

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 960 326**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2017 PCT/EP2017/053306**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17140683**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2017 E 17704038 (3)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3417049**

(54) Título: **Extracto de *Streptococcus uberis* como agente inmunogénico**

(30) Prioridad:

15.02.2016 EP 16382060

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2024

(73) Titular/es:

HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U. (100.0%)
Avenida La Selva, 135
E-17170 Amer (Girona), ES

(72) Inventor/es:

**COLLADO GIMBERT, ROSA MARIA y
PRENAFETA I AMARGÓS, ANTONI**

(74) Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 960 326 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Streptococcus uberis* como agente inmunogénico

5 Campo de la técnica

La presente invención se enmarca en el campo de las vacunas y se refiere específicamente a un nuevo agente inmunogénico basado en la bacteria *S. uberis*, para su uso en composiciones vacunales para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.* y por bacterias productoras de biofilm, en especial en el ganado bovino.

Estado de la técnica

15 La mastitis es una patología provocada generalmente por una infección bacteriana que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria y que afecta extensamente al ganado en general, particularmente el bovino, el ovino y el caprino, siendo de especial importancia su incidencia en vacas lecheras, dado que implica pérdidas económicas significativas para la industria láctea a nivel mundial.

20 Los signos clínicos de la mastitis pueden variar desde la aparición de algunas anomalías visibles en la leche, tales como agregados de proteínas o coágulos, posiblemente acompañado de dolor e inflamación de la glándula mamaria, hasta la producción de una secreción compuesta principalmente de agregados proteicos, bacteriemia, septicemia e incluso puede producirse la muerte del animal. La mastitis también puede estar presente en forma subclínica, de forma que la inflamación de la glándula mamaria no crea cambios visibles en la leche o la ubre, aunque las vacas infectadas de forma subclínica producen menos leche y de menor calidad.

25 30 35 La mastitis puede estar provocada por distintos patógenos, entre los que destacan las especies del género *Staphylococcus* y del género *Streptococcus*, en particular *Streptococcus uberis* (en adelante *S. uberis*). *S. uberis* es una bacteria Gram-positiva con una pared celular similar a la de *Staphylococcus sp.*, así como a la de *Streptococcus sp.*, entre las que también destacan *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*. Dentro del género *Streptococcus*, *S. uberis* es el patógeno más comúnmente aislado de casos clínicos y subclínicos de mastitis. En las últimas décadas, se ha convertido en una de las principales causas de mastitis clínica y subclínica en la mayor parte del mundo. *S. uberis* es considerada una bacteria ambiental, difícil de combatir ya que tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse tanto dentro como fuera de la ubre, y está muy extendida en las instalaciones ganaderas. Otros patógenos que provocan mastitis son *S. dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, entre otros.

40 En el momento actual, se persiguen distintas estrategias para prevenir la mastitis o incluso para reducir su incidencia o mitigar sus efectos. Mayormente, las estrategias de prevención se centran en mejorar la higiene y los procedimientos de ordeño, mientras que el tratamiento con antibióticos es la opción preferida para el enfoque terapéutico.

45 Además, en los últimos años, ha aumentado el interés en el desarrollo de estrategias preventivas basadas en la administración de vacunas y, en este sentido, se han descrito en el estado de la técnica distintos agentes inmunogénicos basados en *S. uberis*, para el uso de los mismos en la profilaxis de la mastitis, especialmente la mastitis bovina.

50 55 Algunos documentos, por ejemplo, describen el uso de vacunas "crudas", no purificadas, para la profilaxis de la mastitis, que están basadas en la bacteria *S. uberis* completa o en extractos proteicos de la misma.

Por lo tanto, en el artículo de Finch *et al.*, Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain, Infect. Immun., 1994, 62, 3599-603, se divulga un estudio en donde la vacunación de ganado bovino mediante administración intramamaria de múltiples dosis de bacterias *S. uberis* inactivadas permitió obtener cierta protección en los animales frente a infecciones con cepas homólogas subsiguientes.

60 65 En el artículo de Hill *et al.*, Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1994, 8, 109-118, se describe la vacunación subcutánea de vacas con bacterias *S. uberis* vivas de la cepa 014J y/o con un extracto soluble procedente de la misma cepa, obtenido por tratamiento de las bacterias con mutanolisina y hialuronidasa de tipo X para eliminar las paredes celulares y las cápsulas, y posterior eliminación de los protoplastos por centrifugación. Se encontró que el tratamiento solo con el extracto soluble de *S. uberis* no proporcionó inmunidad a los animales, mientras que las vacas vacunadas por vía subcutánea con bacterias vivas en combinación con la infusión intramamaria posterior del extracto bacteriano mostraron una reducción de la incidencia de mastitis.

