



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 266 090**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/205 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01204919 .3**

(86) Fecha de presentación : **14.12.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1219711**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

(54) Título: **Vacuna contra *Lawsonia intracellularis*.**

(30) Prioridad: **20.12.2000 EP 00204660**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

(73) Titular/es: **Intervet International B.V.**
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

(72) Inventor/es: **Jacobs, Antonius A. C. y**
Vermeij, Paul

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra *Lawsonia intracellularis*.

La presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican nuevas proteínas de *Lawsonia intracellularis*, a fragmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante y vehículos recombinantes vivos que comprenden estas secuencias, a células hospedadoras que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico, fragmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante y vehículos recombinantes vivos, a las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos, a vacunas para combatir infecciones por *Lawsonia intracellularis* y métodos para la preparación de las mismas, y a herramientas de diagnóstico para la detección de *Lawsonia intracellularis*.

La enteropatía proliferativa porcina (PPE o PE) ha llegado a ser una enfermedad importante de la industria moderna de cerdos en todo el mundo. La enfermedad afecta del 15 al 50% de las piaras en crecimiento y hasta el 30% de los animales individuales en piaras con un problema establecido. Las pérdidas económicas anuales hoy en día se han estimado en 5-10 \$ americanos en alimento adicional y costes de tiempo en las instalaciones por cerdo afectado. PPE es un grupo de afecciones crónicas y agudas de signos clínicos ampliamente diferentes (muerte, animales pálidos y anémicos, diarrea acuosa, oscura o roja fuerte, depresión, apetito reducido y reticencia al movimiento, crecimiento retardado y FCR aumentado). Sin embargo, hay dos características comunes. La primera, un cambio patológico sólo visible en la necropsia, es un engrosamiento de la mucosa del intestino delgado y del colon. La segunda es la existencia de bacterias curvadas pequeñas intracitoplasmáticas en los enterocitos del intestino afectado. Estas bacterias ahora se han establecido como el agente etiológico de PPE y se han llamado *Lawsonia intracellularis*.

Con los años, se ha descubierto que *Lawsonia intracellularis* afecta a casi a todos los animales incluyendo monos, conejos, hurones, hámsters, zorros, caballos y otros animales tan diversos como avestruces y emús. La *Lawsonia intracellularis* es una bacteria flagelada gram-negativa que sólo se multiplica en enterocitos eucarióticos y no se ha descrito en cultivos libres de células. Para persistir y multiplicarse en la célula, *Lawsonia intracellularis* debe penetrar dividiendo las células de la cripta. La bacteria se asocia con la membrana celular y entra rápidamente al enterocito mediante una vacuola de entrada. Ésta después se rompe rápidamente (en 3 horas) y las bacterias prosperan y se multiplican libremente en el citoplasma. Los mecanismos por los que las bacterias provocan que células infectadas no logren madurar, continúen experimentando mitosis y formen células crípticas hipoplásicas aún no se conocen.

Los conocimientos actuales sobre la infección por *Lawsonia intracellularis*, el tratamiento y el control de la enfermedad han estado obstaculizados por el hecho de que *Lawsonia intracellularis* no puede cultivarse en medios libres de células. Aunque hay informes de co-cultivos exitosos de *Lawsonia intracellularis* en enterocitos de rata, esto no ha conducido al desarrollo de vacunas para combatir la *Lawsonia intracellularis*, aunque hay claramente una necesidad de dichas vacunas.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente, que *Lawsonia intracellularis* produce una nueva proteína de membrana externa (OMP) que es capaz de inducir inmunidad protectora contra *Lawsonia intracellularis*.

La nueva proteína de membrana externa se mencionará proteína de 19/21 kD. La proteína de 19/21 kD se encuentra en dos formas diferentes, una forma de 19 kD y una forma de 21 kD, siendo una proteína una forma modificada de la otra y comprendiendo ambas una secuencia de aminoácidos idéntica.

La proteína de 19/21 kD está caracterizada por tres secuencias de aminoácidos internas de 7, 12 y 12 aminoácidos, respectivamente. Estas secuencias de aminoácidos se presentan en las SEC ID N°: 1, 2 y 3.

Se sabe bien en la técnica que muchas secuencias de ácido nucleico diferentes pueden codificar una y la misma proteína. Este fenómeno se conoce habitualmente como balanceo en la segunda y especialmente en la tercera base de cada triplete que codifica un aminoácido. Este fenómeno puede provocar una heterología de aproximadamente el 30% para dos secuencias de ácido nucleico que aún codifican la misma proteína. Fenómeno. Por lo tanto, dos secuencias de ácido nucleico que tienen una homología de secuencia de aproximadamente el 70% aún pueden codificar la misma proteína.

Una realización de la invención se refiere a la nueva proteína, la proteína de 19/21 kD y a fragmentos inmunogénicos de la misma de acuerdo con la invención.

El concepto de fragmentos inmunogénicos se definirá a continuación.

Esta realización se refiere a una Proteína de Membrana Externa de *Lawsonia intracellularis* que tiene un peso molecular de 19/21 kD, pudiendo obtenerse dicha Proteína de Membrana Externa por un proceso que comprende las etapas de

a) someter una preparación de membrana externa a SDS-PAGE

b) escindir la banda de 19 ó 21 kD del gel

y a fragmentos inmunogénicos de esa proteína.

