



No. 10-119116- 00009-0000

Fecha: 2013-05-30 16:17:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 88

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

P-2671

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **10.119.116**Solicitud de patente a nombre de **NOVARTIS AG.**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 A No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **NOVARTIS AG.**, domiciliada en Basilea, Suiza, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 240 notificado por fijación en lista el 22 de enero de 2013, relacionado con el concepto técnico, nos permitimos manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial de nuevo la memoria descriptiva, el nuevo capítulo reivindicatorio de 8 cláusulas, las figuras que acompañan la descripción y las secuencias completas de acuerdo con lo sugerido por el señor examinador. Se realizaron las siguientes principales modificaciones:

1.1 Reivindicaciones:

- Reivindicación 1: Modificada:

El término “molécula” se ha restringido a “polipéptidos y proteínas”; está soportado en múltiples ocasiones a lo largo de la memoria.

Las modificaciones introducidas en la redacción tienen la intención de mejorar la claridad, sin añadir materia nueva.

Se ha introducido el objeto de protección de la antigua reivindicación 2.

- Reivindicación 2: Eliminada. Su objeto de protección se ha incorporado a la Reiv 1.

- Reivindicaciones 3-5: Modificadas en la sintaxis para mejorar la claridad.

- Reivindicación 6: Modificada en la dependencia.

- Reivindicación 7: Modificada en la redacción para mejorar la claridad. Se ha añadido la expresión “cultivar in vitro dicha célula B.... de memoria”; está soportada en la Reivindicación 9.

- Reivindicación 8: Modificada en la redacción para mejorar la claridad.

1/8

- Reivindicación 9: Eliminada. Su objeto de protección se ha incorporado en la Reivindicación 7.
- Reivindicación 10: Modificada en la redacción para mejorar la claridad.
- Reivindicaciones 11-13: Eliminadas por estar excluidas de patentabilidad.

1.2 Memoria descriptiva y listado de secuencias:

- Se completó la lista de secuencias con las SEQ ID No. 6 a 18 y se retiraron las secuencias de aminoácidos que aparecían en la página 59 en la tabla 2 y las secuencias de nucleótidos que aparecían en la página 62 de la memoria descriptiva.

En este sentido, atentamente nos permitimos manifestar que las modificaciones anteriores no implican ampliación alguna de la materia objeto inicialmente presentada y se brindan con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el señor examinador. Adicionalmente, nos permitimos decir que no se presenta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio contiene un menor número de reivindicaciones (8) y corresponden a las mismas reivindicaciones originalmente presentadas y por las cuales ya se pagó la tasa.

2. No es una invención:

El señor Examinador excluye de patentabilidad las Reivindicaciones 10 y 11 por corresponder al aislamiento de secuencias de *Haemophilus parasuis*, y la Reivindicación 13 por ser un método de tratamiento.

En este sentido, el solicitante ha modificado el objeto de protección de la Reivindicación 10 de forma que resulte patentable según la Decisión 486. Las reivindicaciones 11 y 13 han sido eliminadas convenientemente.

3. Claridad

El señor Examinador objeta la Claridad de las reivindicaciones según el Art. 30 de la Decisión 486. En particular, la Reivindicación 1 y 7 no definen los anticuerpos, las determinantes antigénicas ni el enlace entre ellos. Los péptidos deben identificarse por su SEQ ID NO y los microorganismos por su número de cepa.

Se aporta anexo el listado de secuencias correspondiente para completar al listado de 5 secuencias presentado frente a la Oficina de Patentes.

Respecto a las definiciones de los anticuerpos, las determinantes antigénicas y el enlace entre ellos, el Solicitante hace constar que la estructura completa de los

anticuerpos no está disponible por no ser relevante para la invención. Se ruega que el Examinador tenga en cuenta que la caracterización de su actividad sí está definida. La descripción explica en el párrafo puente entre las páginas 24 y 25, y el Ejemplo 2, cómo se obtienen los sobrenadantes que contienen los anticuerpos. El resultado obtenido con dicho sobrenadante está además mostrado en las figuras.

Las secuencias de los determinantes antigénicos, que son los que determinan la invención, están recogidos en la descripción y descritos en la nueva Reivindicación 8.

La memoria descriptiva también describe los métodos utilizados para la unión de los anticuerpos a los determinantes antigénicos en las páginas 25-27. Los datos obtenidos de estos métodos se muestran en las Figuras 1-3 y están descritos también en el Ejemplo 2.

Respecto a la identificación de microorganismos, el Solicitante llama la atención a que los serotipos de *H. parasuis* son bien conocidos en el estado del arte tal como se ha reportado extensamente en los “Antecedentes de la Invención” de la presente descripción. Estos serotipos de *H. parasuis* no constituyen parte inventiva de la invención, e identificarlos supondría una cantidad de trabajo inabordable para un experto. Por tanto, el objeto inventivo está descrito de forma clara en la especificación y así se ruega que lo considere el Examinador.

En opinión del Solicitante, estos argumentos y las modificaciones presentadas resuelven y superan todas las objeciones planteadas por el señor Examinador y facultan su concesión de acuerdo a la Ley de Patentes.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por el señor examinador, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención ruego expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que mi mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
CC. 41.654.882
TP 20824 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

COMPOSICIONES, MÉTODOS, Y KITS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y
5 métodos para determinar moléculas inmunológicamente reactivas
cruzadas que comprenden una determinante antigénica de
reactividad cruzada, en particular para determinar proteínas
que comprenden determinantes antigénicas de reactividad
cruzada, en particular para determinar proteínas que tienen
10 reactividad cruzada con base en pantallas serológicas usando
pruebas inmunológicas secuenciales para un animal, incluyendo
determinar proteínas *H. parasuis* reactivas cruzadas. También
se proporcionan composiciones, vacunas, y kits usando las
moléculas para diagnósticos y métodos para prevenir o tratar
15 una enfermedad, trastorno, afección, o síntomas de la misma
asociados con agentes infecciosos, en particular
microorganismos infecciosos, en particular para prevenir y
tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de la
misma asociado con infección por *H. parasuis*.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El principio de la vacunación es esencialmente con base
en dos elementos clave de inmunidad, a saber especificidad y
memoria. La activación y diferenciación de células B en

respuesta a más antígenos requiere varias señales que llevan a las células B a formar ya sea células de plasma que secretan anticuerpos o células B de memoria preparadas para mediar una respuesta más rápida durante la exposición secundaria al antígeno. Las células de memoria permiten que el sistema inmunitario soporte una respuesta mucho más fuerte en el segundo encuentro con los antígenos. Esta respuesta secundaria es tanto más rápida para aparecer como más efectiva que la respuesta primaria. Sin embargo, debido a que los anticuerpos por naturaleza son muy específicos, y en vista de la diversidad de agentes infecciosos, todavía ha permanecido un problema importante en desarrollar anticuerpos que muestren reactividad cruzada a través de o dentro de los numerosos tipos diferentes de patógenos.

Un ejemplo de un agente infeccioso para el cual permanece un desafío importante para desarrollar anticuerpos que muestren reactividad cruzada es *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), el agente etiológico de poliserositis y artritis de porcino (enfermedad de Glasser). El *H. parasuis* es una bacteria pleomórfica, sin motilidad, ocasionalmente encapsulada, Gram negativa, aislada de exudados serosos de cerdo afectada por pleuritis serofibrinosa, pericarditis, peritonitis, artritis, y meningitis. Este organismo, que se describió inicialmente por Glässer en 1910, se aisló

probablemente por primera vez por Schermer y Ehrlich en 1922, aunque el organismo sospechoso se refirió originalmente como *Haemophilus suis*. En 1969, sin embargo, Biberstein y White muestran que el agente causante de Glässers requiere solamente dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD, por sus siglas en inglés). El *Haemophilus suis*, un organismo que requiere tanto porfirina de hierro como dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), no fue por lo tanto el carácter insidioso en esta enfermedad y el nuevo organismo se renombró, por la adición del prefijo "para", a *H. parasuis*.

La caracterización de *H. parasuis* ha evolucionado significativamente con el paso de cinco décadas. Bakos, et al., usaron una prueba de precipitación para identificar cuatro serotipos, que se designan A-D (*Nordic Veterinary Medicine*, 4:241-255 (1952)). Estos cuatro crecieron a siete en 1986 (*J Clin Microbiol*, 23:1022-1025 (1986)). Kielstein et al., *Zentralbl Veterinarmed B*, 38:315-320 (1991) agrega seis más, trabaja con Rapp-Gabrielson, *Am J Vet Res*, 53:659-664 (1992), aún otros cinco. Eventualmente, esta clasificación se refinó. Todos los serotipos, incluyendo los pocos con designaciones múltiples, se caracterizaron con base en una prueba de inmunodifusión realizada con sueros de conejo específicos. El resultado fue una lista de al menos quince serotipos que han sido aceptados a nivel mundial.

Desafortunadamente, también existe un número importante de aislados no tipificables. Adicionalmente, diversas publicaciones han descrito los perfiles de serotipo de *H. parasuis* en países específicos. Se ha propuesto que en los
5 EUA, Alemania, Japón, España, Canadá, y China, los serotipos 4 y 5 son completamente comunes. Los serotipos 5 y 13 se han reportado para ser prevalentes en Australia y Dinamarca.

Los factores de virulencia de *H. parasuis* no se han definido. La mayoría de las asociaciones para virulencia se
10 hacen de acuerdo con el serotipo, ya que algunas corresponden a tasas de morbilidad y mortalidad superiores. Durante la infección intraperitoneal, los serotipos 1, 5, 10, 12, 13, y 14 se han reportado para provocar tasas de morbilidad y mortalidad altas dentro de 4 días. Como tal, estas cepas se
15 consideran altamente virulentas. Tres serotipos (esto es, 2, 4, y 15) presentaron niveles intermedios de virulencia al provocar poliserositis sin mortalidad. Los serotipos restantes se consideran avirulentos ya que afectan cerdos sin manifestar la enfermedad clínica.

20 Se han hecho intentos por determinar factores de virulencia específicos de *H. parasuis*. Siendo un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, se pensó que algunos candidatos deben incluir cápsulas, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS, por sus siglas en inglés), y proteínas de membrana exteriores

(OMP, por sus siglas en inglés). En la actualidad, sin embargo, pocas correlaciones pueden establecerse entre estos rasgos en *H. parasuis* y virulencia. Las cepas encapsuladas son comunes tanto en las cavidades nasales de cerdos saludables como de animales manifestados clínicamente. La importancia de los LPS fue un tanto desacreditada por reportes que sugieren diferencia no importante en la producción de LPS entre serotipos virulentos y avirulentos y muestran que las presentaciones que contienen tanto LPS como OMP produjeron respuestas exclusivamente en las OMP.

Las OMP han demostrado generar una respuesta humoral fuerte y se han propuesto candidatos para inmunógenos protectores de esta categoría. Dos perfiles generales de OMP se presentan y pueden asociarse con virulencia. La mayoría de los serotipos virulentos se caracterizan por el segundo perfil, que está dominado por una proteína de 37 kDa. Los serotipos avirulentos muestran bandas múltiples, con banda fuerte entre 23-40 kDa, así como una proteína de aproximadamente 68 kDa.