Una parte importante de los estudios más recientes relacionados con las vacunas para *S. uberis* se han centrado en la búsqueda de subunidades bacterianas específicas que tengan la capacidad de proporcionar protección frente a las infecciones provocada por *S. uberis*.

Por lo tanto, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO-A-96/41879, se divulga el uso en vacunas del polipéptido cohemolisina de *S. uberis* (factor CAMP) para la prevención y el tratamiento de la mastitis inducida por *S. uberis* en vacas lactantes.

5 En el artículo de Leigh *et al.*, Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitor response and protects against experimental infection in the dairy cow, Vaccine, 1999, 17, 851-857, se describe cómo las vacas vacunadas por administración subcutánea de un concentrado proteico crudo que contenía el activador de plasminógeno de *S. uberis* (PauA), combinado con un adyuvante, proporcionó protección frente a la administración posterior de una cepa virulenta de *S. uberis*.

10 En la solicitud de patente internacional WO-A-01/96381, se describe la producción recombinante de proteínas GapC de unión a plasmina de *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus iniae*, así como su uso en composiciones vacunales para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas, en particular de la 15 mastitis.

20 En el artículo de Prado *et al.*, Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells, Vet. Immunol. Immunopathol., 2011, 141, 201-208, se sugiere el uso de la molécula de adhesión de *S. uberis* recombinante (SUAM, del inglés *S. uberis adhesion molecule*) para la vacunación de vacas lecheras frente a la mastitis, debido a la capacidad observada de los anticuerpos generados para reducir la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de la glándula mamaria *in vitro*.

25 En la solicitud de patente internacional WO-A-2010/041056, se divulga una composición inmunogénica basada en proteínas sortas ancladas a la superficie de *S. uberis* y su uso como vacuna profiláctica o terapéutica frente a infecciones provocadas por *S. uberis*.

30 En la solicitud de patente internacional WO-A-2015/042449, se describen vacunas frente a infecciones provocadas por *Streptococcus* que comprenden como antígenos a determinadas proteínas de *S. uberis*, específicamente la proteína de unión a ferricromo, el factor de elongación TU, una lipoproteína y una serina proteasa.

35 En D. Neil Wedlock *et al.* "Dairy cows produce cytokine and cytotoxic T cell responses following vaccination with an antigenic fraction from *Streptococcus uberis*", 2014, Vet Immunol Immunopathol, vol. 160 (1-2), 51-60, se describen extractos obtenidos de cultivos planctónicos de *S. uberis*.

40 En el momento actual, en el mercado europeo no hay ninguna vacuna con la indicación específica para la mastitis bovina provocada por *S. uberis*. Existe una vacuna llamada "Streptococcus uberis Bacterín" (código de producto 2851.00, de la compañía Hygieia Biological Laboratories (EE. UU.) que se comercializa con una licencia condicional) en el mercado estadounidense. Dicha vacuna está basada en una bacterina clásica obtenida de cultivos inactivados de *S. uberis*, cuyos aislados provienen de casos clínicos y para la que la autorización de comercialización definitiva está pendiente hasta que las reivindicaciones para la mastitis bovina provocada por *S. uberis* estén respaldadas por estudios de eficacia.

45 Las restantes vacunas comerciales que existen en el mercado frente a la mastitis bovina provocada, entre otros, por *S. uberis*, son vacunas polivalentes. Estas vacunas contienen composiciones antigénicas basadas en una mezcla de bacterinas inactivadas clásicas tales como, por ejemplo, MASTIVAC® (Laboratorios Ovejero S.A., (España)): una vacuna polivalente frente a la mastitis bovina que se comercializa en España y que tiene una composición que incluye bacterinas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* J5, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Streptococcus pyogenes*, y *Arcanobacterium pyogenes*. Otro ejemplo es Mastiplus® BR (Laboratório Vitafort Ind. e Com. de Productos Veterinários Ltda. (Brasil)), que se comercializa en Brasil y en cuya composición hay bacterinas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *E. coli*, *Arcanobacterium (Corynebacterium) pyogenes*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter aerogenes*, y *Pasteurella bovis*. Estas vacunas no resuelven el problema de la mastitis clínica y subclínica provocada por *S. uberis*, por lo tanto, se necesitan nuevos desarrollos y nuevas vacunas para luchar contra la mastitis provocada por el género *Streptococcus* sp y especialmente para luchar específicamente contra *S. uberis*.

55 Por lo tanto, a pesar de las distintas propuestas disponibles en el estado de la técnica, todavía existe la necesidad de proporcionar nuevos productos inmunogénicos que sean efectivos para prevenir y/o tratar infecciones provocadas por *Streptococcus* sp., particularmente *S. uberis*, y en especial que sean efectivo para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis en general y de la mastitis bovina en particular.