En el Ejemplo 1, se explica en detalle un ejemplo de cómo realizar estas etapas: primero se describe la etapa de aislamiento de *L. intracellularis* de fleos porcinos infectados, seguido por una descripción, de cómo obtener una preparación de proteína de membrana externa de *L. intracellularis*. Finalmente, bajo el título "Secuenciación de la proteína de membrana externa" se explica cómo aislar la banda de 19 ó 21 kD del gel.

En una forma preferida, esta proteína de *Lawsonia intracellularis* o un fragmento inmunogénico de esa proteína tiene una secuencia de aminoácidos interna que es al menos el 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos interna que es al menos el 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 2, o una secuencia de aminoácidos interna que es al menos el 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEC ID N°: 3.

En una forma más preferida, esta proteína de *Lawsonia intracellularis* o un fragmento inmunogénico de esa proteína tiene una homología de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, 2 ó 3. Se prefiere incluso más un nivel de homología del 98% o incluso el 100%.

El nivel de homología de las proteínas puede determinarse con el programa informático "BLAST 2 SEQUENCES" seleccionando el subprograma: "BLASTP", que puede encontrarse en

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html.

Una referencia para este programa es Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999): Matriz Usada: "blosum62". Los parámetros usados son los parámetros por defecto:

Abertura de hueco: 11. Extensión de hueco: 1. Disminución x de hueco: 50.

Se entenderá que, para las proteínas particulares abarcadas en este documento, pueden existir variaciones naturales entre cepas individuales de *Lawsonia intracellularis*. Estas variaciones pueden demostrarse por una o unas diferencias de aminoácidos en la secuencia global, o por delecciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de un o más aminoácidos en dicha secuencia. Se han descrito sustituciones de aminoácidos que no alteran esencialmente las actividades biológica e inmunológica, por ejemplo, por Neurath *et al* en "The Proteins" Academic Press New York (1979). Los remplazos de aminoácidos entre aminoácidos relacionados o remplazos que han sucedido frecuentemente en el evolución son, entre otros, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (véase, Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, supl. 3). Otras sustituciones de aminoácidos incluyen Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val y Ala/Glu. En base a esta información, Lipman y Pearson desarrollaron un método para la comparación rápida y sensible de proteínas (Science, 227, 1435-1441, 1985) y determinar la similitud funcional entre proteínas homólogas. Dichas sustituciones de aminoácidos de las realizaciones ejemplares de esta invención, así como variaciones que tienen delecciones y/o inserciones, pertenecen al alcance de la invención mientras que las proteínas resultantes retengan su reactividad inmune. Esto explica porqué las proteínas de *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la invención, cuando se aíslan de diferentes aislados de campo, pueden tener niveles de homología de aproximadamente el 70%, representando aún la misma proteína con las mismas características inmunológicas.

Esas variaciones en la secuencia de aminoácidos de una cierta proteína de acuerdo con la invención que aún proporcione una proteína capaz de inducir una respuesta inmune contra infección por *Lawsonia intracellularis* o al menos contra las manifestaciones clínicas de la invención se consideran "no esencialmente influyentes en la inmunogenicidad".

Cuando se usa una proteína para, por ejemplo, propósitos de vacunación o para producir anticuerpos, sin embargo, no es necesario usar la proteína completa. También es posible usar un fragmento de esa proteína que es capaz, como tal o acoplada a un vehículo tal como, por ejemplo, KLH, de inducir una respuesta inmune contra esa proteína, un llamado fragmento inmunogénico. Se entiende por "fragmento inmunogénico" un fragmento de la proteína de longitud completa que aún retiene su capacidad de inducir una respuesta inmune en el hospedador, es decir, comprende un epítipo de célula B o T. En este momento, está disponible una diversidad de técnicas para identificar fácilmente fragmentos de ADN que codifican fragmentos antigénicos (determinantes). El método descrito por Geysen *et al* (Solicitud de Patente WO 84/03564, Solicitud de Patente WO 86/06487, Patente de Estados Unidos NR. 4.833.092, Proc. Natl Acad. Sci. 81: 3998-4002 (1984), J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987), el llamado método PEPSCAN es un método fácil de realizar, rápido y bien establecido para la detección de epítopos; las regiones inmunológicamente importantes de la proteína. El método se usa en todo el mundo y como tal es bien conocido para los especialistas en la técnica. Este método (empírico) es especialmente adecuado para la detección de epítopos de células B. Además, dada la secuencia del gen que codifica cualquier proteína, los algoritmos informáticos son capaces de señalar fragmentos específicos de la proteína como los epítopos inmunológicamente importantes en base a su coincidencia secuencial y estructural con epítopos que son conocidos. La determinación de estas regiones se basa en una combinación de los criterios de hidrofiliidad de acuerdo con Hopp y Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 38248-3828 (1981)), y los aspectos de estructura secundaria de acuerdo con Chou y Fasman (Advances in Enzymology 47: 45-148 (1987) y Patente de Estados Unidos 4.554.101). Los epítopos de células T pueden predecirse del mismo modo a partir de la secuencia por un ordenador con la ayuda del criterio de anfiliidad de Berzofsky (Science 235, 1059-1062 (1987) y la solicitud de Patente de Estados Unidos NTIS US 07/005.885). Se encuentra una visión global condensada en: Shan Lu sobre prin-

cipios comunes; Tibtech 9: 238-242 (1991), Good *et al* sobre epítomos de la Malaria; Science 235:1059-1062 (1987), Lu para una revisión; Vaccine 10: 3-7 (1992), Berzowsky para epítomos de VIH; The FASEB Journal 5:2412-2418 (1991).