Diversas otras proteínas asociadas con la infección por *H. parasuis* se han sugerido. Dos proteínas de colonización se han reportado, designadas P2 y P5, que son ambas inmunogénicas. P2, de manera sorprendente, aparece para diferir dependiendo de la virulencia de serotipo. Se presenta

dominantemente como una proteína de 55 kDa en serotipos avirulentos y 48 kDa en serotipos virulentos. Esta proteína muestra homología a la proteína P2 de *Haemophilus influenzae*. Otros han identificado y descrito la sobre regulación de la
5 región TonB del genoma de *H. parasuis*. Esta región contiene diversos genes que responden a ambientes agotados de hierro. Específicamente, una proteína enlazada a transferrina se identificó y mostró para estar sobrerregulada cuando el hierro se restringe. Ya que el hierro está secuestrado en el
10 hospedero, se ha propuesto que tales genes puedan ser importantes para la sobrevivencia del patógeno dentro del hospedero.

Adicionalmente, una proteína de membrana exterior principal de 42 kDa (MOMP, por sus siglas en inglés) se
15 detectó usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la MOMP de 35 kDa de *Pasturella multocida*. El análisis de una proteína de 42 kDa potencialmente similar de *Haemophilus ducreyi*, una especie cercanamente relacionada, caracteriza la proteína como antigénicamente similar a OmpA. Esta clase de
20 proteína de membrana modificable al calor se investigó además a través del desarrollo de anticuerpos monoclonales contra preparaciones de membrana de *H. parasuis*. Dos anticuerpos monoclonales se usaron en este experimento, uno contra una OMP de 35 kDa y un segundo contra LPS. Estos anticuerpos

monoclonales se reportaron para reaccionar específicamente con los serotipos comunes y se sugirió su valor potencial como herramientas de diagnóstico u objetivos de vacuna potenciales.

5 La neuraminidasa es otro factor de virulencia potencial. Más de 90% de los aislados de campo parecen producir neuraminidasa. Esta enzima se expresa después en la fase de crecimiento de *H. parasuis* y se correlaciona con tanto la exposición de receptores de colonización necesarios como el
10 rompimiento de mucina dentro del hospedero.

El *H. parasuis* puede infectar sitios múltiples del hospedero. Como un resultado, los signos clínicos se manifiestan diferentemente con base en el sitio de infección. Las cuatro formas primarias de infección son enfermedad de
15 Glässer (poliserositis fibrinosa), septicemia (sin poliserositis), miositis aguda (músculo masetero), y enfermedad respiratoria. Con respecto al sitio de infección o tipo de infección, los síntomas de infección por *H. parasuis* se han reportado para ser un tanto generales. La temperatura
20 incrementada, apatía, y pérdida de apetito se reportan comúnmente. Otros síntomas clínicos comunes se han reportado para incluir tos, disnea (falta de aliento), pérdida de peso, cojera, carencia de coordinación, cianosis, y agotamiento.

El *H. parasuis* se ha convertido en un tema principal

después de que las manadas libres de patógeno específico (SPF, por sus siglas en inglés) se vuelven prevalentes. En parte debido a la evolución del negocio de producción porcina, que incluye el establecimiento de manadas libres de patógenos específicos, *H. parasuis* ha aparecido como un patógeno económicamente importante. Típicamente, la infección se dirige a animales nativos, aquellos alojados con higiene inadecuada, o aquellos alimentados pobremente. Además, el transporte inseguro y la mezcla de cerdos de edades diferentes han contribuido significativamente a brotes. La combinación de las concentraciones superiores de animales y la ignorancia relativa de la población de cerdos en estas manadas protegidas se han reportado para llevar a un incremento en la incidencia de enfermedad inducida por *H. parasuis*. Para complicar más las cosas es el hecho de que *H. parasuis* existe en diversos serotipos regionalmente específicos diferentes. Se reportó que la exposición o vacunación a un serotipo no se protege necesariamente contra la infección por otros. Como tal, se propuso el desarrollo de vacuna autógena como un control contra la propagación del serotipo desconocido. Debido en parte a tales problemas y el retardo entre la generación y exposición de bacterina autógena a cerdos, surge una necesidad para una vacuna protectora cruzada que pueda administrarse con confianza con

respecto a la prevalencia del serotipo regional.

Se ha propuesto tratar la infección por *H. parasuis* con antibióticos para aplicación inmediata durante el desarrollo de signos clínicos. Desafortunadamente, la naturaleza con
5 penetración del patógeno requiere dosis altas de antibióticos para ser efectivas y a menudo es de prohibitivo en costo.

El control por medio de vacunación se ha intentado con tanto vacunas comerciales como autógenas. La diversidad de serotipos por *H. parasuis* ha complicado los regímenes de
10 vacunación, ya que la protección cruzada es rara. Combinado con las cepas no tipificables, esta plétora de perfiles antigénicos hace difícil el desarrollo de la vacuna.

La protección por vacunación contra estimulación homóloga también se ha propuesto. Un trío de estudios
15 sugieren que un producto de bacterina exterminada puede protegerse contra estimulación homóloga cuando se crea con serotipos y aislados de campo no tipificados conocidos. Los estudios arrojan luz en el uso de vacunas autógenas para controlar brotes para reducir las tasas de mortalidad.

20 Algunos habían propuesto usar cepas virulentas para proteger contra la estimulación heteróloga de otras cepas virulentas. Un estudio reporta una vacuna bivalente que contiene serotipos 4 y 5 protegidos contra serotipos 13 y 14. Otros, sin embargo, fallaron en mostrar protección cruzada

entre los serotipos 2 y 5.

Todavía otros han propuesto la exposición controlada de lechones a dosis bajas de *H. parasuis* virulento, vivo. Sin embargo, debido en parte a las co-infecciones que dañan con otros patógenos, tales como virus del síndrome respiratorio y reproductivo de porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), este enfoque no se ha recomendado como un método de control funcional.

Ya que los métodos actualmente disponibles para controlar varias infecciones que provocan la enfermedad se limitan en efectividad, en parte debido a la diversidad de agentes que provocan la enfermedad tal como *H. parasuis*, se necesitan métodos y composiciones efectivos para el tratamiento y prevención, particularmente una necesidad de identificar proteínas que tengan reactividad cruzada que pueda permitir el desarrollo de vacunas efectivas, en particular para tratamiento y prevención de la infección por *H. parasuis*.

20

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una

primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica. El al menos un anticuerpo se obtiene de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende una primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende una segunda determinante antigénica. El enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello determina la molécula.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde activar comprende estimular inmunológicamente al animal con la molécula para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria; y

b) poner en contacto al menos un anticuerpo con una segunda molécula, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

En otros aspectos, la presente invención proporciona un polipéptido aislado. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

5 ELANAI (SEQ ID NO: 1);
 TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);
 APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);
 MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y
 SPSDKTFKISAIPDYNAEEMT (SEQ ID NO: 5).

10 El polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

15 ELANAI (SEQ ID NO: 1);
 TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);
 APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);
 MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y
 SPSDKTFKISAIPDYNAEEMT (SEQ ID NO: 5),

20 en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada y se expresa por serotipo 5 de *H. parasuis*.

En un aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad profilácticamente o

terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, y un vehículo, portador, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

5	ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
	TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
	APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);
	MKNLISI	(SEQ ID NO: 4); y
	SPSDKTFKISAI PDYNA AEMT	(SEQ ID NO: 5).

El polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, afección, o síntoma de la misma asociado con la infección por *H. parasuis* de un animal. El método comprende administrar una cantidad efectiva de una vacuna que comprende una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, y un vehículo, portador, o excipiente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ELANAI (SEQ ID NO: 1);

TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);

APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);

MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y

SPSDKTFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5).

El polipéptido aislado comprende además una determinante
5 antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína
expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otros aspectos, se proporcionan composiciones,
métodos, y kits para diagnósticos de acuerdo con la presente
invención.

10 Las ventajas y beneficios de la presente invención serán
aparentes para alguien experimentado en la técnica que lee
ésta especificación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1 muestra un Western Blot para Selección
Inicial de Fluidos de la Glándula Bronquial (BL, por sus
siglas en inglés). Las muestras se corrieron por duplicado
con la excepción de la muestra 12. Las muestras 1-4 y 8-11
son pruebas contra serotipo 5 *H. parasuis* y las muestras 5-6
20 y 12-15 son pruebas contra serotipo 13 *H. parasuis*. 1: Suero
CDCD negativo, 2: BL46, 3: BL47, 4: BL50, 5: BL46, 6: BL47,
7: BL50, 8: BL96, 9: BL98, 10: BL99, 11: BL142, 12: BL96, 13:
BL98, 14: BL99, 15: BL142.

La Figura 2 muestra el Western Blot de serotipos 5, 13,

y 4 *H. parasuis* con BL47. Pistas 1,7-marcadores MW (de la parte superior: 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); Pista 3-serotipo 5 *H. parasuis*; Pista 5-serotipo 13 *H. parasuis*; Pista 9-serotipo 4 *H. parasuis*. Pistas 2, 4, 6, 8, 10-Vacía. Las flechas indican bandas prominentes de interés.

La Figura 3 muestra el Western Blot y SDS-PAGE de *H. parasuis* de célula completa serotipo 5, y *H. parasuis* serotipo 5 Extraído con Tween-20. Inmunotransferencia: Pista 1, 5-marcador MW (de la parte superior: 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); Pista 3-serotipo 5 de célula completa; Pista 7-extracto Tween-20 de serotipo 5, Pista 2, 4, 6-Vacía. SDS-PAGE: Pista 1, 5-marcador MW; Pista 3-serotipo 5 de célula completa; Pista 7-11-extracto Tween-20 de serotipo 5; Pista 2, 4, 6, 12 -Vacía.

Las Figuras 4A-4D muestra espectrometría de masa (EM/EM MALDI) de bandas que eliminan el gel correspondientes a Fig. 4A, ~76 kDa; Fig. 4B, ~63 kDa; Fig. 4C, ~56 kDa; y Fig. 4D, ~28 kDa.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los diversos aspectos y modalidades se proporcionan en virtud de la presente invención que comprenden la identificación de moléculas que pueden proporcionar anticuerpos de reactividad cruzada que reconocen moléculas

antigénicamente relacionadas, y que pueden de esta manera emplearse en vacunas, aplicaciones de diagnóstico, y métodos para tratar o prevenir un intervalo amplio de afecciones o enfermedad incluyendo aquellas asociadas con agentes infecciosos tales como, pero no limitadas a, bacterias, virus, etc. El enfoque novedoso descrito en la presente utiliza el hospedero para identificar moléculas reactivas cruzadas usando un modelo de estimulación inmunológica pasmada en el cual un hospedero se estimula secuencialmente, por ejemplo con un serotipo de *H. parasuis*, que permite recuperar, entonces la estimulación con un serotipo diferente.

I. Definiciones

El término "molécula," a menos que se establezca específicamente de otra manera, incluye polipéptidos y proteínas que incluyen por ejemplo, glicoproteínas y lipoproteínas, polisacáridos incluyendo 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.

El término "determinante antigénico," como se usa en la presente, se refiere a la estructura primaria, secundaria,

terciaria, o cuaternaria de una molécula (por ejemplo, un polipéptido) reconocido por células B (esto es, linfocitos B) y los anticuerpos secretados por células B.

El término "determinante antigénica reactiva cruzada," como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de una determinante antigénica presente en dos o más moléculas (por ejemplo, variantes de proteína bacterianas) para enlazarse por el mismo anticuerpo. Adicionalmente, se entiende que las dos o más moléculas que comprenden la determinante antigénica capaz de enlazarse por el mismo anticuerpo puede ser: la misma molécula o fragmentos de la misma, variantes de otras moléculas, o diferentes moléculas. A manera de ejemplo con referencia a proteínas (por ejemplo, variantes de proteína bacterianas) que comprenden una determinante antigénica capaz de enlazarse por el mismo anticuerpo, las proteínas pueden tener la misma o una secuencia de aminoácido primaria diferente, sin embargo, las proteínas cada una comprende una determinante antigénica (esto es, "de reactividad cruzada") que puede enlazarse por el mismo anticuerpo.