Objeto de la invención

60 El objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un agente inmunogénico como se define en la reivindicación 1.

Un aspecto que no forma parte de la invención se refiere a un agente inmunogénico que comprende un biofilm procedente del cultivo de una cepa de *S. uberis* productora de biofilm.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un agente obtenible mediante dicho procedimiento como se define en la reivindicación 4.

Otro aspecto de la invención se refiere a un agente inmunogénico para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp* como se define en la reivindicación 5.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna que comprende dicho agente inmunogénico como se define en la reivindicación 7.

Otro aspecto de la invención es una vacuna para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp* como se define en la reivindicación 13.

15 15 Otro aspecto de la invención es una vacuna para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm como se define en la reivindicación 14.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de vacunación que comprende el agente inmunogénico o vacuna de la invención como se define en la reivindicación 15.

Un aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp*.

25 25 Un aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm.

30 Descripción de las figuras

Figura 1

En la Figura 1, en las ordenadas se representa el promedio del aumento de la temperatura, expresado en °C, a las 24 horas después de la infección en el grupo vacunado (GV) y el grupo de control (GC), que se representan en las abscisas. Se observa que el grupo vacunado muestra un menor incremento de la temperatura.

Figura 2

40 En la Figura 2, en las ordenadas se representa el valor medio del log₁₀UFC/g de tejido mamario, 24 horas después de la infección en el grupo vacunado (GV) y en el grupo de control (GC), que se representan en las abscisas. Se observa que el grupo con recuentos de *S. uberis* más bajos corresponde al grupo vacunado con el agente inmunogénico de la invención.

Figura 3

45 En la Figura 3, se representa en ordenadas el valor medio del porcentaje de afectación de la glándula infectada 24 horas después de la infección en el grupo vacunado (GV) y el grupo de control (GC), que se representan en las abscisas. Se observa que el grupo con una menor afectación corresponde al grupo vacunado con el agente inmunogénico de la invención.

Figura 4

50 En la Figura 4, en las ordenadas se representa el promedio de la temperatura rectal, expresado en °C, y en las abscisas los días posinfección (el día 0 corresponde al día de la infección) para el grupo vacunado (■) y el grupo control (◊). Se observó una clara tendencia a una reducción de la temperatura en el grupo vacunado durante los días posteriores a la infección experimental.

55 Figura 5

En la Figura 5, se representa en las ordenadas el valor medio del log₁₀UFC/ml de leche, durante los días posinfección, lo que se representa en las abscisas, para el grupo vacunado (■) y el grupo de control (◊). Se observa que el grupo con recuentos de *S. uberis* más bajos corresponde al grupo vacunado con el agente inmunogénico de la invención. El día de la infección corresponde al día 0 en el eje de las abscisas.

60

Figura 6

65 En la Figura 6, en las ordenadas se representa el valor medio de la producción de leche, expresado en litros, después de la infección (día 0), representado en las abscisas para el grupo vacunado (■) y el grupo de control (◊). Se observa claramente que, después de la infección, el grupo vacunado con el agente inmunogénico de la invención muestra una producción de leche mayor que el grupo de control prácticamente a diario.

Figura 7

En la Figura 7, en las ordenadas se representa el valor promedio de células somáticas por ml (CS/ml), durante los días posinfección, representados en las abscisas, para el grupo vacunado (■) y el grupo de control (○). El día de la infección corresponde al día 0. Se observa que el día 20 del estudio, el recuento de CS/ml de leche es claramente inferior en el grupo vacunado con el agente inmunogénico de la invención, en comparación con el grupo de control. Los resultados indican que a pesar del hecho de que en ambos grupos aumenta el recuento de células somáticas, el grupo vacunado vuelve a los valores normales significativamente más rápido que el grupo no vacunado.

Figura 8

En la Figura 8, se muestran las densidades ópticas a 595 nm correspondientes al cultivo *in vitro* de *S. uberis* con distintas concentraciones (diluciones 1:10 y 1:25) de anticuerpos monoclonales anti-LTA y en su ausencia (grupo de control, GC). Los resultados indican que la presencia de los anticuerpos monoclonales anti-LTA en el cultivo *in vitro* de *S. uberis* inhibe significativamente la formación de biofilm, en comparación con el cultivo en ausencia de tales anticuerpos monoclonales.

