptidos deseados. La secuencia de ADN codificante (por ejemplo, el ADNc, digestión genómica) del péptido deseado se puede ligar en un vector de expresión adecuado para transformar una cepa receptora para expresar el gen y producir el polipéptido.

Sea derivada de un genoma o biblioteca de ADNc, o por síntesis de oligonucleótidos utilizando procedimientos químicos, la secuencia codificante se puede situar bajo el control de secuencias promotoras compatibles con los huéspedes bacterianos en plásmidos que contengan los sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia codificante deseada. Los vectores de expresión resultantes se pueden transformar en huéspedes bacterianos adecuados utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los transformantes satisfactorios pueden producir los fragmentos de polipéptido deseados a niveles más altos que los que se encuentran en las cepas recombinantes o nativas. De manera alternativa, estos péptidos se pueden producir en huéspedes recombinantes no bacterianos utilizando las secuencias de control, vectores y técnicas de transformación adecuados.

Cuando se determina que las secuencias peptídicas que comprenden el determinante antigénico con reactividad cruzada son demasiado pequeñas para ser inmunogénicas, se pueden unir a sustancias portadoras con el fin de conferirles una propiedad inmunogénica. Se puede utilizar cualquier procedimiento para crear tales uniones que se conocen en la técnica. Por ejemplo, hay un gran número de agentes heterobifuncionales que generan un enlace disulfuro en un extremo del grupo funcional y un en lace peptídico en el otro, y estos se utilizan extensamente. El más popular de estos es N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP). Este reactivo crea un enlace disulfuro entre sí mismo y un resto de cisteína en una proteína y un enlace amida por medio del amino de una lisina, u otro grupo amino libre en el otro. Se conoce una variedad de tales agentes formadores de tales disulfuro/amida. Otros agentes de acoplamiento bifuncional forman un enlace tioéter más que un disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están disponibles comercialmente e incluyen los reactivos ésteres del ácido 6-maleidoimidocaproico, ácido 2 bromoacético, ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleidimidometil) ciclohexano-1-carboxílico y similares. Los grupos carboxilo se pueden activar combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica. Si el péptido contiene cisteína no conveniente, se puede añadir un resto de cisteína adicional en cada extremo cuando se preparara el péptido. Como típicamente solo los péptidos más cortos necesitan la conjugación con un portador, estos restos se pueden incluir convenientemente durante la síntesis química.

La preparación de vacunas que contienen secuencias peptídicas como principios activos se entienden bien en la técnica. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; o

también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El principio activo inmunogénico se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, o adyuvantes que aumentan la eficacia de la vacuna. Las vacunas se administran parenteralmente de manera convencional, por inyección, por ejemplo, o bien subcutánea o intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, se pueden incluir aglutinantes y vehículos tradicionales, por ejemplo, polialcaleno glicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar por mezclas que contienen en principio activo en un intervalo del 0,5% al 10%, preferentemente del 1-2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes que se utilizando normalmente como, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, y similares de calidad farmacéutica. Estas composiciones tienen la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos que contienen el 10%-95% de principio activo, preferentemente 25-70%.

Las secuencias de aminoácidos de la invención incluyen sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las sales por adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como el acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales que se forman con los grupos carboxilo también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamina etanol, histidina, procaína, y similares.

Las vacunas se pueden administrar de manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que será eficaz profiláctica o terapéuticamente e inmunogénica. La cantidad que se va a administrar puede depender del sujeto que se va a tratar, capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo que se necesitan para administrarse pueden depender del juicio del encargado-administrador/facultativo. Los intervalos de dosificación adecuados para la inyección subcutánea o intramuscular puede ser aproximadamente de 1 µg a aproximadamente 10 mg de principio activo por sujeto, por ejemplo. Para la preparación oral, supositorio rectal, uretral o vaginal, las dosificaciones pueden variar, de manera ilustrativa, desde aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 mg. Los regímenes adecuados para la administración inicial y los refuerzos también son variables, pero están tipificados por la administración inicial seguida por intervalos de aproximadamente una o aproximadamente dos semanas por una inyección posterior u otra administración.