El término "anticuerpo de reactividad cruzada," como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo capaz de enlazarse a una determinante antigénica de reactividad cruzada.

El término "tratar," como se usa en la presente, se

refiere a aliviar, mejorar o remediar una enfermedad, trastorno, afección o síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección.

El término "prevenir" significa detener o dificultar una
5 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
10 método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica, en donde al menos un anticuerpo se obtiene de un
15 animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende la primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende la
20 segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello se determina la molécula.

En una modalidad, la primera composición inmunogénica

comprende además un primer polipéptido que comprende la primera determinante antigénica, en donde la segunda composición inmunogénica comprende además un segundo polipéptido que comprende la segunda determinante antigénica, en donde el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, en donde el primer y el segundo microorganismo se caracterizan en que son diferente serotipos de la misma especie. En otra modalidad, el primer y el segundo microorganismo es una bacteria. En algunas modalidades, la bacteria es *H. parasuis*.

Generalmente, el método involucra dos o más pruebas inmunológicas secuenciales para el animal incluyendo un tiempo de recuperación entre las estimulaciones. Luego, en un tiempo posterior a la última estimulación, al menos un anticuerpo se obtiene del animal, por ejemplo, al cosechar los ganglios linfáticos del animal y/u otro tejido rico en célula de memoria que comprende al menos un anticuerpo. Sin sujetarse a ninguna teoría particular, se considera que al cosechar ganglios linfáticos y/u otro tejido rico en célula de memoria, las células B de memoria generadas para la primera estimulación pueden recolectarse después de su activación en respuesta a una estimulación posterior. Las células B de memoria activadas son responsables para la

compensación de la primera determinante antigénica que produce la primera estimulación, y los anticuerpos producidos en respuesta a una estimulación posterior producida por la segunda determinante antigénica puede probarse para 5 determinar su reactividad cruzada con la primera y la segunda determinante antigénica por ello determina sus moléculas reactivas cruzadas respectivas.

Los animales adecuados para uso en el método incluyen, pero no se limitan a, cerdos (por ejemplo, puercos), bovinos, 10 ovinos, conejillos de indias, conejos, ratones, ratas, cabras, y caballos. En una modalidad, el animal es un animal privado de calostro derivado de la cesárea. En otra modalidad, el animal es un puerco. En algunas modalidades, el animal privado de calostro derivado de la cesárea es un 15 puerco privado de calostro derivado de la cesárea. En otras modalidades, el animal tiene al menos alrededor de 1 semana de edad, ilustrativamente, al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 semanas de edad.

El animal puede exponerse a la primera y la segunda 20 estimulación inmunológica en cualquier número de formas de manera que las células B de memoria se generan a la primera estimulación y se activan durante la estimulación posterior del animal con la segunda determinante antigénica. Preferiblemente, el antígeno está contenido en una

composición de estimulación. Por ejemplo, una primera composición de estimulación que comprende la primera determinante antigénica y una segunda composición de estimulación que comprende la segunda determinante antigénica
5 puede administrarse al animal por cualquier ruta adecuada de administración conocida en la técnica incluyendo, pero no limitada a, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, oral, y intranasal.

Otras maneras de exponerse a una estimulación también
10 dentro del alcance de la invención incluyen vacunaciones y exposición natural a un inmunógeno (por ejemplo, agente infeccioso). De esta manera, una estimulación inmunológica también puede incluir una estimulación producida por exposición natural del animal a una determinante antigénica,
15 tal como a través de la exposición del animal a un agente infectado (por ejemplo, bacterias, virus, parásito). De esta manera, por ejemplo, una primera estimulación inmunológica puede ser una estimulación producida por una infección natural del animal por una cepa de bacterias que pertenece a
20 un primer serotipo, que luego es seguido por una segunda estimulación que comprende administración intranasal de una segunda composición de estimulación que tiene un segundo serotipo (esto es, la segunda determinante antigénica) de la cepa.

Una composición de estimulación que comprende un antígeno, opcionalmente, puede comprender además una solución amortiguadora y/o comprender además otros componentes que ayudan a alcanzar la potencia de estimulación deseada y/o
5 minimizan afectaciones adversas para el animal que recibe la estimulación.

En una modalidad, la primera y la segunda composición de estimulación comprenden una solución amortiguadora de peptona o solución amortiguadora salina normal. En otra modalidad, la
10 primera y la segunda composición de estimulación comprenden una solución amortiguadora de peptona, en donde la primera composición de estimulación comprende además una primera bacteria, en donde la segunda composición de estimulación comprende una segunda bacteria, en donde la primera y la
15 segunda bacteria pertenecen a diferentes serotipos de la misma especie.

En una modalidad, la segunda estimulación se administra al animal al menos alrededor de 1 semana después de que la primera estimulación se administra al animal,
20 ilustrativamente, alrededor de 1 semana hasta alrededor de 1 año, alrededor de 2 semanas hasta alrededor de 10 meses, alrededor de 3 semanas hasta alrededor de 8 meses, alrededor de 1 mes hasta alrededor de 6 meses, y alrededor de 2 meses hasta alrededor de 4 meses después de la primera

estimulación.

De esta manera, la memoria inmunológica proporciona la base para la presente invención. En consecuencia, el método comprende además proporciona una muestra biológica del animal
5 después de la segunda estimulación inmunológica, en donde la muestra biológica comprende células de memoria que producen anticuerpo. La muestra biológica puede ser de cualquier tipo adecuado. La muestra biológica puede ser de los tejidos, órganos, sangre, linfa, o ganglios linfáticos del animal. La
10 muestra biológica también puede tomarse de un sitio infectado o un área de una lesión que puede formarse o un área cercana a un sitio infectado o lesión tal como en los ganglios linfáticos. Preferiblemente, la muestra biológica se obtiene al cosechar los ganglios linfáticos del animal y/u otro
15 tejido rico en células de memoria que proporcione células B de memoria.

Generalmente, la muestra biológica se toma del animal en un tiempo posterior a la segunda estimulación. Al momento que la muestra se toma puede variar dependiendo de un número de
20 factores incluyendo el animal, la composición de estimulación, cualquiera de las etapas contempladas posteriores a la muestra que se toma (por ejemplo, afecciones de cultivo posteriores), etc., y puede determinarse por experimentación de rutina. Preferiblemente, la muestra

biológica se toma del animal después de la segunda estimulación al momento cuando ha ocurrido la activación de la célula de memoria suficiente. En una modalidad, la muestra biológica se toma del animal a alrededor de 24 hrs después de la segunda estimulación, ilustrativamente, a alrededor de 1 día hasta alrededor de 14 días, alrededor de 2 días hasta alrededor de 12 días, alrededor de 4 días hasta alrededor de 10 días, y alrededor de 6 días hasta alrededor de 8 días después de la última estimulación.

Después de la eliminación de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpo que están presentes en la muestra biológica pueden procesarse además para obtener al menos un anticuerpo. En una modalidad, después de la eliminación de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpo que están presentes en la muestra biológica se cultivan in vitro. El cultivo in vitro de las células de memoria que producen anticuerpo puede realizarse con o sin etapas previas para separar sub-poblaciones de células. Las técnicas de cultivo se conocen en la técnica.

El sobrenadante del cultivo puede comprender anticuerpos secretados por las células de memoria durante el cultivo in vitro, por lo tanto, la cosecha de al menos un anticuerpo puede realizarse al cosechar el sobrenadante del medio de

cultivo. Los anticuerpos producidos por las células cultivadas también pueden liberarse de las células cultivadas, por ejemplo por lisis de las células B de memoria para liberar al menos un anticuerpo.

5 La producción y/o secreción *in vitro* de al menos un anticuerpo en el medio de cultivo por células de memoria activadas puede potenciarse al agregar reactivos al cultivo celular para promover la proliferación celular, y/o potenciar la producción y/o secreción del anticuerpo. Tales reactivos,
10 solos o en combinación, incluyen citoquinas tales como, pero no limitadas a, interleucinas, por ejemplo, IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, factores que estimulan la colonia, interferones, y cualquiera de otros factores que pueden mostrarse para tener un efecto potenciador en la activación de la célula B,
15 proliferación, y/o producción y/o secreción de anticuerpo. Por ejemplo, la activación celular puede incluir agregar un agente activado al medio de cultivo incluyendo, pero no limitado a, mitógenos y factores producidos por leucocitos, o sus equivalentes sintéticos o combinaciones de los mismos.
20 Opcionalmente, los agentes antimicrobianos se incluyen en el medio de cultivo.

El sobrenadante del cultivo celular que comprende al menos un anticuerpo puede usarse directamente para determinar el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda

determinante antigénica. En otras palabras, al menos un anticuerpo puede utilizarse simplemente en la forma del sobrenadante cosechado del medio de cultivo.

En otras modalidades, la muestra biológica puede
5 cosecharse del animal y los linfocitos B contenidos en el
inmortalizados y/o clonados. Los compañeros de fusión se
conocen en la técnica, que son capaces de inmortalizar
linfocitos B. Los métodos empleados para la fusión incluyen
combinar los linfocitos B con un compañero de fusión en la
10 presencia de un fusógeno, por ejemplo, un detergente no
iónico, durante tiempo suficiente para que la fusión ocurra,
seguido por selección de los hibridomas resultantes por medio
de los marcadores presentes en el compañero de fusión. Las
células luego pueden someterse a dilución limitada para
15 proporcionar los clones libres de células contaminantes, por
ello se proporcionan para una composición de anticuerpo
homogénea. Los hibridomas luego pueden proliferarse en el
cultivo o introducirse en un animal hospedero, por ejemplo,
un ratón o una rata, para producir fluido de ascitos rico en
20 anticuerpos.

Si se desea, el al menos un anticuerpo puede someterse a
esquemas de purificación y/o fraccionamiento. Por ejemplo,
las técnicas pueden utilizarse tales como aquellas usadas
para purificar inmunoglobulinas de suero o plasma, por

ejemplo absorción, precipitación con sulfato de amonio, fraccionamiento con ácido caprílico, cromatografía de intercambio de iones, o por enlace y elución de proteína G o proteína A inmovilizada. También, dependiendo del sistema o aplicación particular, al menos un anticuerpo también puede acoplarse a un soporte adecuado, por ejemplo, un soporte de cromatografía de afinidad.

De esta manera, por ejemplo, una solución que comprende al menos un anticuerpo también puede contener al menos un anticuerpo no específico no buscado, que puede ser no deseado durante la etapa de poner en contacto al menos un anticuerpo con la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica. De esta manera, si se desea, el anticuerpo no buscado puede removerse de la solución por absorción de la solución que comprende al menos un anticuerpo con varios reactivos incluyendo, por ejemplo, yema de huevo, polvo de tejido, suspensiones de microorganismos, etc. El suero pre-inmune recolectado del animal también puede usarse para absorción. Ilustrativamente, a manera de otro ejemplo, una solución que comprende al menos un anticuerpo producido en respuesta a una estimulación con una especie de bacterias puede incubarse con, por ejemplo una suspensión celular bacteriana extraída del detergente de otra especie, luego centrifugar y recolectar el sobrenadante que comprende al

menos un anticuerpo. La absorción puede preformarse más de una vez para minimizar el enlace no específico debido a anticuerpos irrelevantes.

