

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 232**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

**C07K 14/285** (2006.01)

**C12R 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2011 PCT/EP2011/056495**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO2011131789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011 E 11715569 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2561063**

54 Título: **Una vacuna que comprende células inactivadas de bacterias Haemophilus parasuis de serotipo 5**

30 Prioridad:

**23.04.2010 EP 10160851**

**23.04.2010 US 327340 P**

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

**15.06.2017**

73 Titular/es:

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

**Wim De Körverstraat 35**

**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**WITVLIET, MAARTEN, HENDRIK;**

**HENSEN, SELMA, MARIANNE y**

**SEGBERS, RUUD, PHILIP, ANTOON, MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 617 232 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 que comprende células inactivadas de bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 5

5 La presente invención se refiere a una vacuna que comprende células inactivadas de bacterias *Haemophilus parasuis*.

10 *Haemophilus parasuis* es una bacteria patógena oportunista del tracto respiratorio superior de los cerdos. Es la causante de la enfermedad de Glässer, una afección que da como resultado una amplia diversidad de síntomas clínicos tales como artritis, pericarditis, pleuritis, poliserositis, meningitis y muerte aguda. La enfermedad de Glässer es principalmente un problema asociado con la lactancia de lechones. Sin embargo, con la prestación de nuevas tecnologías sanitarias, tales como el destete precoz segregado (DPS) y la aparición de nuevos patógenos, tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), la frecuencia de la enfermedad de Glässer ha aumentado. En primer lugar, los problemas con *Haemophilus parasuis* empeoran por infección del SRRP. Junto a esto, aunque las tecnologías del DPS han eliminado a *Haemophilus parasuis* de determinadas piaras, esto se ha convertido en un problema muy grave para compañías de cría de ganado: su objetivo es elevar el estado de salud de sus animales y en el proceso aumentar la susceptibilidad de ganado de reemplazo contra *Haemophilus parasuis*. La enfermedad aguda de Glässer se produce con frecuencia cuando en una granja infectada se introducen lechonas o verracos de reemplazo en un estado completamente sano. Por lo tanto, entre otras cosas, resulta de gran importancia inmunizar a animales no expuestos anteriormente antes de introducirlos en granjas infectadas. En términos generales, la obtención de protección contra *Haemophilus parasuis* mediante inmunización se ha vuelto cada vez más importante. Existen diferentes serotipos conocidos de *Haemophilus parasuis*, pudiendo cada uno de estos identificarse usando la técnica de inmunodifusión (Kielstein et al. in J. Clin. Microbiol. 30:862-865; 1992 and Rapp-Gabrielson et al. in AJVR 53:659-664; 1992).

25 Combinord® es una vacuna inactivada certificada (Intervet Dinamarca) para proteger (es decir, mitigar al menos un efecto negativo de un trastorno) a cerdas y a lechonas contra *Haemophilus parasuis* serotipo 5. También protege, de manera pasiva, a la descendencia contra el serotipo 5 mediante la ingesta de calostro. Sin embargo, no se ha certificado para la protección contra *Haemophilus parasuis* serotipo 4. De hecho, como generalmente se sabe para vacunas que protegen de manera activa contra *Haemophilus parasuis*, no hay protección cruzada del serotipo 5 frente al serotipo 4. Esto se sabe, por ejemplo, a partir de una publicación de Rapp-Gabrielson et al (Veterinary Medicine/January 1997/pág. 83-90). Rapp Gabrielson ha examinado diferencias en cuanto a virulencia e inmunogenicidad de cepas de *Haemophilus parasuis*, enfocadas a la protección y a la protección cruzada contra cepas que representan serotipos prevalentes, a saber, serotipos 5, 4, 13, 14, 2 y 12 respectivamente. De esta investigación pudieron extraerse diversas conclusiones. Lo más importante, se observó que *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 no proporcionaba protección contra la exposición al serotipo 4. Junto a esto, se observó que dentro del serotipo 4, se proporcionaba protección cruzada contra cepas heterólogas. Por tanto, la protección contra una cepa del serotipo 4 implicaba protección contra otras cepas del mismo serotipo 4.