Anticuerpos

En otro aspecto, también se desvelan anticuerpos aislados que se pueden generar a partir de una proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada de forma que sea capaz de reconocer el determinante antigénico de reactividad cruzada, en que la proteína se expresa por *H. parasuis*. Estos anticuerpos pueden ser o bien monoclonales o policlonales. Si se desean anticuerpos policlonales, se pueden generar en una cualquiera de varias maneras convencionales conocidas en la técnica. Típicamente, la proteína, o un fragmento de la misma, comprenden el determinante antigénico de reactividad cruzada que se puede inyectar en un animal huésped adecuado, por ejemplo, un ratón o conejo, y después de un periodo de tiempo adecuado, se pueden aislar y recuperar los anticuerpos del animal huésped. Con respecto a los anticuerpos monoclonales, de acuerdo con la presente invención, se pueden producir de cualquiera de varias maneras que incluyen, por ejemplo, por el procedimiento bien conocido de Kohler y Milstein, Nature 256:495497 (1975), o tal como los procedimientos desvelados en las Pat. de EE. UU. N^{os} 6.331.415, 5.981.216, 5.807.715, y 4.816.567. Tales procedimientos se conocen en la técnica e incluyen la preparación de anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados, y humanos. Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar a partir de una única cadena, tal como las cadenas pesada o ligera, y además también se pueden preparar a partir de fragmentos activos de un anticuerpo que mantiene las características de unión (por ejemplo, reactividad cruzada, especificidad y/o afinidad) del anticuerpo completo. Fragmentos activos significa un fragmento de anticuerpo que tiene la misma especificidad de unión que un anticuerpo completo que se une al determinante antigénico de reactividad cruzada particular de diferentes serotipos de *H. parasuis*, y el término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento significa que incluye dichos fragmentos. Adicionalmente, se contempla también el antisuero preparado utilizando los anticuerpos monoclonales o policlonales de acuerdo con la invención y se pueden preparar de varias maneras adecuadas como reconocería un experto en la técnica.

Aunque la producción de anticuerpos utilizando formas recombinantes de la proteína, o un fragmento de la misma, comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada se prefiere, los anticuerpos se pueden generar a partir de aislados naturales y versiones purificadas de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada, y los anticuerpos monoclonales o policlonales se pueden generar utilizando la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada de la misma manera que se describe anteriormente para obtener tales anticuerpos.

Inmunización pasiva

Además de las vacunas activas en que los anticuerpos se generan en el paciente por medio de la administración de una cantidad inmunogénica de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada, también se pueden utilizar anticuerpos aislados de la presente invención, o fragmentos 5 activos de los mismos, en el desarrollo de composiciones farmacéuticas y/o vacunas para la inmunización pasiva contra las infecciones por *H. parasuis*.

Un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos desvelados en el presente documento (es decir, los anticuerpos capaces de reconocer el determinante antigénico de reactividad cruzada= también se pueden formar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un ser humano o animal con el fin de tratar o 10 prevenir una infección causada por bacterias *H. parasuis*. Las composiciones farmacéuticas que contienen tales anticuerpos, o fragmentos eficaces de los mismos, se pueden formular en combinación con cualquiera de los vehículos, excipientes o portadores farmacéuticos adecuados que se usarían comúnmente en esta técnica, incluyendo solución salina, dextrosa, agua, glicerol, etanol, otros compuestos terapéuticos, y combinaciones de los mismos. Como un experto en esta técnica reconocería, el vehículo, excipiente o vehículo particular que se utilice 15 variará dependiendo del receptor que se pretende y el estado del receptor, y que sería adecuada una variedad de modos de administración para las composiciones desveladas en el presente documento, como reconocería un experto habituado en esta técnica. Los procedimientos adecuados de administración de una composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, la administración tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal e intradérmica.