Por lo tanto, una forma de otra realización de la invención se refiere a vacunas capaces de proteger a cerdos contra infección por *Lawsonia intracellularis*, que comprenden una proteína o fragmento inmunogénico de la misma, de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra realización más de la presente invención se refiere a las proteínas de acuerdo con la invención para su uso en una vacuna.

Otra realización más se refiere al uso de una proteína de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para combatir infecciones por *Lawsonia intracellularis*.

Un modo de preparar una vacuna de acuerdo con la invención es por purificación bioquímica de las proteínas o fragmentos inmunogénicos de las mismas de acuerdo con la invención a partir de bacterias obtenidas a través de raspados de la mucosa tomados de la pared del intestino infectado. Sin embargo, esto es un modo de preparar la vacuna que lleva mucho tiempo.

Por lo tanto, es mucho más conveniente usar en vacunas los productos de expresión de los genes que codifican las proteínas o fragmentos inmunogénicos de las mismas de acuerdo con la invención. El gen que codifica la proteína de 19/21 kD puede localizarse y aislarse fácilmente usando hibridación con sonda mixta como se describe en Maniatis (Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 1989. ISBN 0-87969-309-6). Las secuencias de aminoácidos presentadas en las SEC ID N°: 1, 2 y 3 forman la base para sondas mixtas con las siguientes secuencias.

Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
Cebadores directos	Cebadores directos	Cebadores directos
ggl acl caR gaR taY aaY tt	gel taY gaY taY ttR gtl atg	TtY taY gtl atg gtl tgg ac
ggl acl caR gaR taY aaY ct	gel taY gaY taY ctl gtl atg	
Cebadores inversos	Cebadores inversos	Cebadores inversos
AaR ttR taY tcY tgl gtl cc	cat lac Yaa Rta Rtc Rta Igc	Gtc cal acc atl acR taR aa
AaR ttR taY tc Y tgl gtl cc	cat lac lag Rta Rtc Rta Igc	

Con el uso de estas secuencias, el gen que codifica la proteína de 19/21 kD puede localizarse y aislarse, del mismo modo que se han aislado los genes que codifican las proteínas de 37 kD y 50 kD (véase el Ejemplo 1; "Amplificación de genes de la proteína de la membrana externa").

Dichas vacunas basadas en los productos de expresión de estos genes pueden prepararse fácilmente mezclando una o más proteínas de acuerdo con la invención o fragmentos inmunogénicos de las mismas de acuerdo con la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable como se describe a continuación.

Como alternativa, una vacuna de acuerdo con la invención puede comprender vehículos recombinantes vivos como se ha descrito anteriormente, capaces de expresar las proteínas de acuerdo con la invención o fragmentos inmunogénicos de las mismas de acuerdo con la invención. Dichas vacunas, por ejemplo, basadas en un vehículo de Salmonella o un vehículo viral que infecta el epitelio gástrico tienen la ventaja sobre vacunas de subunidad que imitan mejor el modo natural de infección de *Lawsonia intracellularis*. Además, su auto-propagación es una ventaja ya que sólo son necesarias cantidades bajas del vehículo recombinante para la inmunización.

Las vacunas descritas anteriormente contribuyen todas a la vacunación activa, es decir, el sistema inmune del hospedador se desencadena por una o más proteínas de acuerdo con la invención o fragmentos inmunogénicos de las mismas, para preparar anticuerpos contra estas proteínas.

Como alternativa, dichos anticuerpos pueden provocarse en, por ejemplo, conejos o pueden obtenerse de líneas celulares que producen anticuerpos como se describe a continuación. Dichos anticuerpos pueden administrarse después al animal hospedador. Este método de vacunación, vacunación pasiva, es la vacunación de elección cuando un animal ya está infectado, y no hay tiempo para permitir que se desencadene la respuesta inmune natural. También es el

método preferido para vacunar animales inmuno-comprometidos. Los anticuerpos administrados contra *Lawsonia intracellularis* pueden, en estos casos, unirse directamente a las bacterias. Esto tiene la ventaja de que disminuye o detiene inmediatamente el crecimiento de *Lawsonia intracellularis*.

5 Por lo tanto, una forma distinta de esta realización de la invención se refiere a vacunas que comprenden anticuerpos contra cualquiera de las tres proteínas de *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la invención.

Las vacunas también pueden basarse en las células hospedadoras que se han descrito anteriormente, que comprenden las proteínas o fragmentos inmunogénicos de las mismas de acuerdo con la invención.

10 Un modo alternativo y eficaz de vacunación es la vacunación directa con ADN que codifica el antígeno relevante. La vacunación directa con ADN que codifica proteínas ha sido exitosa para muchas proteínas diferentes. (Como se revisa en, por ejemplo, Donnelly *et al.*, The Immunologist 2: 20-26 (1993)).

15 Este modo de vacunación es muy atractivo para la vacunación de cerdos contra infección por *Lawsonia intracellularis*.