De acuerdo con la presente invención, el método para
5 determinar una molécula que comprende una determinante
antigénica de reactividad cruzada comprende poner en contacto
al menos un anticuerpo con una primera determinante
antigénica y una segunda determinante antigénica. El enlace
de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda
10 determinante antigénica determina la molécula. Poner en
contacto puede realizarse utilizando una técnica, o
combinación de técnicas, conocidas en el arte. En una
modalidad, el método comprende además determinar si o no al
menos un anticuerpo enlaza a la primera determinante
15 antigénica y a la segunda determinante antigénica. Las
técnicas ejemplares que pueden utilizarse, solas o en
combinación, incluyen, sin limitación, técnica Western blot,
inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, inmunoensayo ligado a
la enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), y ensayo
20 fluorescente inmunitario. Tales técnicas se prefieren
particularmente donde la molécula que comprende la
determinante antigénica es una proteína. En una modalidad,
poner en contacto comprende utilizar una técnica Western blot
para determinar el enlace de al menos un anticuerpo a la

primera determinante antigénica y a la segunda determinante antigénica, en donde una primera y una segunda proteína comprende la primera y la segunda determinante antigénica, respectivamente.

5 Por ejemplo, en donde la molécula a determinarse es una proteína, una primera composición que comprende una primera proteína que tiene la primera determinante antigénica y una segunda composición que comprende una segunda proteína que tiene la segunda determinante antigénica puede cada una
10 mezclarse separadamente con una solución amortiguadora estándar y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato de dodecil sodio (SDS/PAGE, por sus siglas en inglés), luego transferirse a nitro-celulosa, nylon, u otras membranas antes de poner en contacto al menos
15 un anticuerpo con la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica. El enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante antigénica y a la segunda determinante antigénica luego puede visualizarse, por ejemplo al agregar un anticuerpo secundario, que puede
20 etiquetarse y seleccionarse de acuerdo con la fuente (esto es, el animal) de al menos un anticuerpo. Luego, el análisis comparativo de bandas detectables que corresponde a la primera y la segunda proteína puede realizarse para detectar el enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante

antigénica y a la segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica indica que al menos un anticuerpo es de reactividad cruzada con la primera y la segunda determinante antigénica. En consecuencia, las primeras y las segundas determinantes antigénicas son de reactividad cruzada por ello determinan las moléculas (esto es, las proteínas), que pueden caracterizarse además utilizando técnicas conocidas en el arte.

10 A manera de ejemplo, donde la determinante antigénica de reactividad cruzada se crea por una proteína, un número de técnicas se conocen en el arte para caracterización adicional de la proteína determinada que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada. Por ejemplo, después de
15 SDS/PAGE o transferencia de gel a una membrana, una región del gel o la membrana correspondiente a la proteína puede eliminarse o eluirse del gel o membrana, y al menos parcialmente purificarse por análisis adicional usando técnicas conocidas incluyendo espectroscopia de masa y
20 procesamiento por secuencia de aminoácido de terminal N (por ejemplo, degradación Edman). Adicionalmente, la información de la secuencia de aminoácido puede compararse con cualquiera de las secuencias de aminoácido conocidas (por ejemplo, por comparación de homología) para determinar y/o caracterizar

además la identidad de la proteína. Adicionalmente, la información de la secuencia de aminoácido puede utilizarse para deducir una información de la secuencia de ácido nucleico correspondiente, que puede proporcionar, entre otras cosas, cebadores y sondas para propósitos de clonación y/o 5 amplificación de ácido nucleico específicos. De esta manera, en otras modalidades, el método comprende además determinar la secuencia de aminoácido de al menos una porción de la molécula, en donde la molécula es una proteína.

10 En consecuencia, en algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para determinar una proteína que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una primera determinante antigénica y una 15 segunda determinante antigénica, en donde al menos un anticuerpo se obtiene de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende la primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación 20 inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende la segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello se determina la proteína. Poner

en contacto es como se describe arriba.

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

En consecuencia, en otras modalidades, la presente
10 invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde activar comprende
15 estimular inmunológicamente el animal con una segunda molécula para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria; y

b) poner en contacto al menos un anticuerpo con la molécula y la segunda molécula, en donde el enlace de al
20 menos un anticuerpo a la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

III. Molécula Aislada

En otros aspectos, la presente invención proporciona una

molécula aislada, o un fragmento de la misma, que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. En una modalidad, la molécula aislada es una proteína. En otra modalidad, la determinante antigénica de reactividad cruzada está presente en una proteína expresada en al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

10	ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
	TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
	APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);
	MKNLISI	(SEQ ID NO: 4); y
	SPSDKTFKISAIIPDYNAAEMT	(SEQ ID NO: 5),

15 en donde el polipéptido aislado comprende además una
determinante antigénica de reactividad cruzada presente en
una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H.*
parasuis.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);

MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y

SPSDKTFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5),

en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada y se expresa
5 por el serotipo 5 de *H. parasuis*.

Las comparación de las secuencias de aminoácido de las SEQ ID NO: 1-5 con varios segmentos de secuencias de aminoácido *H. parasuis* sometidos a GENBANK revela al menos las siguientes homologías: SEQ ID NO: 1 y No. de Acceso:
10 ZP_02478744; SEQ ID NO: 2 y No. de Acceso: ZP_02477919; SEQ ID NO: 3 y No. de Acceso: ZP_02478157; SEQ ID NO: 4 y No. de Acceso: ZP_02478801; y SEQ ID NO: 5 y No. de Acceso: ZP_02477404. Nos. de Acceso: ZP_02478744, ZP_02477919, ZP_02478157, ZP_02478801, y ZP 02477404 se incorporan en la
15 presente con referencia en su totalidad.

IV. Composiciones, Vacunas, Diagnósticos, y Kits

En varios otros aspectos de la presente invención existen métodos, composiciones, y kits proporcionados con
20 base en la molécula determinada que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada. Preferiblemente, la molécula determinada es una proteína expresada por un patógeno que provoca la enfermedad. El patógeno que provoca la enfermedad es preferiblemente una bacteria,

preferiblemente, *H. parasuis*, sin embargo, la invención no se restringe a ella y la descripción siguiente se ilustra meramente con referencia a *H. parasuis* y las proteínas y polipéptidos *H. parasuis* de la presente invención.

5

Vacunas para Inmunización Activa

En un aspecto, la presente invención proporciona vacunas para inmunización activa diseñadas para tratar o proteger contra la infección por *H. parasuis*, y estas vacunas pueden prepararse de la proteína *H. parasuis*, o un fragmento de las mismas, que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establecen arriba usando métodos de preparación de vacuna convencional bien conocidos en este campo. Típicamente, una cantidad inmunogénica de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada se combina con un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado, y una cantidad de esta vacuna efectiva para inmunizar un humano o animal puede administrarse como sea apropiado. Por cantidad inmunogénica debe entenderse por alguien de experiencia ordinaria en esta técnica que esto se refiere a una cantidad de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada que es suficiente para alcanzar una respuesta inmunogénica en el

10

15

20

humano o animal.

Los polipéptidos deseados que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada que sirven como los ingredientes activos de las vacunas de la invención pueden prepararse, dependiendo de su tamaño, por cualquiera de un número de enfoques conocidos en la técnica.

Por ejemplo, si la secuencia de polipéptido deseada es relativamente corta, por ejemplo, que corresponde a la secuencia de aminoácido consiste esencialmente de la determinante antigénica de reactividad cruzada, es posible la síntesis química, usando métodos ahora estándares en la técnica. En un procedimiento típico, el aminoácido de terminal C puede enlazarse a un soporte sólido, y hacerse reaccionar con el siguiente aminoácido en la secuencia que se ha protegido al grupo amino para prevenir la autocondensación. Después del acoplamiento inicial, el grupo protector NH_2 puede removerse, y el proceso de acoplamiento repetido con el aminoácido sigue en orden.

O, por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse por purificación de la proteína nativa de, por ejemplo cultivos fermentadores, seguido por la generación del fragmento deseado por varias técnicas, y purificación del fragmento deseado. La metodología del ADN recombinante proporciona otra forma de sintetizar los

péptidos deseados. La secuencia que codifica el ADN (por ejemplo, cADN, digestión genómica) para que el péptido o proteína deseada pueda ligarse en un vector de expresión adecuado para transformar una cepa receptor para expresar el
5 gen y producir el polipéptido.

Si se deriva de una colección genómica o cADN, o por síntesis de oligonucleótidos usando métodos químicos, la secuencia de codificación puede colocarse bajo el control de secuencias promotoras compatibles con hospederos bacterianos
10 en plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia de codificación deseada. Los vectores de expresión resultantes pueden transformarse en hospederos bacterianos adecuados usando el método conocido en la técnica. Los transformantes exitosos pueden producir los
15 fragmentos de polipéptido deseados en niveles superiores que aquellos encontrados en cepas recombinantes o nativos. Alternativamente, estos péptidos pueden producirse en hospederos recombinantes no bacterianos usando secuencias de control apropiadas, vectores y técnicas de transformación.

20 Donde las secuencias de péptido que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada se determinan para ser demasiado pequeñas para ser inmunogénicas, pueden ligarse a sustancias portadoras con objeto de conferir una propiedad inmunogénica a ellas. Cualquier método para crear

tales ligaduras conocidas en la técnica puede usarse. Por ejemplo, existen un gran número de agentes heterobifuncionales que generan una ligadura de disulfuro en un extremo del grupo funcional y una ligadura de péptido al otro, y estos se han usado extensivamente. El más popular de estos es N-succidimidil-3-(2-piridilditio)proprionato (SPDP, por sus siglas en inglés). Este reactivo crea una ligadura de disulfuro entre sí mismo y un residuo de cisteína en una proteína y una ligadura de amida a través del amino en una lisina, u otro grupo amino libre en la otra. Una variedad de tales agentes que forman el disulfuro/amida se conocen. Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en vez de una ligadura de disulfuro. Muchos de estos agentes que forman tioéter están comercialmente disponibles e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxílico y los similares. Los grupos carboxilo pueden activarse al combinarlos con succinimida o ácido 1-hidroxí-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio. Si el péptido no contiene cisteína conveniente, un residuo de cisteína adicional en cualquier terminal puede agregarse cuando el péptido se prepara. Ya que típicamente solo péptidos más cortos requieren conjugación para el portador, estos residuos pueden incluirse convencionalmente durante

síntesis química.

La preparación de vacunas que contienen secuencias de péptido como ingredientes activos se entienden bien en la técnica. Típicamente, tales vacunas se preparan como
5 inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección también pueden prepararse. La preparación también puede emulsificarse. El ingrediente inmunogénico activo a menudo se mezcla con excipientes que
10 son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución amortiguadora salina, dextrosa, glicerol, etanol, o los similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener
15 cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agente amortiguadores del pH, o adyuvantes que potencian la efectividad de la vacuna. Las vacunas convencionalmente se administran parenteralmente, por inyección, por ejemplo, ya sea
20 subcutáneamente o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo,

polialcalen glicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0.5% hasta 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes
5 normalmente empleadas como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, esterato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y los similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones
10 de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

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

Las vacunas pueden administrarse en una manera

compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad como será profilácticamente o terapéuticamente efectiva e inmunogénica. La cantidad a administrarse puede depender del sujeto a tratarse, capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrarse pueden depender del juicio del cuidador/médico. Los intervalos de dosificación adecuados para inyección subcutánea o muscular pueden ser alrededor de 1 μ g hasta alrededor de 10 mg de ingrediente activo por sujeto, por ejemplo. Para preparación oral, supositorio rectal, uretral o vaginal, las dosificaciones pueden estar en el intervalo, ilustrativamente, desde alrededor de 10 μ g hasta alrededor de 100 mg. Los regímenes adecuados para administración inicial y refuerzos también son variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida en alrededor de una hasta alrededor de dos intervalos de semana por una inyección posterior u otra administración.