Para la administración tópica, la composición se puede formular en forma de ungüento, crema, gel, loción, gotas (tales como gotas oftálmicas y gotas óticas), o solución (tal como un enjuague bucal). Vendajes de heridas o quirúrgicos, suturas y aerosoles que se pueden impregnar con la composición. La composición puede contener 20 aditivos convencionales, tales como conservantes, disolventes para promover la penetración, y emolientes. Las formulaciones tópicas pueden contener también vehículos convencionales tales como bases de crema o ungüentos, etanol, o alcohol oleico.

Las composiciones de anticuerpos desveladas en el presente documento se pueden también administrar con un adyuvante adecuado en una cantidad eficaz para aumentar la respuesta inmunogénica. Por ejemplo, los adyuvantes adecuados pueden incluir aluminio (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), que se utiliza ampliamente en seres humanos, y otros adyuvantes tales como la saponina y su componente purificado el Quil A, adyuvante completo de Freund, adyuvante RIBBI, y otros adyuvantes que se utilizan en investigación y aplicaciones veterinarias. Ejemplos 30 de otras preparaciones definidas químicamente incluyen muramil dipéptido, monofosforil lípido A, conjugados de fosfolípidos, encapsulación del conjugado con proteoliposomas, y encapsulación de la proteína en vesículas lipídicas.

Las composiciones de anticuerpos que reconocen el determinante antigénico de reactividad cruzada como se han expuesto anteriormente serán útiles en procedimientos para prevenir o tratar la infección por *H. parasuis*. También se desvela un procedimiento para prevenir o tratar una infección por *H. parasuis*, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra el determinante antigénico de reactividad cruzada como se expone en el presente documento de forma que se trate o prevenga la infección por *H. parasuis*. 35

En general, la dosis preferida para la administración de tal composición de anticuerpos es la cantidad que será eficaz en la prevención o tratamiento de la infección por *H. parasuis* y se puede reconocer fácilmente que esta cantidad puede variar dependiendo de la naturaleza de la infección y el estado de un sujeto. Una "cantidad eficaz" de anticuerpo o agente farmacéutico pretende significar una cantidad no tóxica pero suficiente del agente, tal que se produce el efecto profiláctico o terapéutico. La cantidad exacta del anticuerpo o un agente particular que se necesita variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y estado general del sujeto, la gravedad de la afección 45 que se va a tratar, el vehículo o adyuvante en particular que se va a utilizar y su modo de administración, y similares. En consecuencia, la "cantidad eficaz" de una composición de anticuerpos en particular variará en base a las circunstancias particulares, y se puede determinar una cantidad eficaz apropiada en cada caso de aplicación por un experto habituado en la técnica utilizando la experimentación de rutina. La dosis se puede ajustar para adaptarse al sujeto individual al que se administra la composición y variará con la edad, peso y metabolismo del individuo. Las 50 composiciones pueden contener también estabilizantes o conservantes farmacéuticamente aceptables.

En consecuencia, los anticuerpos proporcionarán de esta manera procedimientos para tratar o prevenir la infección por *H. parasuis* en un ser humano o animal cuando se administra una cantidad eficaz de una composición de anticuerpos al ser humano o al animal. En que la cantidad eficaz es suficiente para prevenir o tratar la infección por las bacterias. Como reconocería un experto habituado en esta técnica, el nivel de título de anticuerpo necesario para que sea eficaz en el tratamiento o prevención de la infección variará dependiendo de la naturaleza de la afección del sujeto, y/o la gravedad de cualquier infección pre-existente. 55

Además, tales anticuerpos se pueden modificar para que sean menos inmunogénicos cuando se administran. A modo de ejemplo, con referencia al receptor humano del anticuerpo, el anticuerpo se puede "humanizar" trasplantando las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma en un

anticuerpo monoclonal humano o “revestirse” cambiando los restos de estructura murina expuestos en las regiones variables de inmunoglobulina para imitar un equivalente de estructura humano homólogo. E incluso además, cuando así se desee, tales anticuerpos monoclonales se pueden administrar en conjunción con un antibiótico adecuado para aumentar más la capacidad de las presentes composiciones para combatir las infecciones bacterianas como sea necesario.