40 Los hallazgos anteriores son coherentes con los hallazgos de Oliveira (Journal of Swine Health and Production, volumen 12, número 3, mayo y junio de 2004, pág.123-128. En este documento, se estableció que con una vacuna con *Haemophilus parasuis* inactivado hay una falta de protección cruzada entre serotipos diferentes, Bastante recientemente (21 de marzo del 2006), se concedió a Fort Dodge la autorización de comercialización en el Reino Unido de una vacuna con microorganismos inactivados contra *Haemophilus parasuis* de los serotipos 4 y 5 (Suvoxyn M.hyo - Parasuis). De hecho, la vacuna comprende tanto *Haemophilus parasuis* inactivados de serotipo 4 así como *Haemophilus parasuis* de serotipo 5. El RUMA (uso responsable de medicinas en la alianza agrícola) del Reino Unido ha publicado las directrices sobre el uso de vacunas y vacunación en la producción de cerdos en noviembre de 2006. Con respecto a la enfermedad de Glässer, estas directrices afirman que las vacunas comerciales se basan en cepas de las que hay poca o ninguna inmunidad cruzada contra otras.

50 Se observa que, a partir del documento WO 2008/085406, se sabe que una composición que comprende bacterias vivas modificadas de *Haemophilus parasuis* del serotipo 5, puede proporcionar protección contra el serotipo 4. Una desventaja de una composición viva cuando se compara con una composición inactivada es el riesgo de efectos secundarios debidos a la replicación de las bacterias en el animal sujeto.

55 La desventaja de las bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 conocidas hasta ahora es que las vacunas inactivadas basadas solamente en las mismas solo pueden proporcionar protección activa (mediante inmunización activa contra bacterias del mismo genotipo. Por tanto, para la protección activa contra los serotipos que son más prevalentes, es decir, los serotipos 4 y 5, ambos serotipos tienen que estar en la vacuna inactivada. Desde un punto de vista de seguridad esto es una desventaja (más bacterias presentes significa un mayor contenido de la vacuna de la endotoxina), pero también desde un punto de vista económico: la presencia de dos tipos de bacterias en la vacuna implica una mayor posibilidad de fracaso de lote y un mayor riesgo de contaminación. Por lo tanto, aumenta la posibilidad de que se encuentre un lote inadecuado para la venta. Es por lo tanto un objeto de la presente invención superar, o al menos mitigar, esta desventaja de las presentes bacterias de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5.

Para este fin, se ha descubierto que las bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 que expresan una o más proteínas de restricción (es decir, proteínas cuya expresión está regulada positivamente en las bacterias silvestres cuando crecen en condiciones de restricción de hierro), pueden proporcionar protección cruzada activa contra bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 5. Como se sabe habitualmente, una proteína cuya expresión está regulada positivamente cuando una bacteria crece en condiciones de restricción de hierro se puede regular positivamente proporcionando las condiciones de restricción de hierro reales (es decir, niveles bajos o nulos de hierro en el medio), pero también modificando genéticamente la bacteria, de forma que el gen que está regulado positivamente en las condiciones de restricción de hierro está regulado positivamente con independencia de la cantidad de hierro presente en el medio de cultivo. En cualquier caso, la presente invención se refiere a una nueva bacteria de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 que expresa al menos una proteína de restricción de hierro, que es la misma proteína cuya expresión se regula positivamente cuando se cultiva una bacteria de tipo salvaje *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 en condiciones de restricción de hierro. Las condiciones de restricción de hierro son condiciones en las que la cantidad de hierro disponible en el medio de cultivo influye negativamente sobre la tasa de crecimiento máxima obtenible de la bacteria en ese medio (es decir, sin otros cambios de los constituyentes del medio). Es decir, el aumento de la cantidad de hierro presente conducirá a un aumento de la tasa de crecimiento de la bacteria en ese medio. Por el contrario, en condiciones de repleción de hierro, la tasa de crecimiento de la bacteria es máxima. Por lo tanto, un aumento en la cantidad de hierro en el medio de cultivo no conducirá a un aumento en la tasa de crecimiento de la bacteria. Se observa que las condiciones de restricción de hierro pueden proporcionarse de varias maneras conocidas en la materia. Una opción es la adición de un agente a un medio de cultivo que contiene hierro en el que el agente queda al menos parte del hierro presente. Los quelantes de hierro conocidos son, por ejemplo,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -bipiridilo (también llamado "dipiridilo"), ácido nitrilotriacético, ácido dietilentriaminopentaacético, desferrioxamina, etc. De esta manera, dependiendo de la cantidad de quelante utilizada, se puede obtener cualquier concentración de hierro por debajo de un nivel repleto. Otros medios son, por ejemplo, pretratar un medio que contiene hierro para eliminar hierro mediante un intercambiador de iones, por ejemplo Chelex 100 (disponible en Biorad), o para obtener una concentración baja definida de hierro añadido a un medio (auto)ensamblado.