Por lo tanto, otras formas más de esta realización de la invención se refieren a vacunas que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de acuerdo con la invención o fragmentos inmunogénicos de la misma de acuerdo con la invención, y a vacunas que comprenden fragmentos de ADN que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico.

Otras formas más de esta realización se refieren a vacunas que comprenden moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la invención.

25 Las vacunas de ADN pueden administrarse fácilmente a través de aplicación intradérmica, por ejemplo, usando un inyector sin aguja. Este modo de administración suministra el ADN directamente a las células del animal a vacunar. Las cantidades de ADN en el intervalo de microgramo entre 1 y 100 µg proporcionan resultados muy buenos.

30 En una realización adicional, la vacuna de acuerdo con la presente invención comprende adicionalmente uno o más antígenos derivados de otros organismos y virus patogénicos del cerdo, o información genética que codifica dichos antígenos.

35 Dichos organismos y virus se seleccionan preferiblemente entre el grupo de virus de la pseudorrabia, virus de la influenza porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

40 Todas las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja, el vehículo puede, por ejemplo, ser un tampón.

Los métodos para la preparación de una vacuna comprenden mezclar una proteína de acuerdo con la invención, un fragmento inmunogénico de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden, en una presentación preferida, contener también un adyuvante. Los adyuvantes, en general, comprenden sustancias que refuerzan la respuesta inmune del hospedador de un modo no específico. Se conocen varios adyuvantes diferentes en la técnica. Son ejemplos de adyuvantes, adyuvante Completo o Incompleto de Freund, vitamina E, polímeros no iónicos de bloque, muramildipéptidos, Quill A®, aceite mineral, por ejemplo Bayol® o Markol®, aceite vegetal, y Carbopol® (un homopolímero), o Diluvac® Forte. La vacuna también puede comprender un llamado "vehículo". Un vehículo es un compuesto al que se adhiere el polipéptido, sin estar covalentemente unido al mismo. Los compuestos vehículo usados a menudo son, por ejemplo, hidróxido, fosfato u óxido de aluminio, sílice, caolín, y bentonita.

55 Una forma especial de dicho vehículo, en la que el antígeno se incluye parcialmente en el vehículo, es el llamado ISCOM (documentos EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380).

Además, la vacuna puede comprender uno o más compuestos tensioactivos adecuados o emulsionantes, por ejemplo, Span o Tween.

60 A menudo, la vacuna se mezcla con estabilizadores, por ejemplo, para proteger de la degradación a los polipéptidos propensos a la degradación, para potenciar la vida media de la vacuna, o para mejorar la eficacia del secado por congelación. Los estabilizadores útiles son, entre otros, SPGA (Bovarnik *et al.*; J. Bacteriology 59: 509 (1950)), carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína, o productos de degradación de los mimos, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

Además, la vacuna puede suspenderse en un diluyente fisiológicamente aceptable.

No hay que decir, que también se incluyen en la presente invención otros medios para potenciar con adyuvante, añadir compuestos, vehículos o diluyentes, emulsionar o estabilizar un polipéptido.

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser muy adecuadas para administrarse en cantidades que varían entre 1 y 100 μg , aunque en principio pueden usarse cantidades más pequeñas. Una dosis que exceda de 100 μg será, aunque inmunológicamente muy adecuada, menos atractiva por razones comerciales.

Las vacunas basadas en vehículos recombinantes atenuados vivos, tales como los virus LRC y bacterias descritas anteriormente, pueden administrarse en dosis mucho más bajas, porque se multiplican por sí mismas durante la invención. Por lo tanto, cantidades muy adecuadas variarán entre 10^3 y 10^9 CFU/PFU para bacterias y virus respectivamente.

Pueden aplicarse muchos modos de administración. La aplicación sistémica es un modo adecuado de administración, por ejemplo, por aplicación intramuscular de la vacuna. Si se sigue esta vía, son muy adecuados los procedimientos convencionales conocidos en la técnica para la aplicación sistémica. La aplicación oral también es un modo atractivo de administración, porque la infección es una infección del tracto digestivo. Un modo preferido de administración oral es el envasado de la vacuna en cápsulas, conocido y frecuentemente usado en la técnica, que sólo se disgregan en el medio altamente ácido del estómago. Además, la vacuna podría mezclarse con compuestos conocidos en la técnica para potenciar temporalmente el pH del estómago. La aplicación sistémica también es adecuada, por ejemplo, por aplicación intramuscular de la vacuna. Si se sigue esta vía, son muy adecuados los procedimientos convencionales conocidos en la técnica para la aplicación sistémica.

Desde un punto de vista de protección contra la enfermedad, es importante un diagnóstico rápido y correcto de la infección por *Lawsonia intracellularis*.

Por lo tanto, otro objetivo de esta invención es proporcionar herramientas de diagnóstico adecuadas para la detección de infección por *Lawsonia intracellularis*.

Un ensayo de diagnóstico para la detección de *Lawsonia intracellularis* se basa, por ejemplo, en la reacción del ADN bacteriano aislado del animal a ensayar, con sondas específicas o cebadores de PCR basados en la secuencia codificante del gen y la proteína de 19/21 kD. Si está presente el ADN de *Lawsonia intracellularis* en el animal, se unirá específicamente, por ejemplo, a cebadores de PCR específicos y posteriormente llegará a amplificarse en una reacción de PCR. Después, el producto de reacción de PCR puede detectarse fácilmente en electroforesis en gel de ADN.