Por lo tanto, la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende el determinante antigénico de reactividad cruzada se puede utilizar como vacunas activas, y los anticuerpos se pueden utilizar como vacunas pasivas útiles para proporcionar anticuerpos adecuados para tratar o prevenir una infección por *H. parasuis*. Como reconocería un experto en la técnica, se puede envasar una vacuna para su administración en varias maneras adecuadas, tales como por administración parenteral (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración nasofaríngea (por ejemplo, intranasal). La vacuna puede estar liofilizada para su resuspensión en el momento de la administración o en solución.

Diagnóstico

En otros aspectos, los anticuerpos que se desvelan en el presente documento se pueden utilizar también para la detección específica de proteínas de *H. parasuis*, o como herramientas de investigación. Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden marcar directamente con un marcador detectable para la identificación y cuantificación de bacterias de *H. parasuis*. Los marcadores para su uso en inmunoensayos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen enzimas, radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I), y fluorescentes (fluoresceína y derivados, ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina, y Rojo Texas), luminiscentes (por ejemplo, luciferina de luciérnaga) y sustancias cromógenas, que incluyen partículas coloreadas tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Si se desea, el anticuerpo se puede marcar indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por la inmunoglobulina. El anticuerpo se puede conjugar con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y el conjugado anticuerpo-biotina se detecta utilizando avidina o estreptavidina marcada. El anticuerpo también se puede conjugar con un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno se detecta utilizando anticuerpo anti-hapteno marcado. Estos procedimientos y otros de marcaje de anticuerpos y conjugados de ensayo se conocen bien por los expertos en la técnica. La detección de un marcador se puede llevar a cabo por varios procedimientos incluyendo el recuento de centelleo, espectrometría de rayos gamma, autorradiografía, y detección de fluorescencia.

En consecuencia, cuando se utilizan con marcadores adecuados u otras biomoléculas o productos químicos adecuados, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para fines tales como el diagnóstico in vivo e in vitro de las infecciones por *H. parasuis* o la detección de bacterias de *H. parasuis*.

Kits

En otro aspecto, también se describe en el presente documento un kit para aislar y determinar las bacterias e infección por *H. parasuis*. En una realización, el kit comprende los anticuerpos de reactividad cruzada aislados que se desvelan en el presente documento de una forma adecuada, tal como liofilizados en un envase único que se pueden activar por adición de una muestra acuosa sospechosa de contener las bacterias de *H. parasuis*. Tal kit incluirá típicamente un envase adecuado para albergar los anticuerpos de una forma adecuada junto con un reactivo de inmunodetección adecuado. En general, estos kits pueden contener un anticuerpo e instrucciones para determinar la unión de ese anticuerpo cuando se introduce una muestra de un sujeto con el anticuerpo. Por ejemplo, un reactivo de inmunodetección adecuado puede comprender una señal o marcador detectable adecuado, tal como una biotina o enzima que produce un color detectable, etc., que se puede unir al anticuerpo o que se utiliza de otras maneras adecuadas de forma que se proporcione un resultado detectable cuando el anticuerpo se une al antígeno. En otra realización, el kit comprende una proteína de *H. parasuis*, o un fragmento de la misma, que comprende un determinante antigénico de reactividad cruzada.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente como ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desafío secuencial

Todos los animales de experimentación se sometieron a los procedimientos que se exponen por la Política del Servicio de Salud Pública revisada del Uso y Cuidados Humanitarios de los Animales de Laboratorio, el Acta de Provisión del Bienestar Animal, y otras leyes y regulaciones aplicables.