Para las bacterias de *Haemophilus parasuis* del serotipo 5, se encontró que, en condiciones de restricción de hierro, la bacteria expresa varias proteínas (que pueden ser proteínas libres o unidas, tales como glicoproteínas) a diferentes velocidades en comparación con el cultivo en condiciones de repleción de hierro. Al menos una proteína, que es muy claramente visible alrededor de 60 kDa en una transferencia Western cuando se cultiva una bacteria de tipo salvaje en condiciones de restricción de hierro, es sustancialmente menos expresada, o incluso no expresada en absoluto, cuando la bacteria se cultiva en condiciones de repleción de hierro. Se cree que la expresión de tales proteínas induce protección activa contra las bacterias *Haemophilus parasuis* de otros serotipos, en particular del serotipo 4. Dada la técnica anterior que, de manera específica y persistente, instruye acerca de que una vacuna que contiene células inactivadas de la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 no proporciona protección activa contra la bacteria *Haemophilus parasuis* de serotipo 4, esto podría no haberse esperado de manera razonable. Obsérvese que se pueden idear muchas realizaciones para obtener una vacuna usando la nueva bacteria de la presente invención. Por ejemplo, las bacterias inactivadas podrían introducirse en la vacuna como tales o podrían usarse para obtener derivados de las mismas para constituir una vacuna. A la vista de los derivados citados anteriormente, se conoce habitualmente, en particular para componentes asociados a la membrana externa, incluso más particularmente para proteínas específicamente o cada vez más expresadas en condiciones de restricción de hierro, que estas subunidades pueden contribuir en gran medida a la respuesta inmunológica eficaz del animal objetivo a la vacuna. Como tal, estos y otros derivados de la bacteria original podrían usarse en muchos casos como los únicos componentes de la vacuna. Como se conoce habitualmente, se pueden usar varios métodos conocidos en la técnica para obtener tales derivados en forma (sustancialmente) pura, por ejemplo, fabricándolos mediante una técnica recombinante, mediante síntesis del componente o mediante purificación del componente del caldo de fermentación. Se podrían usar una o más subunidades (preferentemente recombinantes) de la bacteria como el antígeno real para formular una vacuna. Tales subunidades podrían expresarse en organismos distintos de *Haemophilus parasuis*, por ejemplo en especies de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* o Apicomplexan, como medio de producción o como vector cuando se inmuniza a un animal.

Una vacuna en el sentido de la presente invención es una constitución adecuada para su aplicación a un animal, que comprende uno o más antígenos tales como microorganismos atenuados o muertos y/o derivados de los mismos en una cantidad inmunológicamente eficaz (es decir, capaz de estimular el sistema inmunológico del animal diana de manera suficiente para reducir al menos los efectos negativos de una exposición a microorganismos patógenos), normalmente combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido que contiene agua, que comprende opcionalmente agentes inmunoestimulantes (adyuvantes), que, al administrar al animal, induce una respuesta inmunológica para tratar una enfermedad o trastorno asociado con un microorganismo patógeno (a menudo de tipo salvaje), es decir, al menos, ayuda a prevenir, mejorar o curar la enfermedad o trastorno. Esto evita, o al menos disminuye, el nivel de infección o los signos clínicos de la enfermedad o trastorno en el animal diana y, en consecuencia, la gravedad de la enfermedad o trastorno. También se puede detener o disminuir la propagación de la enfermedad o trastorno en el medio ambiente.

Se observa que, a partir del documento WO 2009/118330, se sabe que los descendientes de cerdas o lechonas vacunadas con bacterias *Haemophilus parasuis* del serotipo están protegidos pasivamente contra *Haemophilus*

*Parasuis* del serotipo 4. Sin embargo, no hay ninguna prueba en este documento de que las cerdas vacunadas estén protegidas contra el serotipo 4. Por el contrario, de la técnica anterior (véase el artículo de Rapp-Gabrielson mencionado anteriormente) se sabe que este no es el caso. Por lo tanto, no es claro a partir de la referencia WO 2009/118330 que se pueda inducir protección activa contra bacterias del serotipo 4 en un animal diana mediante la inmunización de ese animal con bacterias *Haemophilus parasuis* del serotipo 5, cultivadas en condiciones de restricción de hierro. Dado el hecho de que en la técnica nadie ha explorado o ni siquiera sugerido la ruta de cultivo de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 en condiciones de restricción de hierro para inducir protección cruzada contra bacterias del serotipo 4, aunque esta ruta ha sido explorada para otras bacterias desde hace muchos años (véanse los documentos EP 749 321 y EP 389 347), está claro que esta ruta siempre se ha considerado sin éxito para *Haemophilus parasuis* por los especialistas en vacunas.