20

Anticuerpos

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos aislados que pueden generarse de una proteína, o un fragmento de los mismos, que comprenden la determinante

antigénica de reactividad cruzada para ser capaces de reconocer la determinante antigénica de reactividad cruzada, en donde la proteína se expresa por *H. parasuis*. Estos anticuerpos pueden ser ya sea monoclonales o policlonales. Si
5 los anticuerpos policlonales se desean, estos pueden generarse en cualquiera de un número de formas convencionales conocidas en la técnica. Típicamente, la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada puede inyectarse en un
10 animal hospedero adecuado, por ejemplo, un ratón o conejo, y después de un periodo de tiempo adecuado, los anticuerpos pueden aislarse y recuperarse del animal hospedero. Con respecto a los anticuerpos monoclonales, de acuerdo con la presente invención, estos pueden producirse en cualquier
15 número de formas incluyendo, por ejemplo, por el método bien conocido de Kohler y Milstein, Nature 256:495497 (1975), o tales como aquellos métodos descritos en la Patente de E.U.A. Nos. 6,331,415, 5,981,216, 5,807,715, y 4,816,567, que se incorporan en la presente como referencia por su enseñanza de
20 anticuerpos monoclonales. Tales métodos se conocen en la técnica e incluyen preparar anticuerpos quiméricos, humanizados, y monoclonales humanos. Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse de una cadena sencilla, tal como las cadenas ligera o pesada, y además

también pueden prepararse de fragmentos activos de un anticuerpo que mantiene las características enlazadas (por ejemplo, reactividad cruzada, especificidad, y/o afinidad) del anticuerpo completo. Por fragmentos activos significa un
5 fragmento de anticuerpo que tiene la misma especificidad de enlace como un anticuerpo completo que enlaza a la determinante antigénica de reactividad cruzada particular de los diferentes serotipos de *H. parasuis*, y el término "anticuerpo" como se usa en la presente significa incluir los
10 fragmentos. Adicionalmente, el antisuero preparado usando anticuerpos monoclonales o policlonales de acuerdo con la invención también se contempla y puede prepararse en un número de formas adecuadas como deberá reconocerse por alguien experimentado en la técnica.

15 Aunque la producción de anticuerpos usando formas recombinantes de la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada se prefiere, los anticuerpos pueden generarse de versiones purificadas y aisladas naturales de la proteína, o
20 un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada, y los anticuerpos monoclonales o policlonales pueden generarse usando la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada en la misma

manera como se describe arriba para obtener tales anticuerpos.

Inmunización Pasiva

5 Además de activar vacunas en donde los anticuerpos se generan en el paciente en virtud de administración de una cantidad inmunogénica de la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada, los anticuerpos aislados de la presente
10 invención, o fragmentos activos de los mismos, también pueden utilizarse en el desarrollo de composiciones farmacéuticas y/o vacunas para inmunización pasiva contra infección por *H. parasuis*.

 Alguien experimentado en la técnica reconocerá que los
15 anticuerpos de la presente invención (esto es, anticuerpos capaces de reconocer la determinante antigénica de reactividad cruzada) también pueden formarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un humano o animal con objeto de tratar o prevenir una infección
20 provocada por bacterias de *H. parasuis*. Las composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos efectivos de los mismos, pueden formularse en combinación con cualquier vehículo, excipiente o portador farmacéuticamente adecuado que deberá comúnmente

usarse en esta técnica, incluyendo solución amortiguadora salina, dextrosa, agua, glicerol, etanol, otros compuestos terapéuticos, y combinaciones de los mismos. Como un experimentado en esta técnica deberá reconocer, el vehículo, excipiente o portador particular usado variará dependiendo del receptor pretendido y la afección del receptor, y una variedad de modos de administración deberá ser adecuada para las composiciones de la invención, como deberá reconocerse por alguien de experiencia ordinaria en esta técnica. Los métodos adecuados para administrar una composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, administración tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal y intradérmica.

Para administración tópica, la composición puede formularse en la forma de un ungüento, crema, gel, loción, gotas (tales como gotas de ojos y gotas de oídos), o solución (tal como lavado bucal). Las vendas para heridas o quirúrgicas, suturas y aerosoles pueden impregnarse con la composición. La composición puede contener aditivos convencionales, tales como conservadores, solventes para promover la penetración, y emolientes. Las formulaciones tópicas también pueden contener portadores convencionales tales como bases de crema o ungüento, etanol, o alcohol oléico.

Las composiciones de anticuerpo de la presente invención también pueden administrarse con un adyuvante apropiado en una cantidad efectiva para aumentar la respuesta inmunogénica. Por ejemplo, los adyuvantes apropiados pueden
5 incluir alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), que se usa ampliamente en humanos, y otros adyuvantes tales como saponina y su componente purificado Quil A, adyuvante completo de Freund, adyuvante RIBBI, y otros adyuvantes usados en investigación y aplicaciones
10 veterinarias. Los ejemplos de otras preparaciones químicamente definidas incluyen dipéptido de muramilo, lípido A monofosforilo, conjugados de fosfolípido, encapsulación del conjugado con una proteoliposoma, y encapsulación de la proteína en vesículas de lípido.

15 Las composiciones de anticuerpo de la presente invención que reconocen la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establece arriba será útil en métodos para prevenir o tratar infección por *H. parasuis*. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para
20 prevenir o tratar una infección por *H. parasuis*, el método comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo para la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establece en la presente de manera que se trata o previene una infección por *H. parasuis*.

Generalmente, la dosis preferida para administración de una composición de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es tal cantidad que será efectiva para prevenir o tratar una infección por *H. parasuis*, y fácilmente se reconocería que esta cantidad puede variar dependiente de la naturaleza de la infección y la afección del sujeto. Una "cantidad efectiva" de anticuerpo o agente farmacéutico para usarse de acuerdo con la invención se pretende que signifique una cantidad suficiente pero no tóxica del agente, de tal manera que se produce el efecto profiláctico o terapéutico deseado. La cantidad exacta del anticuerpo o un agente particular que se requiere variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y afección general del sujeto, la severidad de la afección a tratarse, el portador o adyuvante particular a usarse y su modo de administración, y similares. En consecuencia, la "cantidad efectiva" de cualquier composición de anticuerpo particular variará con base en las circunstancias particulares, y una cantidad efectiva apropiada puede determinarse en cada caso de aplicación por alguien de experiencia ordinaria en la técnica usando experimentación de rutina. La dosis puede ajustarse para adaptarse al sujeto individual al cual la composición se administra y variará con la edad, peso y metabolismo del individuo. Las composiciones también pueden contener

estabilizadores o conservadores farmacéuticamente aceptables.

En consecuencia, los anticuerpos de la presente invención de esta manera proporcionarán métodos para tratar o prevenir infección por *H. parasuis* en un humano o animal
5 cuando se administra una cantidad efectiva de la composición de anticuerpo al humano o al animal, en donde la cantidad efectiva es suficiente para ya sea prevenir o tratar infección por la bacteria. Como se reconocería por alguien de experiencia ordinaria en la técnica, el nivel de titulación
10 del anticuerpo necesario para ser efectivo para tratar o prevenir la infección variará dependiendo de la naturaleza y afección del sujeto, y/o la severidad de cualquier infección previamente existente.

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención
15 pueden modificarse para ser menos inmunogénico cuando se administra. A manera de ejemplo con referencia a un receptor humano del anticuerpo, el anticuerpo puede ser "humanizado" al trasplantar las regiones complementariamente determinantes del anticuerpo derivado de hibridoma en un anticuerpo
20 monoclonal humano o "venerado" al cambiar la superficie expuesta de residuos de estructura de murino en las regiones variables de inmunoglobulina para imitar una contraparte de estructura humana homóloga. Aún además, cuando así se desea, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden

administrarse en conjunto con un antibiótico apropiado para aumentar además la capacidad de las composiciones para combatir infecciones bacterianas como sea necesario.

De esta manera, de acuerdo con la presente invención, la
5 proteína, o fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada puede utilizarse como vacunas activas, y los anticuerpos de la invención pueden ser usados como vacunas pasivas útiles para proporcionar anticuerpos apropiados para tratar o prevenir
10 una infección por *H. parasuis*. Como se reconocería por alguien experto en la técnica, una vacuna puede empacarse para administración en un número de formas apropiadas, tales como por administración parenteral (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración
15 por nasofaringe (por ejemplo, intranasal). La vacuna puede liofilizarse para resuspensión al momento de administración o en solución.

Diagnóstico

En otros aspectos, los anticuerpos de la invención
20 también pueden usarse para la detección específica de proteínas de *H. Parasuis*, o como herramientas de investigación. Los anticuerpos arriba descritos pueden ser etiquetados directamente con una etiqueta detectable para identificación y cuantificación de bacteria de *H. Parasuis*.

Las etiquetas para uso en inmunoensayos se conocen por aquellos expertos en la técnica e incluyen enzimas, radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I), y sustancias fluorescentes (fluoresceína y derivados, 5 ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina, y Rojo de Texas), luminiscentes (por ejemplo, luciferina de luciérnaga) y cromogénicas, incluyendo partículas de color tales como perlas de oro coloidal o látex. Los inmunoensayos apropiados incluyen ensayos inmunosorbentes ligadas por 10 enzima (ELISA). Si se desea, el anticuerpo puede ser etiquetado indirectamente por la reacción con sustancias etiquetadas que tienen una afinidad para inmunoglobulina. El anticuerpo puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia etiquetada que tiene una 15 afinidad para la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse a biotina y el conjugado anticuerpo-biotina detectado usando avidina o estreptavidina etiquetada. El anticuerpo también puede conjugarse a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno 20 detectado usando anticuerpo etiquetado con anti-hapteno. Estos y otros métodos para etiquetar anticuerpos y conjugados de ensayo son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. La detección de una etiqueta puede realizarse por varios métodos que incluyen conteo por escintilación,

espectrometría de rayos gamma, autoradiografía, y detección de fluorescencia.

En consecuencia, cuando se usa con etiquetas apropiadas u otra biomolécula o químicos detectables apropiados, los anticuerpos descritos en la presente son útiles para propósitos tales como diagnóstico in vivo e in vitro de infecciones por *H. parasuis* o detección de bacterias de *H. parasuis*.

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para aislar y determinar bacterias e infección por *H. parasuis*. En una modalidad, el kit comprende los anticuerpos de reacción cruzada aislados de la presente invención en una forma apropiada, tales como liofilizado en un recipiente sencillo que puede activarse por la adición de una muestra acuosa que se sospecha que contiene la bacteria *H. parasuis*. Tal kit incluirá típicamente un recipiente apropiado para alojar los anticuerpos en una forma apropiada junto con un reactivo de inmunodetección apropiado. Generalmente, estos kits pueden contener un anticuerpo de acuerdo con la presente invención e instrucciones para determinar el enlace del tal anticuerpo cuando se introduce una muestra de un sujeto al anticuerpo. Por ejemplo, un reactivo de inmunodetección apropiado puede comprender una señal o etiqueta detectable

apropiada, tal como biotina o enzima que produce un color detectable, etc., que puede ligarse al anticuerpo o utilizarse en otras maneras apropiadas de manera que se proporciona un resultado detectable cuando el anticuerpo se
5 enlaza al antígeno. En otra modalidad, el kit comprende una proteína de *H. parasuis*, o fragmento de la misma, que comprende una determinante antigénica reactiva cruzada.