Las composiciones de desafío se prepararon de la siguiente manera: una torunda de algodón estéril se pasó por una reserva de *H. parasuis* descongelada con aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y se frotó suavemente para cubrir la superficie de una placa de agar chocolate. Se incubó el cultivo a 37 °C durante 48 h

en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se utilizaron entonces tres ml de peptona para lavar la placa, utilizando un rascador celular y se pasó a través de una estopilla para eliminar cualquier resto de agar. El fluido capturado se normalizó a 1 DO con tampón peptona. Este nivel se alcanzó con una dilución de aproximadamente 1:11. El material se almacenó a 4 °C durante aproximadamente 1 h antes de su uso.

- 5 Se obtuvieron dieciocho cerdos privados de calostros, derivados de cesárea (CDCD) de 5 semanas de edad en Struve Labs, Inc. Los animales se colocaron aleatoriamente en uno de tres grupos: 9 cerdos se colocaron en el grupo experimental, 4 cerdos en el grupo de control, y 5 cerdos en el grupo centinela (Tabla 1). Todos los animales se equiparon con cánulas intranasales para proporcionar un acceso directo al sistema respiratorio superior y se albergaron en habitaciones de acceso controlado según el grupo.

10 Tabla 1: Agrupamiento animal y desafío

Grupo Experimental	Desafío de Serotipo 5 de <i>H. parasuis</i>	Desafío de Serotipo 13 de <i>H. parasuis</i>
Experimental (9 animales)	X	X
Control (4 animales)		
Centinela (5 animales)		X

- A las 7 semanas de edad los animales del grupo experimental se desafiaron por vía intranasal con 1 ml de serotipo 5 diluido a una densidad óptica (DO) de 0,001 a 530 nm en tampón peptona. Los cerdos centinelas y de control se desafiaron con tampón peptona. Tras el desafío, se dejó que los cerdos se recuperaran. Se administraron antibióticos de amplio espectro según se necesitaba.

Nueve semanas después del primer desafío, los animales del grupo experimental y centinela se desafiaron por vía intranasal con 1 ml del serotipo 13 diluido a un DO de 0,001 a 530 nm en tampón peptona.

- Se hizo la necropsia de tres animales que se seleccionaron aleatoriamente de cada grupo 24 h después del segundo desafío. Se recolectaron los tejidos respiratorios y linfáticos de estos animales, se maceraron con un escalpelo estéril, y se colocaron en placas de 24 pocillos que contenían medio de cultivo celular con agentes antibacterianos para permitir que proliferaran las células activadas. Este sobrenadante del medio se utilizó en ensayos posteriores. Los animales restantes se observaron durante 2 semanas más y se les practicó la necropsia.

Ejemplo 2

SDS/PAGE y transferencia de Western

- 25 Un ml de reserva de *H. parasuis* a 5×10^8 UFC/ml se diseminó en una placa en placas de agar chocolate. Se incubó el cultivo a 37 °C durante 48 h en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se utilizaron entonces cuatro ml de solución salina tamponada fosfato (PBS) para lavar la placa, utilizando un flujo inducido por pipeta para suspender las células. Las células resuspendidas se almacenaron a 4 °C y se utilizaron en una semana. Se centrifugaron (9.000 g, 1 h) dos ml de la suspensión y las células aglomeradas se resuspendieron en 200 µl de PBS, se lavaron dos veces con PBS, y se rompieron por el paso a través de una aguja de calibre 18. La suspensión de células lavadas se mezcló 1:1 con PBS que contenía un 2% de Tween-20 y se incubaron en un rotador de tubos de ensayo durante 90 min a 37 °C. Tras la incubación, se retiraron las células por centrifugación (48.000 g, 1 h). El sobrenadante del cultivo se mantuvo y almacenó a 4 °C y se utilizó en 1 semana.