La vacuna comprende células inactivadas de la nueva bacteria *Haemophilus parasuis* de serotipo 5. Parece que una vacuna que comprende células inactivadas proporciona protección suficiente. La ventaja de un antígeno inactivo es la seguridad. La bacteria *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 pueden inactivarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como usando inactivadores químicos tales como beta-propiolactona, timerosal (u otro agente donante de mercurio), formaldehído, etc., aplicando métodos físicos tales como calor, luz UV, microondas, etc., usando métodos biológicos tales como métodos basados en enzimas para destruir a la bacteria y cualquier otro método aplicado normalmente en la técnica. Se sabe que usando tales métodos, partes de las células bacterianas pueden perder su asociación con las células. En particular, esto podría ser el caso con los componentes asociados a la membrana celular tales como la propia membrana externa o proteínas de la membrana externa.

En una realización, la vacuna comprende antígenos adicionales que corresponden a uno o más microorganismos del grupo que consiste en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella serovars*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, circovirus porcino y v virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP). En una realización específica, la vacuna comprende, junto a los antígenos de las bacterias of *Haemophilus parasuis* de acuerdo con la presente invención, antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, circovirus porcino y, opcionalmente, *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Esta vacuna podría obtenerse, por ejemplo, mezclando los antígenos de la bacteria *Haemophilus parasuis* (inmediatamente) antes de la administración con una vacuna que contiene antígenos de los otros patógenos. Con el fin de evitar que la última vacuna combinada comprenda demasiado diluyente, los antígenos de las bacterias *Haemophilus parasuis*, preferiblemente células inactivadas, deberían estar presentes en forma liofilizada. De esta manera, la mezcla no implica un aumento en la cantidad de diluyente.

También se describe una proteína aislada de la bacteria *Haemophilus parasuis* del serotipo 5, cultivada en condiciones de restricción de hierro, siendo la proteína visible en una transferencia Western cuando se hace reaccionar con suero de un animal convaleciente que se ha recuperado de una infección por bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 4, y no son visibles en una transferencia Western cuando se hacen reaccionar las bacterias *Haemophilus parasuis* del serotipo 5, que crecen bajo condiciones de repleción de hierro repleto, en las mismas condiciones. Esta proteína puede utilizarse, por ejemplo, en una prueba de diagnóstico para permitir la discriminación entre las bacterias *Haemophilus* cultivadas en condiciones de restricción de hierro y bacterias *Haemophilus* cultivadas en condiciones de repleción de hierro. Además, la proteína puede ser útil como antígeno en una vacuna para proteger contra las bacterias *Haemophilus paraseis*.

La invención se explicará mediante los siguientes ejemplos que pertenecen a una realización preferida de la presente invención.

La Figura 1 muestra un análisis del antígeno de la vacuna de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 producido en condiciones de cultivo de repleción de hierro (indicado como "+ Fe") y en condiciones de restricción de hierro (indicado como "-Fe") mediante SDS-PAGE.

La Figura 2 muestra un análisis del antígeno de la vacuna de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 producido en condiciones de cultivo de repleción de hierro (indicado como "+ Fe") y en condiciones de restricción de hierro (indicado como "-Fe") mediante transferencia de tipo Western.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Cultivos bacterianos**

Para la preparación de los antígenos vacunales, se utilizan existencias de glicerol de una cepa de *Haemophilus parasuis* de serotipo 4 y de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5. Para cada lote de antígeno de la vacuna, se descongela 1 ampolla de las existencias de glicerol y se añade a 100 ml de RPMI (medio de cultivo, disponible comercialmente de Invitrogen) + 10 g/l de extracto de levadura + 0,4 % v/v de NAD en un matraz de agitación de 500 ml y se cultivan a 100 rpm, 37 °C durante 16-24 horas. A continuación se subcultiva en 125 ml del mismo medio + 10 g/l de extracto de levadura + 0,4% v/v de NAD en un matraz de agitación de 500 ml a una velocidad de inoculación al 10 % v/v y se cultivan a 100 rpm, 37 °C durante 18-24 horas. Para cada lote de antígeno vacunal, se preparan 2-4 matraces de agitación con 125 ml de cultivo cada uno y se combinan al final del cultivo.

Para inducir condiciones de restricción de hierro, se añade dipiridilo 10 mM a una concentración final de 80 µM cuando el cultivo ha alcanzado una densidad óptica a 660 nm de 0,6. Para inactivar las bacterias, se agrega formalina a una concentración final de 0,6 % v/v, seguido de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Los cultivos inactivados se centrifugan durante 10 minutos a 13.000 g. El sobrenadante se desecha y los sedimentos de células bacterianas se resuspenden en PBS a 1/6 del volumen de cultivo original. Las suspensiones se usan como antígenos vacunales. Para poder formular las vacunas finales a iguales concentraciones de antígeno de la vacuna, se determina el contenido de nitrógeno total de estas suspensiones.