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo para ilustración.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Estimulación Secuencial

Todos los animales experimentales se sometieron a los
15 procedimientos establecidos por la Política de Servicio de Salud Pública en Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio, la Provisión del Acta de Bienestar Animal, y otras leyes y regulaciones aplicables.

La composición de estimulación se preparó como sigue: un
20 hisopo de algodón estéril se remojó en solución madre de *H. parasuis* descongelada a aproximadamente 5×10^8 Unidades de formación de colonia (CFU)/ml y humedece suavemente para cubrir la superficie de una placa de agar y chocolate. El cultivo se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera con CO₂ al

5 %. Tres ml de solución amortiguadora de peptona se usó entonces para lavar la placa, usando un raspador celular y se pasa a través de estopilla para remover cualquier residuo de agar. El fluido capturado se normalizó entonces hasta 1 OD con solución amortiguadora de peptona. Este nivel se alcanzó a aproximadamente una dilución 1:11. El material se almacenó at 4°C por aproximadamente 1 h antes de usar.

Se obtuvieron dieciocho lechones derivados por cesárea, que carecen de calostro (CDCD) a 5 semanas de edad de Struve Labs, Inc. Los animales se colocaron aleatoriamente en uno de tres grupos: 9 lechones se colocaron en el grupo experimental, 4 lechones en el grupo de control, y 5 lechones en el grupo indicador (Tabla 1). Todos los animales se les dieron cánulas intranasales para proporcionar acceso directo al sistema respiratorio superior y se alojan en cuartos de acceso controlado de acuerdo al grupo.

Tabla 1: Agrupado y Estimulación Animal

Grupo experimental	Estimulación con <i>H. Parasuis</i> Serotipo 5	Estimulación con <i>H. Parasuis</i> Serotipo 5
Experimental (9 animales)	X	X
Control (4 animales)		
Indicador (5 animales)		X

A las 7 semanas de edad, los animales en el grupo experimental se estimularon intranasalmente con 1 ml de serotipo 5 diluido hasta 0.001 de densidad óptica (OD) a 530 nm en solución amortiguadora de peptona. Los lechones de control e indicadores se estimularon con solución amortiguadora de peptona. Después de la estimulación, los lechones se permitieron que se recuperaran. Se administraron antibióticos de espectro amplio como sea necesario.

Nueve semanas después de la primera estimulación, los animales en el grupo grupos experimentales e indicadores se estimularon intranasalmente con 1 ml del serotipo 13 diluido hasta a 0.001 OD a 530 nm en solución amortiguadora de peptona.

Se les aplicó la necropsia a tres animales aleatoriamente seleccionados 24 horas después de la segunda estimulación. Se cosecharon los tejidos respiratorio y linfático de estos animales, se maceraron con un escalpelo estéril, y se colocaron en placas de 24 pozos que contienen medio de cultivo celular con agentes antibacterianos para permitir que las células activadas proliferen. Este sobrenadante del medio se usó para pruebas adicionales. Los animales restantes se observaron por 2 semanas más y se les aplicó la necropsia.

Ejemplo 2

SDS/PAGE y Western Blot

Se colocó en placa de forma expandida un ml de solución madre congelada de *H. parasuis* a 5×10^8 CFU/ml en la placa de agar y chocolates. El cultivo se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera con CO₂ al 5 %. Cuatro ml de solución salina amortiguada en fosfato (PBS) se usó entonces para lavar la placa, usando flujo inducido por pipeta para suspender las células. Las células resuspendidas se almacenaron a 4°C y usaron dentro de 1 semana. Dos ml de la suspensión se centrifugó (9,000 g, 1 hr) y las células peletizadas se volvieron a suspender en 200 µl de PBS, lavaron dos veces con PBS, y rompieron al pasar por una aguja de calibre 18. La suspensión celular de lavado se mezcló 1:1 con PBS que contiene Tween-20 al 2 % y el incubado en un tubo giratorio de prueba por 90 min a 37°C. Después de la incubación, las células se removieron por centrifugación (48,000 g, 1 hr). El sobrenadante de cultivo se mantuvo y almacenó a 4°C y usó dentro de 1 semana.

El SDS-PAGE se realizó usando el sistema Criterion™ con geles de acrilamida al 12.5 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La suspensión de célula *H. parasuis* se corrió en geles a una dilución de 1:3 en PBS. El extracto de Tween-20 se corrió sin diluir. Los geles se tiñeron con reactivo de

tinción azul GelCode (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL), un tinte en gel basado en Coomassie. Se corrieron Western blots usando el kit detector de proteína (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland). Se realizó una prueba primaria
5 usando fluidos inmunitarios generados del cerdo estimulado. Se usó ant-cerdo-HRP de cabra como el anticuerpo de detección. Se alcanzó la visualización con 1 Componente de Sustrato de Peroxidasa de Membrana TMB (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland).

10 El sobrenadante cosechado de las células activadas aisladas de varios tejidos de 9 animales se seleccionaron contra células de serotipo 5 de *H. parasuis* enteras. Se usaron altas concentraciones de estos sobrenadantes para visualización por técnica Western blot. La concentración alta
15 y específica de anticuerpo se obtuvo a partir de los ganglios linfáticos bronquiales del cerdo 47 (BL47) (Fig. 1). El patrón en banda crudo presentado en este Western blot fue indicativo de proteínas presentes en *H. parasuis* reconocido por el animal estimulado. BL47 se eligió para análisis
20 comparativo adicional.

Las proteínas reconocidas entre serotipos se caracterizaron además a través de un segundo conjunto de Western blots. Los serotipos 5 y 13 se seleccionaron primero. El serotipo 5 muestra bandas prominentes a aproximadamente

28, 33, 45, 56, 63, y 76 kDa. El patrón de banda del serotipo 13 fue similar al serotipo 5 y contiene bandas prominentes a 28, 45, 55, 62, y 75 kDa. Al probar con BL47 contra el serotipo 4, un serotipo no involucrado en las estimulaciones de cerdos, también genera bandas prominentes a 28, 34, 41, 47, 57, 62, y 77 kDa. Una comparación directa de los tres serotipos se muestra en la Figura 2. Las proteínas de aproximadamente 28, 45, 55, 62, y 75 kDa, que parecen que se presentan en todos los serotipos probados, se examinaron adicionalmente.

Las proteínas presente en serotipos múltiples se identificaron usando fluidos generados de una estimulación secuencial. Para incrementar las concentraciones relativas de proteínas asociadas en la membrana en las muestras, un cultivo de serotipo 5 se procesó por medio de un proceso de extracción de tween-20. Este método se ha mostrado previamente para aislar las membranas exteriores de bacterias. Al realizar este procedimiento se producen muchas diferencias en el perfil SDS-PAGE de las células no tratadas (Fig. 3; SDS-PAGE). La formación de banda fue similar en Western blot, también, lo que demuestra que las proteínas inicialmente dirigidas se presentaron.

El material procesado de tween-20 se usó para procesamiento de secuencias. Este material contiene las

proteínas de reactividad cruzada y tiene la mayoría de los residuos celulares removidos durante el curso del procesamiento. De esta manera, esta preparación tween-20 se corrió en varios carriles adyacentes en una membrana PVDF para corte de banda y procesamiento de secuencias. (Fig. 3; 5 Blot). Las bandas seleccionadas para procesamiento de secuencias del serotipo 5 incluyen aquellas a ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa.

10

Ejemplo 3

Resultados del Procesamiento de Secuencias

Las muestras para procesamiento de secuencias se corrieron primero en un SDS-PAGE, luego se transfirieron a una membrana PVDF. Esta membrana se tiñó y las bandas se 15 extirparon usando una navaja de afeitar. La espectrometría de masa se realizó en tapones de gel extirpados con una navaja de afeitar. La solución amortiguadora de transferencia fue solución amortiguadora Tris/Glicina estándar con MeOH 20%. La membrana se tiñó con reactivo de tinción azul GelCode (Pierce 20 Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se destiñó con isopropanol al ~25% en agua. Los fragmentos de membrana se enjuagaron copiosamente con agua desionizada, purificada.

Las muestras (esto es, bandas de ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa) se caracterizaron además usando espectrometría de

masa (Fig. 4A-D) y procesamiento de secuencias por terminal N (degradación Edman). Los resultados de procesamiento de secuencias por terminal N proporciona la información de secuencia parcial, que se muestra en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Resultado de procesamiento de secuencias de N terminal.

SEQ ID N.6

SEQ ID N.7

SEQ ID N.8

SEQ ID N.9

SEQ ID N.10

SEQ ID N.11

SEQ ID N.12

SEQ ID N.13

SEQ ID N.14

¹X representa un aminoácido indeterminado.

La información de secuencia para los fragmentos de proteína fueron entonces BLASTp 'd contra el *H. influenzae* y
 10 *H. ducreyi* en la base de datos Swiss-Prot. Las proteínas con más de 10 aminoácidos (aa) o algunas más de 3 posiciones con posibilidades de aminoácidos múltiples se analizaron además. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de Procesamiento de secuencias de Proteína.

5

10

15

No.	PM (kDa)	PM est. (kDa)	Valor E	Swiss-Prot ID	Nombre de Proteína/Descripción
1	28	22	0.76	Q4QM69	Peptidoglican transglicosilasa biosintética monofuncional
2	28	34	2.5	Q4QK43	Pseudouridina sintasa B de tARN
3	28	32	3.4	Q4QJL4	Eonil-[acil-portador-proteína] reductasa
4	28	68	8	Q4QLZ8	Sistema glutational-potasio regulado-efluente
5	56	60	8.00E-08	Q4QM48	Proteína A ligada a heme
6 ^a	56	58	0.041	Q7VL18	Proteína de ligada al transportador ABC putativo periplásmico
7	63	61	0.33	Q4QLH0	Proteína unida al oligopéptido periplásmico
8	63	28	1.9	Q4ANT7	TonB (transportador de hierro)
9	76	68	4.00E-09	Q4QJW4	Proteína dnaK chaperona (HSP70)
10	76	24	0.59	Q4QP42	N-acetilmanosamina-6fosfato 2-epimerasa putativa
11	76	17	1.1	Q4AQMR6	Fosfaopanteteína adenililtransferasa
12	76	74	2	Q4QJR2	HMW1C, glicosiltransferasa putativa involucrada en la glicosilación de HMW1A y HMW2A

a = Éxito de secuencia de proteína contra *H. ducreyi*. Todas las otras secuencias se obtienen a través de la comparación *H. influenzae*.

La Tabla 3 incluye al menos dos proteínas que parecen igualmente exponerse en la superficie de la célula (proteínas 6 y 7) y al menos un que parece ser capaz de unir el hierro

(proteína 5).

Ejemplo 4

PCR y Clonación

Las proteínas 5 y 6 mostradas en la Tabla 3 fueron
5 inmunogénicas en que ambas se reconocieron por los fluidos
inmunitarios de los cerdos. Estas proteínas se han asociado
con adquisición de hierro. Los transportadores tipo ABC
tienen una amplia variedad de funciones reportadas y se han
conectado con absorción de hierro en *Cyanobacteria*. La
10 proteína unida a heme es vital para sobrevivencia de *H.*
influenzae en el torrente sanguíneo como se cosecha unida a
hierro a los grupos heme. Además, la proteína unida a heme es
altamente conservadora dentro del género.