- 35 Se llevó a cabo la SDS-PAGE utilizando el sistema Criterion™ con geles de acrilamida al 12,5% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La suspensión celular de *H. parasuis* se procesó en los geles a una dilución de 1:3 en PBS. Se procesó el extracto de Tween-20 sin diluir. Los geles se tiñeron con reactivo de tinción azul GelCode (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL), una tinción del gel basado en Coomassie. Se ejecutaron las transferencias de Western utilizando el kit detector de proteínas (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland). Se llevó a cabo un sondeo primario utilizando los fluidos inmunitarios generados del desafío porcino. Se utilizó anti-HRP porcino de cabra como anticuerpo de detección. Se consiguió la visualización con 1 sustrato para peroxidasa de componente de membrana TMB (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland).

- 45 El sobrenadante recolectado de las células activadas que se aisló de varios tejidos de 9 animales se enfrentó contra células del serotipo 5 de *H. parasuis* completas. Se utilizaron altas concentraciones de estos sobrenadantes para la visualización por transferencia de Western. Se obtuvo una alta y específica concentración de anticuerpo de los ganglios linfáticos bronquiales del cerdo 47 (BL47). El patrón de banda en bruto presente en esta transferencia de Western era indicativa de proteínas presentes en el *H. parasuis* que eran reconocidas por el animal desafiado. Se eligió el BL47 posteriores análisis comparativos.

Las proteínas reconocidas entre los serotipos se caracterizaron adicionalmente por medio de un segundo grupo de transferencias de Western. Se exploraron primero los serotipos 5 y 13. El serotipo 5 mostraba bandas prominentes a

aproximadamente 28, 33, 45, 56, 63 y 76 kDa. El patrón de bandas del serotipo 13 era similar al serotipo 5 y contenía bandas prominentes a 28, 45, 55, 62 y 75 kDa. El ensayo con BL47 contra el serotipo 4, un serotipo que no está implicado en los desafíos porcinos, también generaba bandas prominentes a 28, 34, 41, 47, 57, 62, y 77 kDa. Las proteínas de aproximadamente 28, 45, 55, 62, y 75 kDa, que parecían estar presentes en todos los serotipos ensayados, se examinaron posteriormente.

Se identificaron las proteínas presentes en múltiples serotipos utilizando los fluidos generados del desafío secuencial. Para aumentar las concentraciones relativas de proteínas asociadas a membranas en las muestras, se procesó un cultivo del serotipo 5 por medio de un proceso de extracción en Tween-20. Este procedimiento se había mostrado anteriormente para aislar las membranas externas de las bacterias. Llevando a cabo este procedimiento se producían muy pocas diferencias en el perfil SDS-PAGE con las células sin tratar. Las bandas eran similares en la transferencia de Western, también, demostrando que las proteínas que los inventaron apuntaron inicialmente estaban presentes.

El material procesado con Tween-20 se utilizó para la secuenciación. Este material contenía las proteínas de reactividad cruzada y tenía la mayoría de los residuos eliminados durante el curso del procesamiento. Por lo tanto, esta preparación de Tween-20 se ejecutó en varias calles adyacentes en una membrana PVDF para el corte de las bandas y la secuenciación. Las bandas seleccionadas para la secuenciación a partir del serotipo 5 incluyen las de ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa.

Ejemplo 3

Resultados de la secuenciación

Las muestras para la secuenciación primero se procesaron en una SDS-PAGE, luego se transfirieron a una membrana PVDF. Esta membrana se tiñó y se extirparon las bandas utilizando una cuchilla de afeitarse. Se llevó a cabo la espectrometría de masas sobre los coágulos extirpados con la cuchilla de afeitarse. El tampón de transferencia era el tampón de referencia Tris/glicina con un 20% de MeOH. La membrana se tiñó con Reactivo de tinción azul GelCode (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se destiñeron con ~25% de isopropanol en agua. Los fragmentos de membrana se aclararon copiosamente con agua desionizada purificada.