#### Análisis de los antígenos vacunales para la producción de proteínas con restricción de hierro

Los antígenos de la vacuna se analizan mediante técnicas de transferencia estándar, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), seguido de transferencia Western sobre una membrana de PVDF, en este caso de un lisado de células enteras (por ejemplo, también se podría usar un extracto de membrana externa). Se utiliza un antisuero de convalecencia derivado de un cerdo que ha sufrido una infección natural con el serotipo 4 de *Haemophilus parasuis* para sondear la membrana de PVDF. Más específicamente, se realizó SDS-PAGE usando un gel de Bis-Tris NuPage 10 % (1,0 mm) en condiciones reductoras con un tampón SDS MOPS/MES, a 200 V/125 mA durante 64 minutos. Para transferir el gel a una membrana de transferencia Immobilon P PVDF 0,45 µm (Millipore), se usó el método de transferencia Western semiseco de acuerdo con Towbin (Towbin, H, Staehlin, T. y Gordon, J. Proc. Nat. Acad. 76, 4350, 1979). La transferencia se bloqueó con 100 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2) y polvo lácteo al 1 % m/v durante una hora a 37 °C. La transferencia se lavó una vez con PBS 0,04 M y Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2) durante 30 segundos. Posteriormente, la transferencia se incubó durante una hora a 37 °C en 20 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,05 % y polvo de leche al 1 % que contenía una dilución de 125 veces del suero de cerdo, seguido de lavado tres veces durante cinco minutos con 100 ml 0,04 M de PBS que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2). A continuación, la transferencia se incubó durante una hora a 37 °C con 20 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,05 % y polvo de leche al 1 % y 1000 veces (IgG)-HRP, anti-cerdo de conejo diluida, seguido de lavado tres veces durante cinco minutos con 100 ml 0,04 M de PBS que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2). La transferencia se incubó en la solución de Vector SG de sustrato (kit de sustrato Vector SG para peroxidasa (Vector, SK-4700)) hasta que hubo suficiente desarrollo de color, es decir, una banda visible a simple vista alrededor de 60 kDa para la muestra de restricción de hierro. La reacción se detuvo lavando durante cinco minutos en agua destilada.

#### Formulación de vacuna

Los antígenos de la vacuna que se van a analizar en los cerdos (*Haemophilus parasuis* de serotipo 4 producido en condiciones de repleción de hierro y *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 producido bajo condiciones de restricción de hierro, estando esta última también indicada como bacterias "IRP") se diluyen en PBS hasta una concentración de nitrógeno total de 0,05 µg/ml y se mezclan 1:1 con un adyuvante basado en acetato de dl-α-tocoferilo (Diluvac Forte, disponible en Intervet/Schering-Plough Animal Health). En general, cualquier otra vacuna que comprende antígenos de *H. parasuis* de serotipo 5 producidos en condiciones de restricción de hierro puede formularse usando métodos conocidos en la técnica que comprenden básicamente la mezcla de antígenos adecuados de *H. parasuis* (vivos o inactivados, de células enteras, extracto fracción o subunidad purificada) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo un vehículo líquido tal como agua (opcionalmente tamponada) o un vehículo sólido tal como el utilizado habitualmente para obtener vacunas liofilizadas. Opcionalmente se añaden otras sustancias tales como adyuvantes, estabilizantes, modificadores de la viscosidad u otros componentes dependiendo del uso pretendido o de las propiedades requeridas de la vacuna.

#### Vacunación

Se utilizaron tres grupos de 10 lechones de una pira libre de *Haemophilus paraseis*. Dos vacunas (serotipo 4 de *Haemophilus parasuis* producido en condiciones de repleción de hierro y serotipo 5 de *Haemophilus parasuis* producido en condiciones de restricción de hierro) se administraron por vía intramuscular en una dosis de 2 ml a una y cuatro semanas de edad. Los 10 lechones restantes se utilizaron como grupo control negativo no vacunado. Uno de los lechones en el grupo de control negativo murió antes de la exposición a la infección.