Usando la información del genoma de *H. influenzae* y *H.*
15 *ducreyi* publicado, los cebadores PCR se diseñaron para
amplificar las dos proteínas seleccionadas (esto es, proteínas 5
y 6) de una preparación cromosomal de *H. parasuis*. Los cebadores
PCR usados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Cebadores PCR.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T _M
Proteína 5		
FHpsHemeBam (delantero)	SEQ ID NO: 15	60°C
RHpsHemeXho (inverso)	SEQ ID NO: 16	61°C
Proteína 6		
FHpsABCBam (delantero)	SEQ ID NO: 17	60°C
RHpsABCXho (inverso)	SEQ ID NO: 18	64°C

Para amplificación de una secuencia de nucleótido correspondiente a la proteína 5, se realizó la PCR usando los cebadores mostrados en la Tabla 4 y polimerasa PFU Turbo, y preparación cromosomal de *H. parasuis* como plantilla. Se apreciaron dos bandas sólidas en la reacción heme (~1.8kb y ~800bp) y la banda correspondiente al producto de amplificación ~1.8kb se purificó en gel.

Para amplificación de una secuencia de nucleótido correspondiente a la proteína 6, se realizó la PCR usando los cebadores mostrados en la Tabla 4 y polimerasa PFU Turbo y preparación cromosomal de *H. parasuis* como plantilla. Se apreció un doblete en esta reacción (~1.5kb y ~1.3kb) y la banda superior (esto es, ~1.5 kb) del doblete fue purificado en gel usando un kit de elución en gel.

Los fluidos purificados en gel que contienen los productos amplificados se confeccionaron en A y ligaron a

pGEM-T. Esta ligación se transformó en células competentes TOP10 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Los transformantes se seleccionaron e hicieron crecer a 37°C durante la noche. Los insertos se confirmaron posteriormente y se subclonan en el vector de expresión pTRCHis-A (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) expresión de proteínas recombinantes que contienen etiquetas 6xHis de terminal N.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar polipéptidos y proteínas
10 que comprenden una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método caracterizado porque comprende obtener al menos un anticuerpo de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende una primera
15 determinante antigénica de un primer polipéptido, seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende una segunda determinante antigénica de un segundo polipéptido, en donde el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo
20 y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, en donde el primero y segundo microorganismos se caracterizan como que son serotipos diferentes de la misma especie, y entonces poner en contacto al menos un anticuerpo

con una primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada, por ello identificando dichos polipéptidos y proteínas que comprenden una determinante antigénica de reactividad cruzada.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primero y el segundo microorganismos son bacterias.

10 3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dichas bacterias son *H. parasuis*.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el primer microorganismo es *H. parasuis* serotipo 5, en donde el segundo microorganismo es *H. parasuis* serotipo 13.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer y el segundo polipéptido cada uno es una proteína ligada a heme o un transportador tipo ABC.

6. Un método para identificar polipéptidos y proteínas que comprenden una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método caracterizado porque comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde la activación comprende estimular inmunológicamente el animal con un primer

polipéptido o proteína para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria, cultivar in vitro dicha célula B de memoria seguido de la activación de dicha célula B de memoria; y

5 b) poner en contacto al menos un anticuerpo con un segundo polipéptido o proteína, en donde el enlace de al menos un anticuerpo al primer polipéptido o proteína y el segundo polipéptido o proteína identifica el polipéptido o proteína que comprende dicha determinante antigénica de
10 reactividad cruzada.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el segundo polipéptido o proteína comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada.

8. El método de conformidad con una de las
15 reivindicaciones 1 ó 6, caracterizado porque los polipéptidos y proteínas que presentan una determinante antigénica de reactividad cruzada, comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO: 1;

20 SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 4; y

SEQ ID NO: 5,

en donde los polipéptidos y proteínas comprenden además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan composiciones y métodos para determinar
5 moléculas reactivas cruzadas inmunológicamente que comprenden
una determinante antigénica de reactividad cruzada, en
particular para determinar proteínas que comprenden
determinantes antigénicas de reactividad cruzada, en
particular para determinar proteínas que tienen reactividad
10 cruzada con base en selecciones serológicas usando pruebas
inmunológicas secuenciales para un animal, incluyendo
determinar las proteína de *H. parasuis* de reactividad
cruzada. También se proporcionan composiciones, vacunas, y
kits que usan las moléculas para diagnósticos y métodos para
15 prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, afección, o
síntomas de la misma asociado con agentes infecciosos, en
particular microorganismos infecciosos, en particular para
prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, afección, o
síntoma de la misma asociado con infección por *H. parasuis*.