El ADN puede aislarse mucho más fácilmente de los microorganismos presentes en frotis tomados del tracto digestivo del animal a ensayar. Los libros de texto sobre PCR convencionales proporcionan métodos para determinar la longitud de los cebadores para reacciones de PCR selectivas con ADN de *Lawsonia intracellularis*. Frecuentemente se usan cebadores con una secuencia de nucleótidos de al menos 12 nucleótidos, pero cebadores de más de 15, más preferiblemente 18 nucleótidos, son algo más selectivos. Especialmente, son generalmente más aplicables cebadores con una longitud de al menos 20, preferiblemente al menos 30 nucleótidos. Las técnicas de PCR están ampliamente descritas en (Dieffenbach & Drekler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995)).

Otro ensayo basado en ADN se basa en el crecimiento del material bacteriano obtenido del frotis, seguido por purificación clásica de ADN seguido por hibridación clásica con fragmentos de ADN específicos para la proteína de 19/21 kD marcados con radioactividad o color. Las reacciones tanto de PCR como de hibridación son bien conocidas en la técnica y se describen, entre otros, en Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6).

Por tanto, una realización de la invención se refiere a un ensayo de diagnóstico para la detección de ADN de *Lawsonia intracellularis*. Dicho ensayo comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un fragmento de la misma que es específico por el ADN que codifica la proteína de 19/21 kD. Se entiende que un fragmento que es específico para ese ADN es un fragmento que, en condiciones comparables, se une mejor al ADN de *Lawsonia intracellularis* que al ADN de otras bacterias, debido a su mayor homología con el ADN de *Lawsonia intracellularis*, por ejemplo, un cebador de al menos 12 nucleótidos como se ha descrito anteriormente.

Un ensayo de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* en sueros puede ser, por ejemplo, un ensayo ELISA tipo sándwich convencional simple en el que se recubre con proteína de 19/21 kD o fragmentos antigénicos de la misma de acuerdo con la invención la pared de los pocillos de una placa de ELISA. Un método para la detección de dichos anticuerpo es, por ejemplo, incubación de la proteína de 19/21 kD o fragmentos antigénicos de la misma con suero de mamíferos a ensayar, seguido por, por ejemplo, incubación con un anticuerpo marcado contra el anticuerpo del mamífero relevante. Después una reacción de color puede revelar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis*. Otro ejemplo de un sistema de ensayo de diagnóstico es, por ejemplo, la incubación de una transferencia de Western que comprende la proteína de 19/21 kD o un fragmento antigénico de la misma de acuerdo con la invención, con suero de los mamíferos a ensayar, seguido por análisis de la transferencia.

Por tanto, otra realización de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis*. Dichos ensayos comprenden una proteína o un fragmento de la misma de acuerdo con la invención.

Además, la invención se refiere a métodos para la detección en suero de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis*, donde el método comprende la incubación de suero con la proteína de 19/21 kD o fragmentos antigénicos de la misma de acuerdo con la invención.

Un ensayo de diagnóstico basado en la detección de material antigénico de las proteínas de 19/21 kD específicas de antígenos de *Lawsonia intracellularis* y por lo tanto adecuado para la detección de infección por *Lawsonia intracellularis* puede, por ejemplo, también ser un ensayo ELISA convencional. En un ejemplo de dicho ensayo, se recubren las paredes de los pocillos de una placa de ELISA con anticuerpos dirigidos contra la proteína de 19/21 kD. Después de la incubación con el material a ensayar, se añaden los anticuerpos anti-*Lawsonia intracellularis* marcados a los pocillos. Después, una reacción de color revela la presencia de material antigénico de *Lawsonia intracellularis*.

Por lo tanto, otra realización más de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para la detección de material antigénico de *Lawsonia intracellularis*. Dichos ensayo comprenden anticuerpos contra una proteína o fragmento de la misma de acuerdo con la invención.

Los polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de los mismos de acuerdo con la invención expresados como se han caracterizado anteriormente pueden expresarse para producir anticuerpos, que pueden ser policlonales, monoespecíficos o monoclonales (o derivados de los mismos). Si se desean anticuerpos policlonales, las técnicas para producir y procesar sueros policlonales son bien conocidas en la técnica, (por ejemplo, Mayer and Walter, eds. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, Londres 1987).

Los anticuerpos monoclonales, reactivos contra el polipéptido de acuerdo con la invención (o variantes o fragmentos del mismo) de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse inmunizando ratones de la misma estirpe por técnicas también conocidas en la técnica (Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 497, 1975).