#### Infección por exposición a *Haemophilus parasuis* de serotipo 4

Aproximadamente a las siete semanas de edad, los 29 lechones recibieron una infección por exposición. El compuesto de exposición es un aislado de campo (cepa viva) de *Haemophilus parasuis* de serotipo 4. El aislado se obtiene usando un método conocido de la referencia de Oliveira como se ha mencionado anteriormente en el presente documento. El cultivo de exposición se preparó poco antes de la exposición. *Haemophilus parasuis* se cultivó en placas de agar chocolate con NAD a 37 °C durante 24-72 horas. Las bacterias se recogieron con de 2 a 5 ml de medio CYS por placa y esto se usó para inocular medio CYS con NAD (de 2 a 5 ml por 100 ml de medio). A esto le siguió a 37 °C durante ± 5 horas. Después, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 2.000 g y el sedimento se resuspendió en PBS 0,04 M. Los materiales de exposición se conservaron en hielo hasta su uso, cuyo uso se realizó en 2 horas. Los lechones se expusieron a *Haemophilus parasuis* a través de aerosol en un compartimento para aerosol. Esto se realizó en grupos de 10 lechones cada uno. El aerosol se proporcionó

mediante un nebulizador de tipo Devilbis. La cantidad total de cultivo de exposición por grupo de 10 lechones fue de 50 ml. El cultivo de exposición contenía  $\pm 10^8$  ufc/ml. Se dejó a los lechones en el compartimento para aerosol durante aproximadamente 30 minutos.

- 5 Después de la exposición, se puntuaron diariamente la temperatura rectal, el estado general, anomalías en cuanto a locomoción, el sistema nervioso y otras anomalías, durante un periodo de 10 días.

El sistema de puntuación en cuanto al estado general fue el siguiente

- 10 0= normal  
1 = inapetente  
2= inapetente y deprimido  
3= deprimido y lento para levantarse  
4= moribundo.

- 15 El sistema de puntuación en cuanto a la locomoción fue el siguiente:

- 20 0= comportamiento normal  
1 = articulaciones inflamadas, ardientes o dolorosas  
2= cojera en una o más patas  
3 = incapacidad para apoyarse en el suelo  
4 = negativa a levantarse, incluso moribundo.

- 25 El sistema de puntuación en cuanto al sistema nervioso fue el siguiente:

- 30 0= comportamiento normal  
1 = cabeza inclinada  
2= pérdida de equilibrio  
4= convulsiones

- 35 El sistema de puntuación para otras anomalías fue el siguiente:

- 0= sin anomalías  
2= anomalías de menor importancia  
4= anomalía grave que requiere eutanasia.

- 40 De manera automática, cualquier lechón con una puntuación de 4 para la categoría de signo clínico que conducía a la decisión del criterio de valoración desde el punto de vista humano se sacrificó. La puntuación clínica total por lechón fue la suma de las puntuaciones clínicas diarias desde la exposición hasta la necropsia.

- Se realizó necropsia en todos los animales que murieron después de la exposición y se realizó la necropsia de los animales supervivientes a los 10 días de la exposición.

- 45 En el examen posmortem, las lesiones patológicas macroscópicas de la cavidad peritoneal, pleural y pericárdica y las articulaciones afectadas se puntuaron del siguiente modo:

- 0 = no se detectaron anomalías.  
1 = depósitos mínimos de fibrina y/o cantidad mínima de líquido transparente  
2 = serositis fibrinosa leve y/o leve acumulación de líquido claro/aumento de la sinovia  
3 = serositis fibrinosa moderada y/o acumulación moderada de líquido claro/aumento de la sinovia o signos leves de exudación purulenta.  
4 = serositis fibrinosa grave y/o acumulación intensa de líquido claro/aumento de la sinovia o signos moderados de exudación purulenta.

- 55 La puntuación post mortem total por lechón es la suma de la puntuación individual para cada cavidad (abdominal, pleural y pericárdica) y las articulaciones afectadas.

## **RESULTADOS**

- 60 La Figura 1 muestra un análisis del antígeno de la vacuna de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 producido en condiciones de cultivo de repleción de hierro (indicado como "+ Fe") y en condiciones de restricción de hierro (indicado como "-Fe") mediante SDS-PAGE. La Figura 2 muestra un análisis correspondiente mediante transferencia Western adicional. Mediante SDS-PAGE y transferencia Western se observan diferencias en la expresión de proteínas (indicadas por las flechas). Lo más notable es la reacción de anticuerpos en el suero del cerdo convaleciente a una banda de proteína con un peso molecular aparente de aproximadamente 60 kDa en el antígeno de vacuna cultivado en condiciones de restricción de hierro, transferido como se ha indicado anteriormente en el presente documento. En estas condiciones de transferencia no se observa ninguna banda en el antígeno de

vacuna cultivado en condiciones de depleción de hierro a 60 kDa (puede ser, sin embargo, que una banda vaga finalmente se hará visible cuando el desarrollo del color no se detiene en cuanto una banda transparente sea visible para la muestra de restricción de hierro). Esta proteína de 60 kDa no se observa cuando *Haemophilus parasuis* de serotipo 4 se cultiva en condiciones estándar (datos no mostrados).