Las muestras (es decir, bandas de ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa) se caracterizaron adicionalmente utilizando espectrometría de masas y secuenciación de extremo N (degradación de Edman). Los resultados de la secuenciación del extremo N proporcionan la información parcial, que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados de la secuenciación del extremo N

SPAKGSTIEAGIAYPISRA
SEPQATX ¹ DAK
MKNLISIAKG
GEIEELALGI
MEKDVKFGNDARVGMLKGVNXXKADA
SELXELANAITFLSMGVG
GKVPETTFLAXKQEIIX
APAKGSTIEAGIAYPISTAXDDMMS
SPSDKTFKISAIPDYNAEMTS
¹ X representa un aminoácido indeterminado.

La información de la secuencia para los fragmentos proteicos se procesaron por BLASTp contra el *H. influenzae* y *H. ducreyi* en la base de datos Swiss-Prot. Las proteínas con más de 10 aminoácidos (aa) o menores de 3 posiciones con múltiples posibilidades de aminoácidos se analizaron adicionalmente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de la secuenciación de proteínas.

Nº	PM (kDa)	PM Est. (kDa)	E-Valor	ID Swiss-Prot	Nombre de Proteína / Descripción
1	28	22	0,76	Q4QM69	Peptidoglicano transglucosilasa monofuncional biosintética
2	28	34	2,5	Q4QK43	ARNt pseudouridina sintasa B
3	28	32	3,4	Q4QJL4	Enoil -[acil -proteína-portadora] reductasa
4	28	68	8	Q4QLZ8	Sistema de eflujo de potasio regulado por glutatión
5	56	60	8,00E-08	Q4QM48	Proteína A de unión a Hemo
6 ^a	56	58	0,041	Q7VL18	Supuesta proteína de unión al transportador ABC periplásmico
7	63	61	0,33	Q4QLH0	Proteína de unión al oligopéptido periplásmico
8	63	28	1,9	Q4QNT7	TonB (transportador de hierro)
9	76	68	4,00E-09	Q4QJW4	Proteína chaperona adnK (HSP70)
10	76	24	0,59	Q4QP42	Supuesta N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa
11	76	17	1,1	Q4QMR6	Fosfopanteteína adenilil transferasa
12	76	74	2	Q4QJR2	HMW1C, supuesta glucosil transferasa implicada en la glucosilación de HMW1A y HMW2A

^a = Secuencia proteica contra *H. ducreyi*. Todas las otras secuencias se obtienen a través de la comparación con *H. influenzae*.

La Tabla 3 incluye al menos dos proteínas que parece que probablemente se exponen en la superficie celular (proteínas 6 y 7) y al menos una que parece que es capaz de unirse al hierro (proteína 5).

5 Ejemplo 4

PCR y clonación

Las proteínas 5 y 6 mostradas en la Tabla 3 eran inmunogénicas ya que ambas eran reconocidas por los fluidos inmunitarios porcinos. Estas proteínas se habían asociado con la adquisición de hierro. Los transportadores tipo ABC tienen una amplia variedad de funciones comunicadas y se han conectado con la captación de hierro en las Cianobacterias. La proteína de unión al grupo hemo es vital para la supervivencia del *H. influenzae* en la corriente sanguínea ya que recolecta hierro unido a grupos hemo. Además, la proteína de unión al hemo se conserva altamente en el género.