Otra realización más de la invención se refiere a métodos para la detección de material antigénico de *Lawsonia intracellularis*, donde el método comprende la incubación de suero, tejido o fluidos corporales con anticuerpos contra la proteína de 19/21 kD o un fragmento antigénico de la misma de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de L. intracellularis de íleos porcinos infectados

Se recogieron íleos infectados por *L. intracellularis*, confirmado por histopatología y tinción ácido resistente de Ziehl-Neelsen, de cerdos muertos con PE, y se almacenaron a -80°C. Después de descongelar, se aislaron las bacterias *L. intracellularis* de raspados de la mucosa tomados de la pared intestinal infectada. Los raspados del íleo se homogeneizaron repetidamente en PBS en un omnimixer para liberar las bacterias *L. intracellularis* como se describe por Lawson *et al.* (Vet. Microbiol. 10: 303-323 (1985)). El sobrenadante, obtenido después de centrifugación a baja velocidad para retirar los desechos celulares, se filtró a través de filtros de 5,0, 3,0, 1,2 y 0,8 µm (Millipore). El filtrado se centrifugó posteriormente a 8.000 g durante 30 min, dando un sedimento pequeño de bacterias *L. intracellularis*. Estas bacterias se purificaron adicionalmente usando un gradiente de Percoll. La identidad de las bacterias purificadas se evaluó por PCR (Jones *et al.*, J. Clin. Microbiol. 31: 2611-2615 (1993)) mientras que la pureza de las bacterias aisladas (>95%) se evaluó por microscopía con contraste de fase para revelar cualquier bacteria contaminante o desecho intestinal presente.

Preparación de la proteína de la membrana externa de L. intracellularis

Las proteínas de la membrana externa (OMP) de *L. intracellularis* se purificaron esencialmente como se ha descrito por Barenkamp *et al.*, J. Inf. Dis. 148: 1127 (1983)). En resumen, se alteraron por ultrasonidos las bacterias purificadas en gradiente de Percoll. Los fragmentos de membrana se recogieron por centrifugación diferencial, se trataron con Sarkosyl y se sedimentaron las OMP insolubles en Sarkosyl por ultracentrifugación. El sedimento se redisolvió en TRIS/HCl 50 mM (pH 7,5). Las OMP se separaron en un gel de poliacrilamida NuPAGE SDS (NOVEX) BIS/TRIS al 4-12% de acuerdo con la descripción del fabricante (Fig. 1; panel A). En el carril adyacente se cargó la proteína celular total de *L. intracellularis* por razones de comparación. Las proteínas se tiñeron usando Azul Brillante de Coomassie R250. En la preparación de membrana externa podía verse un potenciamiento claramente visible de las bandas de las proteínas a 50, 37, 19/21 kD en comparación con la preparación de células completas, indicando que estas proteínas son OMP.

Antisueros provocados contra Proteínas de la Membrana Externa purificadas y células completas, y después de estimulación experimental

Se provocaron antisueros contra células completas de *L. intracellularis* y OMP purificadas en conejos. Se inyectó por vía intramuscular a los conejos una preparación de células completas (R291) u OMP (R279) en n-GNE (agua:aceite = 45:55). Se recogieron muestras sanguíneas de la vena de la oreja antes de la inmunización. También se obtuvo suero de un cerdo que se había estimulado experimentalmente por vía oral con bacterias purificadas en gradiente de Percoll y había desarrollado signos clínicos y lesiones *post-mortem* típicas para infección por *L. intracellularis* (BIG304T4).

Caracterización antigénica de las proteínas de la membrana externa de L. intracellularis

Para investigar la antigenicidad de las OMP de *L. intracellularis*, se cargó la preparación de OMP en un gel nuPAGE SDS-PAGE (NOVEX) BIS/TRIS al 4-12%. Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) en TRIS 0,025 M/glicina 0,192 M/metanol al 20% básicamente de acuerdo con Towbin *et al.* (Natl. Proc. Acad. Sci., 76: 4350-4354 (1979)). Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 1% en PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST) y después se incubaron con antisuero R279 de conejo (Fig. 1; panel B) y antisuero R291 de conejo (Fig. 1; panel C) durante 1 hora seguido por dos lavados con PBST. Los sueros de conejo se usaron a una dilución de 500 en leche desnatada al 1%/PBST. Se aplicaron inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con HRP, diluidas 1:2000, para detectar los anticuerpos de conejo. Los productos serorreactivos se detectaron por Quimioluminiscencia Potenciada (ECL, Amersham) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ambos antisueros (R279 y R291) reconocieron las proteínas descritas anteriormente. Las señales al 50 y 37 kDa aumentaron principalmente comparando la proteína de célula completa con la preparación de OMP otra vez indicando que estas dos proteínas eran OMP.

Secuenciación de la proteína de la membrana externa

Para propósitos de secuenciación, se cargó la suspensión de OMP en un gel preparativo SDS-PAGE al 10% usando el sistema BioRad Protean II de acuerdo con el manual. Se cortaron del gel cuatro bandas de proteínas (19/21, 37 y 50 kD) y se enviaron a Eurosequence (Groningen, Países bajos) a 4°C. Las secuencias proteicas del extremo N-terminal y de los péptidos aislados obtenidos después de la digestión triptica de la proteína completa se determinaron por degradación de Edman automatizada en un secuenciador Applied Biosystems 120A PTH. Las secuencias proteicas obtenidas (Tabla 1) se usaron para la generación de cebadores de PCR para la amplificación de los genes codificantes. A partir de las secuencias proteicas se concluyó que las proteínas de 19 kD y 21 kD representaban básicamente la misma proteína. La diferencia en el tamaño se debe probablemente a la modificación o modificaciones post-traduccionales.