5 La Tabla 1 muestra los efectos de la infección por *Haemophilus parasuis* de serotipo 4 en los dos grupos vacunados y en los controles no vacunados. Se observaron reducciones significativas de las puntuaciones de los signos clínicos, la mortalidad y posmortem en los animales inmunizados activamente con la vacuna de *Haemophilus parasuis* de tipo 4 o con la vacuna de *Haemophilus parasuis* de tipo 5 IRP en comparación con los lechones de control. La temperatura media después de la exposición (datos no mostrados) fue comparable para ambas vacunas y significativamente menor que la de los controles. Aunque la vacuna IRP de serotipo 5 parecía proporcionar una protección aún mejor que la vacuna de serotipo 4 frente a una exposición de serotipo 4, la diferencia entre los dos grupos de vacunas no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, puede concluirse que usando bacterias de *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 IRP para constituir una vacuna para cerdos, se les puede proteger al menos al mismo nivel contra una infección con *Haemophilus parasuis* de serotipo 4, en comparación con una situación en la que se usa la vacuna con *Haemophilus parasuis* de serotipo 4.

**Tabla 1.** Resultados de protección de los lechones

| Vacuna                               | N.º de lechones | Puntuación clínica media | Mortalidad [n/ntot] | Puntuación posmortem media |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>H. parasuis</i> de serotipo 4     | 10              | 14.2*                    | 2/10*               | 2.8*                       |
| <i>H. parasuis</i> de serotipo 5 IRP | 10              | 6.5*                     | 1 /10*              | 1.9*                       |
| Ninguno                              | 9               | 52.2                     | 7/9                 | 7.0                        |

\*: significativamente diferente de los controles (p <0,05, prueba U de Mann-Whitney para las puntuaciones y prueba exacta de Fischer para la tasa de mortalidad)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende células inactivadas de bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 5 obtenidas mediante cultivo en condiciones de restricción de hierro, o derivados de las mismas, expresando dichas bacterias una proteína cuya expresión se regula positivamente cuando la bacteria que expresa se cultiva en condiciones de restricción de hierro, visible en una transferencia Western cuando se hace reaccionar con suero de un animal convaleciente que se ha recuperado de una infección por bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 4, no siendo dicha proteína visible en una transferencia Western cuando las bacterias *Haemophilus parasuis* de tipo salvaje de serotipo 5 cultivadas en condiciones de repleción de hierro se hacen reaccionar en las mismas condiciones, de modo que la vacuna proporciona protección contra un trastorno que se origina de las bacterias *Haemophilus parasuis* de serotipo 4.
- 15 2. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la vacuna comprende antígenos adicionales que corresponden a uno o más microorganismos del grupo que consiste en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella serovars*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, circovirus porcino y virus SRRP.
- 20 3. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por que la vacuna comprende antígenos adicionales de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, circovirus porcino y, opcionalmente, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
- 25 4. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la vacuna se obtiene mezclando células inactivadas de la bacteria *Haemophilus parasuis*, opcionalmente en forma liofilizada, con una vacuna que contiene antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis* y circovirus porcino.