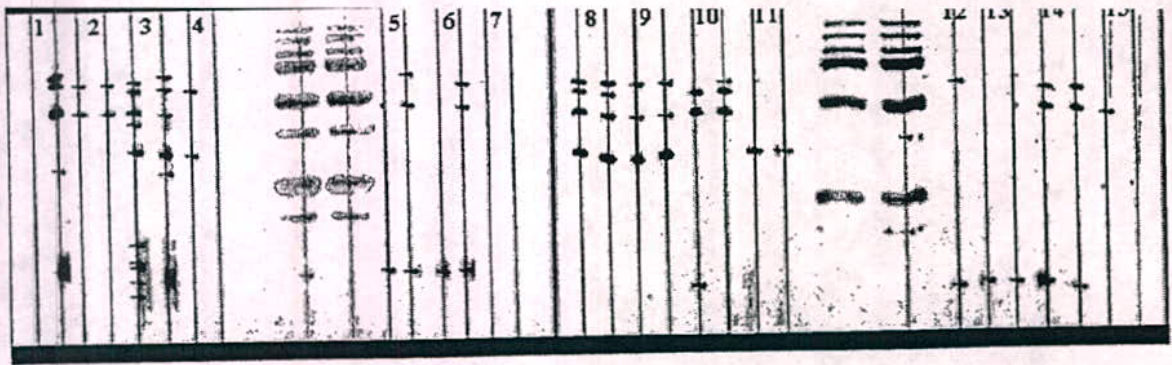


FIGURA 1

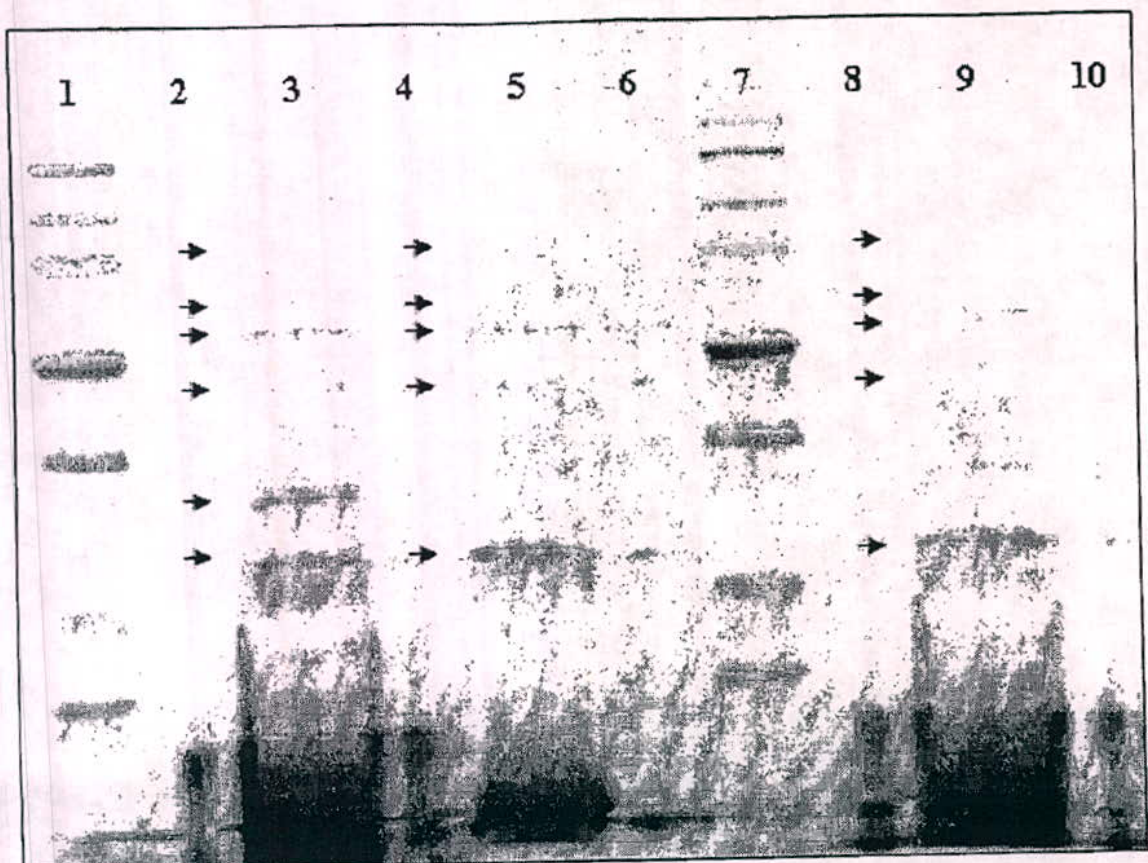


FIGURA 2

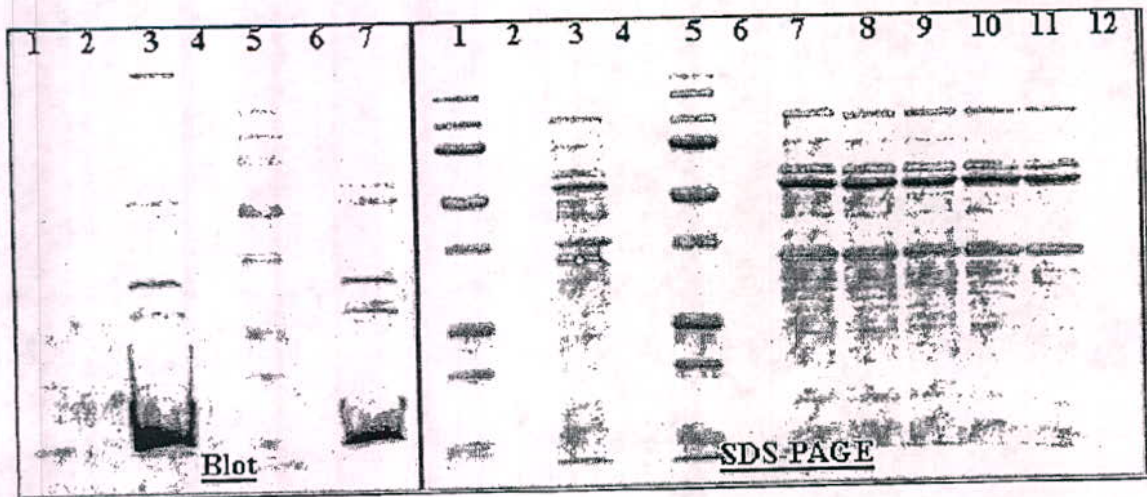


FIGURA 3

FIG. 4A

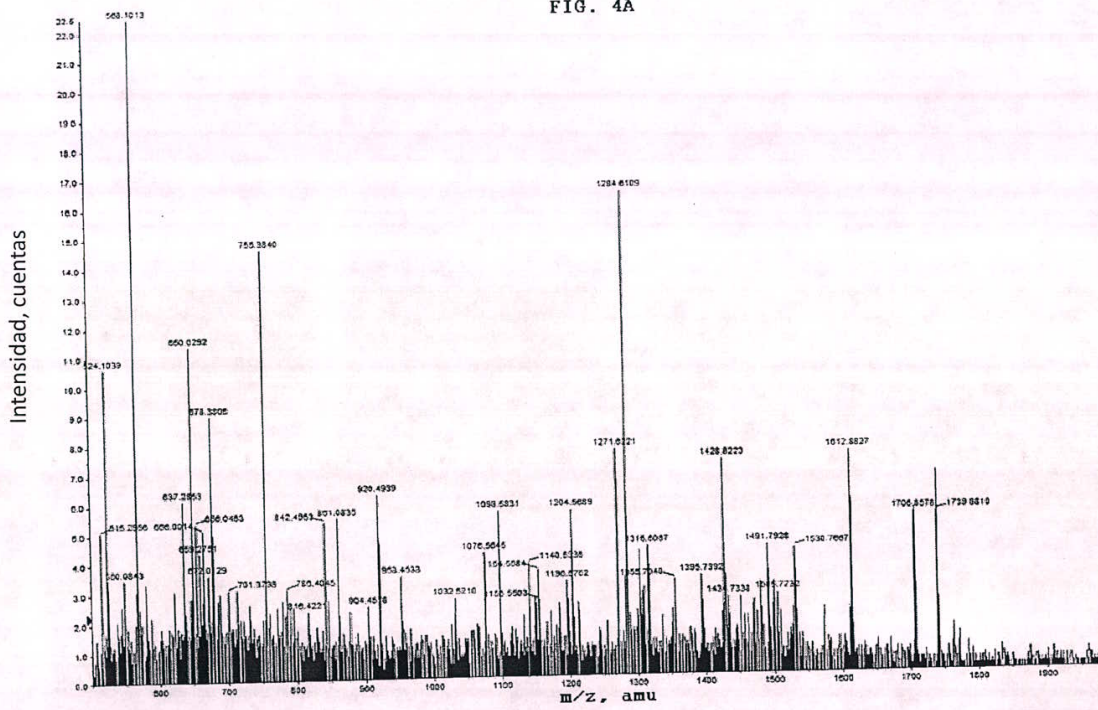


FIG. 4B

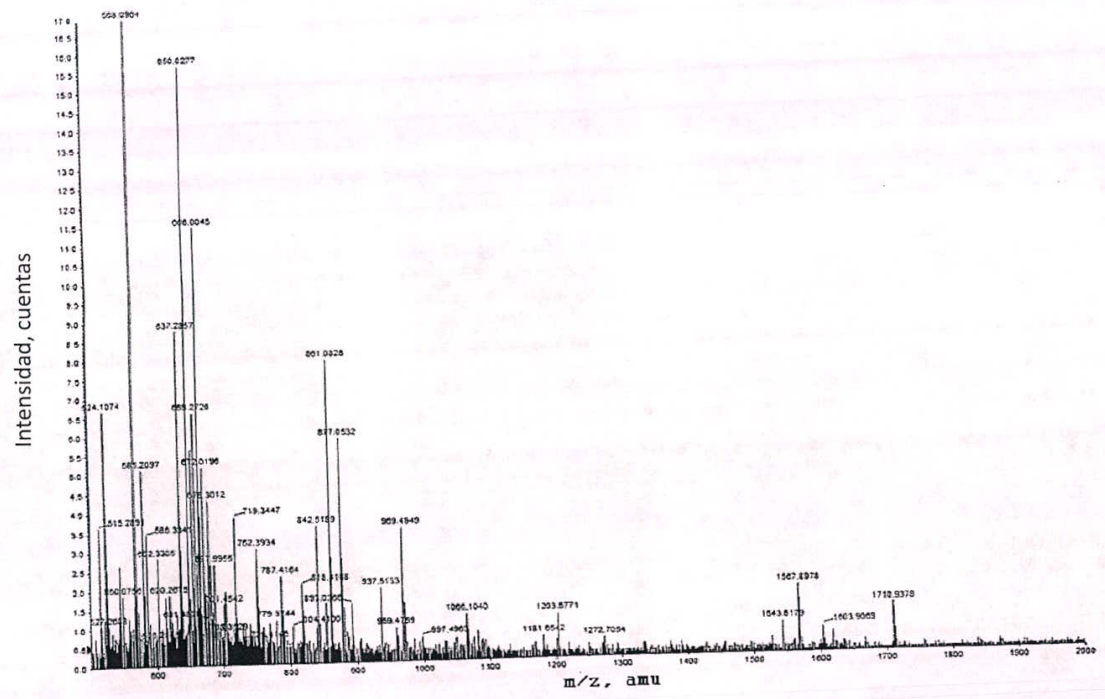
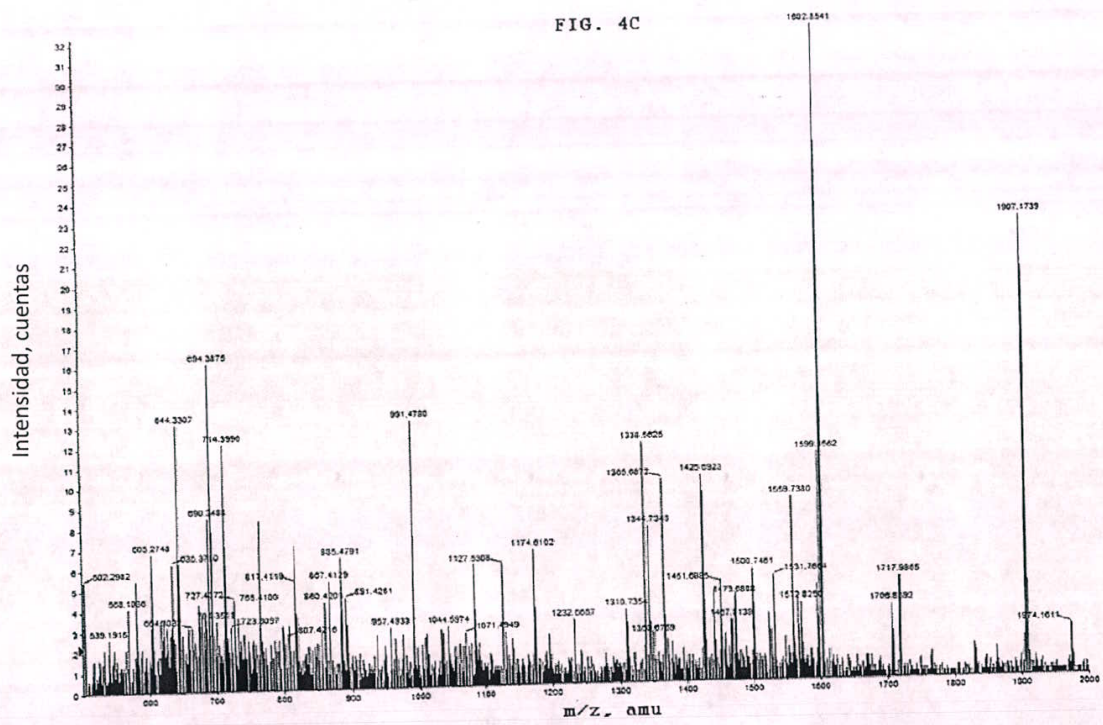


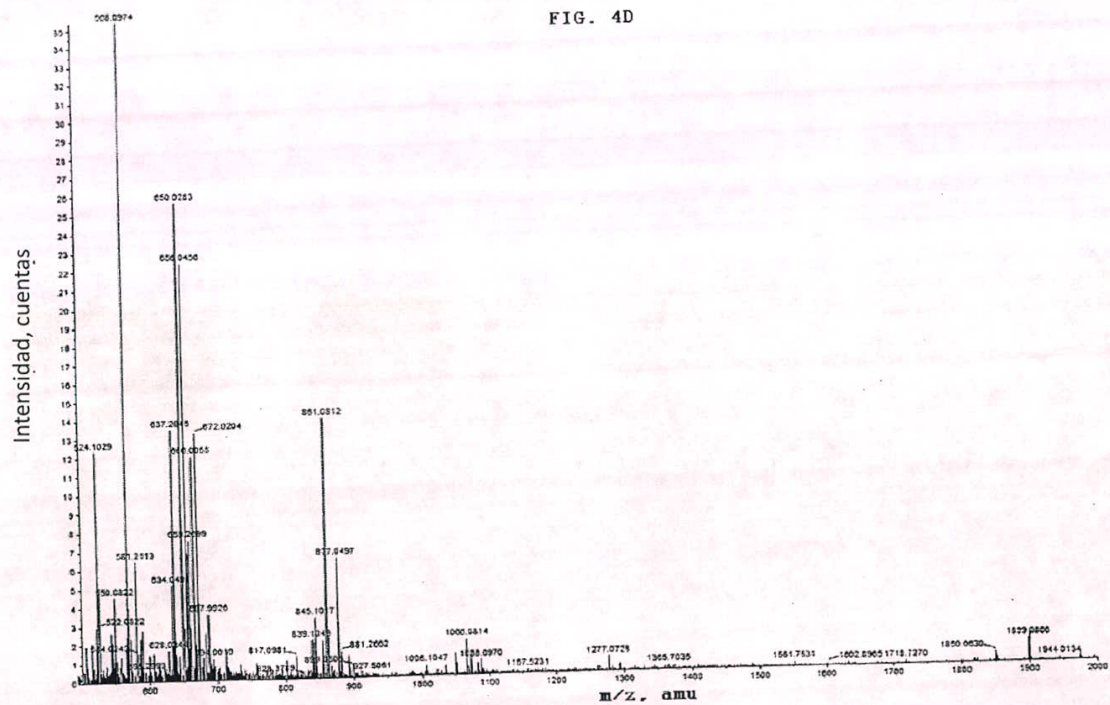
FIG. 4C



6/

86

FIG. 4D



L / L

bt

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Composiciones, Métodos, y Kits

<130> N079 1290.1

<160> 5

<170> PatentInversión 3.4

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 1

Glu Leu Ala Asn Ala Ile Thr Phe Leu Ser Met
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 2

Thr Val Leu Ala Glu Lys Gln Glu Ile Ile
1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 3

Ala Pro Ala Lys Gly Ser Thr Ile Glu Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Il
1 5 10 15

Ser Thr

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 4

Met Lys Asn Leu Ile Ser Ile
1 5

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Haemophilus parasuis

<400> 5

Ser Pro Ser Asp Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ala Ile Pro Asp Tyr Asn
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Met Thr Ser
 20

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Haemophilus parasuis

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Arg Ala

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Haemophilus parasuis

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 7

Ser Glu Pro Gln Ala Thr Xaa Asp Ala Lys

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 8

Met Lys Asn Leu Ile Ser Ile Ala Lys Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 9

Gly Glu Ile Glu Glu Leu Ala Leu Gly Ile

1 5 10

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 10

Met Glu Lys Asp Val Lys Phe Gly Asn Asp Ala Arg Val Gly Met
Leu

1 5 10 15

Lys Gly Val Asn Xaa Lys Ala Asp Ala

20

25

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 11

Ser Glu Ile Xaa Glu Leu Ala Asn Ala Ile Thr Phe Leu Ser Met
Gly

1

5

10

15

Val Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 12

Gly Lys Val Pro Glu Thr Thr Val Leu Ala Xaa Lys Gln Glu Ile

Ile

1

5

10

15

Xaa

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Thr Ala Xaa Asp Asp Met Met Ser

20 25

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Haemophilus parasuis

<400> 14

Ser Pro Ser Asp Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ala Ile Pro Asp Tyr

Asn

1

5

10

15

Ala Ala Glu Met Thr Ser

20

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Haemophilus parasuis

<400> 15

tataggatcc

atgcttatga

aactaaaagc

aacattaact

40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Haemophilus parasuis

<400> 16

tataactcgag

ttattttacca

tcaacactca

caccataaaa

40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Haemophilus parasuis

<400> 17

tataggatcc

atgacttctc

atTTTgaata

caatcaatct

40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Haemophilus parasuis

<400> 18

tatactcgag

ttatgtacga

cctacaccaa

ggaaagacaa

40