Amplificación de los genes de la proteína de la membrana externa

Para amplificar los genes de la OMP, se aisló el ADN genómico de *L. intracellularis* de las bacterias purificadas en gradiente de Percoll usando QIAGEN Genomic Tip 100 como se describe por el fabricante. Este ADN se usó en PCR usando cebadores degenerados basados en secuencias proteicas obtenidas. El ADN que codifica la proteína de 50 kD se amplificó usando los cebadores 911 (ggl gtl tgg gaY ttY aa) y 912 (tcc cal gcR taR tcY tt). El ADN que codifica la proteína de 37 kD se amplificó usando los cebadores 990 (tcR aal gcR aaR tlacl cc) y 1021 (gcl gaR gtl acl gcl ag) usando el sistema EXPAND (Boehringer Mannheim) con MgCl₂ 2,5 mM. Después, se tomó 1 µl de la mezcla de PCR y se usó en una PCR anidada usando los mismos cebadores. Esto dio bandas de 1260 pb y 656 pb para las proteínas de 50 kD y 37 kD respectivamente. Los productos de PCR se cortaron del gel de agarosa y se purificaron usando el kit QIAGEN spinprep y se clonaron en pCR-TOPO-blunt II (Novagen). La mezcla de clonación se transformó en *E. coli* TOP10F. Los supuestos transformantes se exploraron para los insertos por PCR de colonias, usando los cebadores M13 directo y M13 inverso. A partir de los supuestos clones que contenían un plásmido con inserto, se aisló el ADN plasmídico usando el kit QIAGEN miniprep. Posteriormente, se secuenciaron los insertos usando el kit PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Sequencing (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante usando los cebadores M13 directo e inverso.

La parte C-terminal de la región codificante de la proteína de 50 kD se amplificó usando una PCR de colas-c usando el cebador 923 (tat agc tgt tga tgg tgc tt) en la primera PCR y 936 (ggt gat aat atg ctt tac t) y un cebador poli-G (ata tgg ggg ggg ggg ggg g) en la PCR anidada. Esto dio una banda de 840 pb, que se clonó y secuenció como anteriormente.

TABLA 1

Secuencias proteicas obtenidas

Proteína	Péptido	Secuencia
19 kD	Interno	AA YEYL VMLGVN
	Interno	PFYVMVW
21 kD	Interno	GTQEYNLALGER
	Interno	AA YEYL VMLGVN
	Interno	PFYVMVW
	Interno	GTQEYNLALGER
37 kD	N-terminal	AEVTASCTKRVG
	Interno	SDLEIFGR
	Interno	GVNF AFD SFALDDTAK
50 kD	N-terminal	IDFKAKGVWDFN
	Interno	KDYAWEVDFDT

Leyendas de las Figuras

Fig. 1. Electroforesis en gel SDS-PAGE e inmunotransferencias de células completas de *L. intracellularis* y la preparación de la membrana externa de *L. intracellularis* sondeada con antisueros de conejo. Carriles: 1, marcadores de precisión preteñidos (BioRad); 2, extracto celular total de *L. intracellularis*; 3, preparación de la membrana externa de *L. intracellularis*. Paneles: A: visualización de las proteínas con Azul Brillante de Coomassie, B: transferencia sondeada con suero surgido contra proteínas de la membrana externa purificadas (R279); C, transferencia sondeada con suero surgido contra células completas (R291). Las proteínas de 19/21 kD, 37 kD y 50 kD se indican con P1/P2, P4 y P5 respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Proteína de la Membrana Externa de *Lawsonia intracellularis* que tiene un peso molecular de 19/21 kD, pudiendo obtenerse dicha Proteína de la Membrana Externa por un proceso que comprende las etapas de

a) someter una preparación de la membrana externa a SDS-PAGE

b) escindir la banda de 19 ó 21 kD del gel

donde dicha proteína tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal que es al menos el 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70% homóloga de la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 2, o una secuencia de aminoácidos interna que es al menos el 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 3.

2. Proteína de *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una homología de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de homología con la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 1, 2 ó 3.

3. Proteína de *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para su uso en un vacuna.

4. Uso de una proteína de *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 para la fabricación de una vacuna para combatir infecciones por *Lawsonia intracellularis*.

5. Vacuna para combatir infecciones por *Lawsonia intracellularis*, **caracterizada** porque comprende una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada** porque comprende un adyuvante.

7. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, **caracterizada** porque comprende un antígeno adicional obtenido de un virus o microorganismo patógeno para los cerdos o información genética que codifica dicho antígeno.

8. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** porque dicho virus o microorganismo patógeno para los cerdos se selecciona entre el grupo de virus de la pseudorrabia, virus de la influenza porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelo rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

9. Vacuna para combatir infecciones por *Lawsonia intracellularis*, **caracterizada** porque comprende anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