Utilizando la información publicada del genoma de *H. influenzae* y *H. ducreyi*, se diseñaron cebadores de PCR para amplificar las dos proteínas seleccionadas (es decir, las proteínas 5 y 6) de una preparación cromosómica de *H. parasuis*. Los cebadores de la PCR que se utilizaron se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Cebadores de PCR

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T _M
Proteína 5		
FHpsHemeBam (directo)	TATAGGATCCATGCTTATGAAACTAAAAGCAACATTA ACT	60 °C
RHpsHemeXho (inverso)	TATACTCGAGTTATTTACCATCAACACTCACACCATAAAA	61 °C
Proteína 6		
FHpsABC Bam (directo)	TATAGGATCCATGACTTCTCATTTTGAATACAATCAATCT	60 °C
RHpsABCXho (inverso)	TATACTCGAGTTATGTACGACCTACACCAAGGAAAGACAA	64 °C

Para la amplificación de una secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína 5, se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 4 y la PFU Turbo polimerasa, y la preparación cromosómica de *H. parasuis* como armazón. Se apreciaron dos bandas sólidas en la reacción hemo (~1,8 kb y ~800 pb) y la banda correspondiente al producto de amplificación de ~1,8 kb se purificó del gel.

Para la amplificación de una secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína 6, se llevó a cabo utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 4 y PFU Turbo polimerasa y la preparación cromosómica de *H. parasuis* como armazón. Se apreciaba un doblete en esta reacción (~1,5 kb y ~1,3 kb) y la banda superior (es decir, ~1,5 kb) del doblete se purificó utilizando un kit de elución del gel.

A los fluidos purificados del gel que contenían los productos amplificados se les agregó una cola A y se ligaron al pGEM-T. Esta unión se transformó en células competentes TOP10 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Los transformantes se recogieron y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Las inserciones se confirmaron posteriormente y se subclonaron en el vector de expresión pTRCHis-A (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para la expresión de proteínas recombinantes que contienen los marcadores 6xHis en el extremo N.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Animal Health, Inc. Plocher, Thomas

10 <120> Composiciones, procedimientos y kits

<130> N079 1290.1

<160> 5

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 11

20 <212> PRT

<213> *Haemophilus parasuis*

<400> 1

Glu Leu Ala Asn Ala Ile Thr Phe Leu Ser Met

25 1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

30 <213> *Haemophilus parasuis*

<400> 2

Thr Val Leu Ala Glu Lys Gln Glu Ile Ile

35 1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> *Haemophilus parasuis*

40 <400> 3

Ala Pro Ala Lys Gly Ser Thr Ile Glu Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Ile

1 5 10 15

Ser Thr

45 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Haemophilus parasuis*

50 <400> 4

Met Lys Asn Leu Ile Ser Ile

1 5

<210> 5

55 <211> 22

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de polipéptidos que comprenden un determinante antigénico de reactividad cruzada, comprendiendo el procedimiento la obtención de al menos un anticuerpo de un animal expuesto secuencialmente a un primer desafío inmunológico producido por una primera composición inmunogénica que
5 comprende un primer determinante antigénico de un primer polipéptido,
seguido por un segundo desafío inmunológico producido por una segunda composición inmunogénica que
comprende un segundo determinante antigénico de un segundo polipéptido,
en que el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un
segundo microorganismo,
10 y en que el primer y el segundo microorganismos se caracterizan por ser diferentes serotipos de la misma especie,
y luego poniendo en contacto el al menos un anticuerpo con el primer determinante antigénico y el segundo
determinante antigénico, en el que la unión del al menos un anticuerpo con el primer y segundo determinantes
antigénicos es indicativa de reactividad cruzada, identificando de esta manera los polipéptidos que tienen un
determinante antigénico de reactividad cruzada
- 15 2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el primer y segundo microorganismos son bacterias.
3. El procedimiento de la Reivindicación 2, en el que la bacteria es *H. parasuis*.
4. El procedimiento de la Reivindicación 3, en el que el primer microorganismo es *H. parasuis* serotipo 5, en el que el
segundo microorganismo es *H. parasuis* serotipo 13.
- 20 5. el procedimiento de la Reivindicación 3, en el que el primer y el segundo polipéptido son cada uno una proteína de
unión a hemo o un transportador tipo ABC.