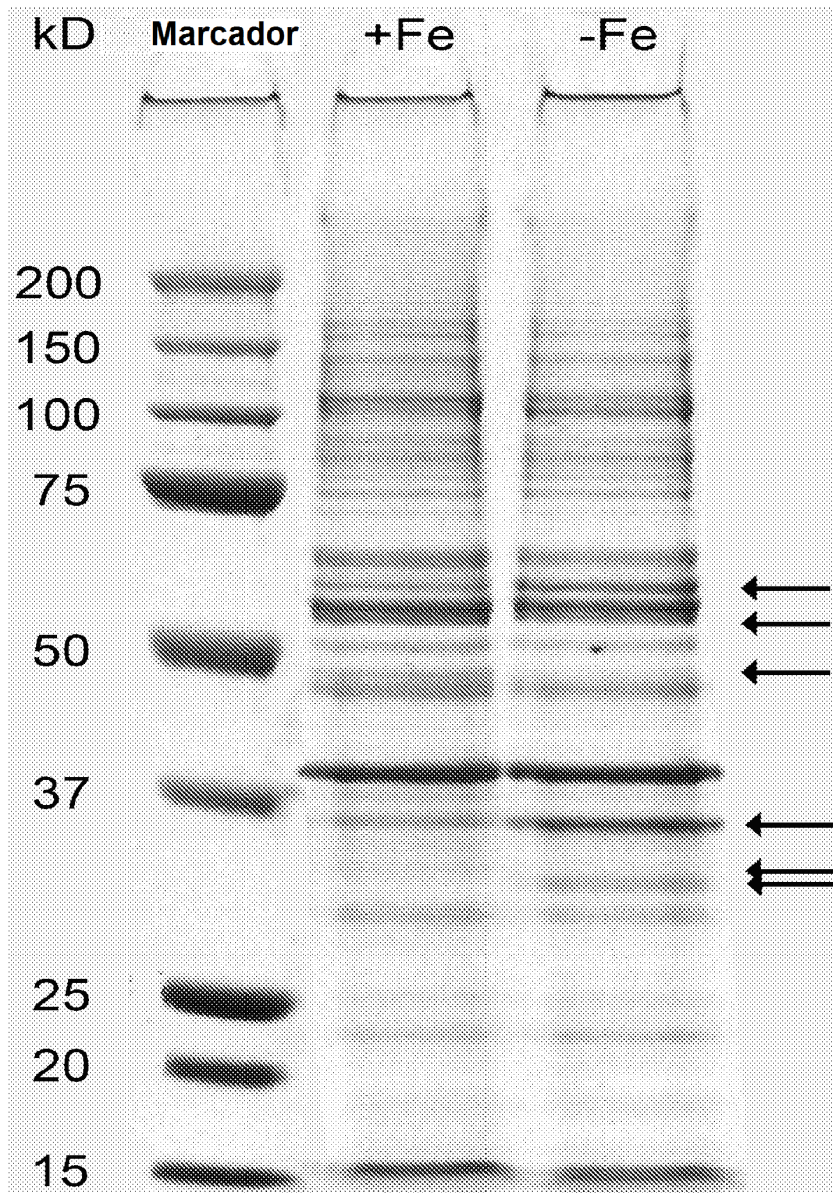


Figura 1

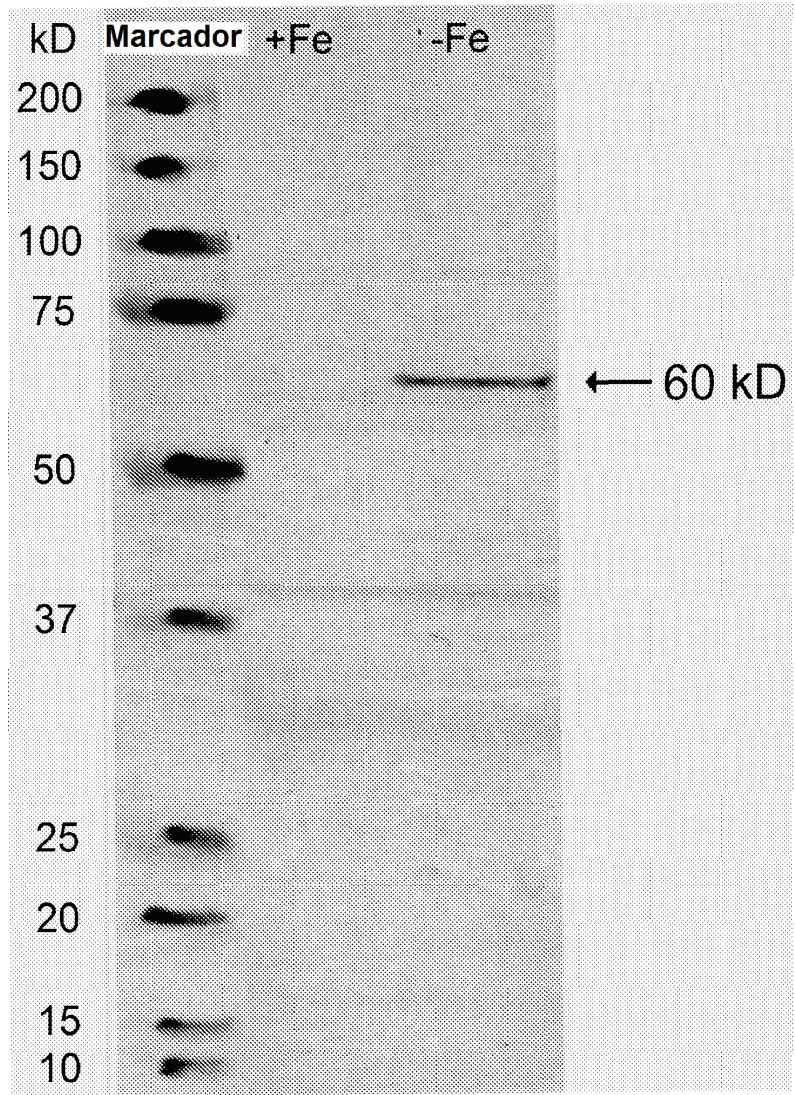


Figura 2