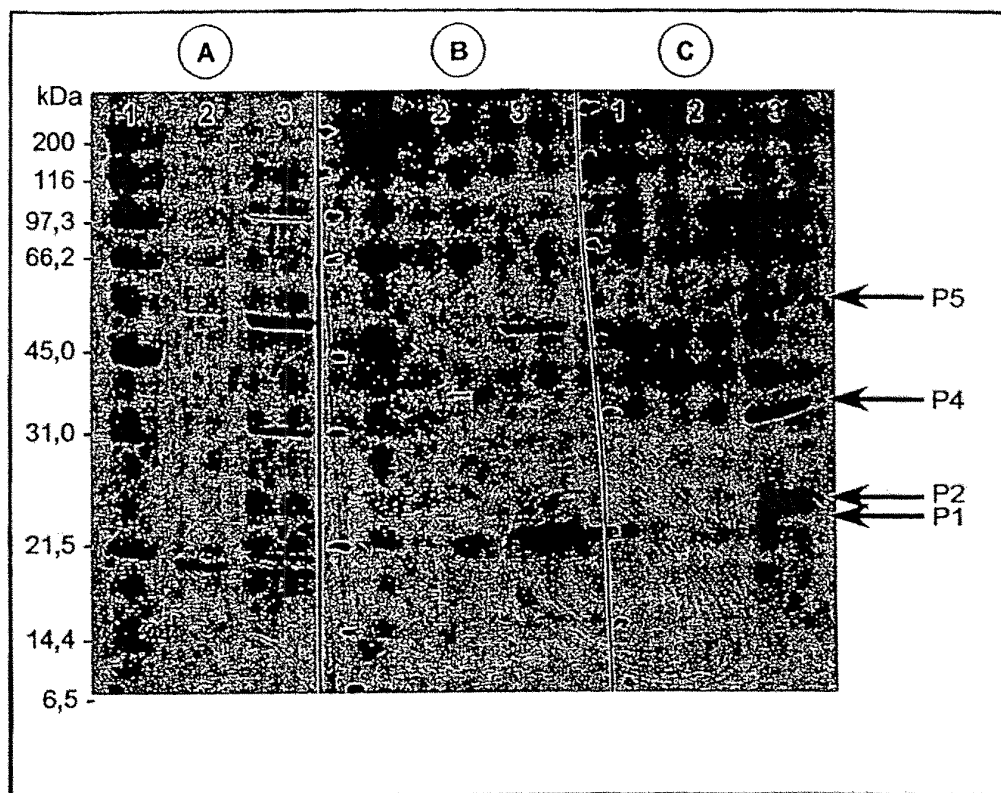
10. Método para la preparación de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 5-8, comprendiendo dicho método mezclar una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Método para la preparación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, comprendiendo dicho método mezclar anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Ensayo de diagnóstico para la detección *in vitro* de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis*, **caracterizado** porque dicho ensayo comprende una proteína o un fragmento de la misma como se define en la reivindicación 1 ó 2.

13. Ensayo de diagnóstico para la detección *in vitro* de material antigénico de *Lawsonia intracellularis*, **caracterizado** porque dicho ensayo comprende anticuerpos contra una proteína o un fragmento de la misma como se define en la reivindicación 1 ó 2.

Figura 1



ES 2 266 090 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AZKO Nobel N.V.

5 <120> Vacuna contra *Lawsonia intracellularis*

<130> Vacuna contra *Lawsonia intracellularis*

10 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> *Lawsonia intracellularis*

20 <400> 1

25 Ala Ala Tyr Glu Tyr Leu Val Met Leu Gly Val Asn
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> *Lawsonia intracellularis*

30 <400> 2

35 Gly Thr Gln Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Gly Glu Arg
1 5 10

40 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> *Lawsonia intracellularis*

45 <400> 3

50 Pro Phe Tyr Val Met Val Trp Thr Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> *Lawsonia intracellularis*

55 <400> 4

60 tatagctgtt gatggtgctt

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> *Lawsonia intracellularis*

65

ES 2 266 090 T3

	<400> 5	
	ggtgataata tgctttact	19
5	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	
	<400> 6	
15	atatgggggg gggggggggg	19
	<210> 7	
	<211> 31	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	
	<400> 7	
25	ggaattccat atgtattgat ttaaggcaa a	31
	<210> 8	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	
35	<400> 8	
	cgcggatccg cgatccttga taatcaagg	30
40	<210> 9	
	<211> 36	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	
	<400> 9	
50	ggaattccat atgaaatga aaaagagcac tctggc	36
	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	
	<400> 10	
60	ccgctcgagg aattgatact tcatatttaa	30
	<210> 11	
	<211> 12	
65	<212> PRT	
	<213> <i>Lawsonia intracellularis</i>	

ES 2 266 090 T3

<400> 11
 Ala Glu Val Thr Ala Ser Cys Thr Lys Arg Val Gly
 1 5 10
 5
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> *Lawsonia intracellularis*
 <400> 12
 15 Gly Val Asn Phe Ala Phe Asp Ser Phe Ala Leu Asp Asp Thr Ala Lys
 1 5 10 15
 <210> 13
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Lawsonia intracellularis*
 25 <400> 13
 Ile Asp Phe Lys Ala Lys Gly Val Trp Asp Phe Asn
 1 5 10
 30
 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> *Lawsonia intracellularis*
 <400> 14
 40 Lys Asp Tyr Ala Trp Glu Val Asp Phe Asp Thr
 1 5 10
 <210> 15
 45 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Lawsonia intracellularis*
 50 <400> 15
 Ala Ala Tyr Glu Tyr Leu Val Met Leu Gly Val Asn
 1 5 10
 55 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> *Lawsonia intracellularis*
 <400> 16
 65 Gly Thr Gln Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Gly Glu Arg
 1 5 10