Figura 9

En la Figura 9, se muestran las densidades ópticas a 595 nm correspondientes al cultivo *in vitro* de *S. uberis* en presencia (grupo vacunado, GV) y en ausencia (grupo de control, GC) de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención. Los resultados indican que la presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención inhibe significativamente la formación de biofilm por *S. uberis*, en condiciones *in vitro*, en comparación con el cultivo en ausencia de tal suero.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un agente inmunogénico, que comprende las siguientes etapas:

- a) incubar una cepa de *S. uberis* productora de biofilm para obtener un biofilm,
- b) recuperar el biofilm del medio de cultivo,
- c) someter el biofilm obtenido en la etapa b) a un tratamiento térmico por calor llevado a cabo a una temperatura comprendida entre 80 °C y 130 °C, y
- d) descartar la fracción insoluble obtenida después del tratamiento térmico por calor de la etapa c) y conservar el extracto soluble.

Los inventores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para preparar un extracto de biofilm de *S. uberis* que, sorprendentemente, proporciona un agente inmunogénico que es eficaz en composiciones de vacuna frente a infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, especialmente para la prevención de la mastitis provocada por *S. uberis* en animales en general y en el ganado bovino en particular.

A lo largo de la presente descripción y en las reivindicaciones, se entiende que las expresiones en singular precedidas de los artículos "un/una" o "el/la" se entiende que incluyen también, de manera amplia, la referencia al plural, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

En el contexto de la presente invención, se entiende que el término "aproximadamente" haciendo referencia a un valor determinado indica que se acepta una determinada variación para dicho valor, generalmente de +/- el 5 %.

Procedimiento para la preparación del agente inmunogénico

La presente invención está basada en el descubrimiento sorprendente de que un agente inmunogénico obtenido a partir de un biofilm de la bacteria *S. uberis* y tratado térmicamente tiene excelentes propiedades inmunogénicas, de forma que tiene la capacidad de inducir inmunidad en animales frente a la infección por cepas virulentas de *Streptococcus sp.*, preferiblemente por *S. uberis*, cepas, y por bacterias productoras de biofilm.

Un biofilm, como bien sabe el experto en la materia, es un agregado de microrganismos, por ejemplo de bacterias, que se forma adherido a una superficie y que está cubierto por una matriz extracelular constituida de una mezcla de compuestos poliméricos, principalmente polisacáridos, que generalmente se conoce como una sustancia polimérica extracelular (SPE).

La composición de un biofilm básicamente comprende células microbianas, polisacáridos y agua, entre otros productos extracelulares, que permiten que la matriz se adapte a numerosos microambientes y situaciones, tal como se describe en I. W. Sutherland, *The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment*, *Trends in Microbiol.*, 2001, 9(5), 222-227.

En el procedimiento de la invención se utiliza una cepa de *S. uberis* productora de biofilm. Cualquier cepa de *S. uberis* que tenga la capacidad de producir biofilm es adecuada para su uso en este procedimiento.

Existen métodos, que conoce bien el experto en la materia, para identificar bacterias productoras de biofilms. Por

ejemplo, se puede usar el ensayo en microplaca y se describe en G.E. Moore, *Biofilm production by Streptococcus uberis associated with intramammary infections*, 2009, Proyectos de tesis de la University of Tennessee Honors o en Stepanovic et al., *Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*, APMIS, 2007, 115, 891-899.

- 5 En la etapa a) del procedimiento de la invención, se incuba una cepa de *S. uberis* productora de biofilm para obtener un biofilm. Como ocurre con las cepas productoras de biofilms, durante la incubación dicha cepa produce un biofilm que se adhiere a la superficie del recipiente en donde se lleva a cabo el procedimiento de la invención.
- 10 Las bacterias se pueden incubar usando un medio de cultivo convencional, por ejemplo, seleccionado de los siguientes: caldo de tripticasa de soja (TSB, del inglés *trypticase soy broth*), agar de tripticasa de soja (TSA, del inglés *trypticase soy agar*), agar leche, entre otros, y mezclas de los mismos, todos disponibles de forma comercial y bien conocidos por el experto en la materia. Opcionalmente, dichos medios se pueden suplementar con ingredientes adicionales tales como, por ejemplo, sangre, extracto de levadura, glucosa o caseína, o mezclas de los mismos.
- 15 En una realización preferida de la invención, el medio de cultivo comprende caldo de tripticasa de soja (TSB) que contiene triptona y peptona de soja. El TSB se suplementa preferiblemente con extracto de levadura (YE, del inglés *yeast extract*), más preferiblemente se usa TSB complementado con entre el 0,1% y 2% de extracto de levadura, más preferiblemente entre 0,5 % y el 1,5 % e incluso más preferiblemente complementado con 1,2 % de extracto de levadura, donde los porcentajes se expresan en p/v.
- 20 Las bacterias *S. uberis* productoras de biofilm generalmente se incuban en una atmósfera convencional, aunque la incubación se lleva a cabo preferiblemente en una atmósfera que comprende dióxido de carbono entre el 1 % y el 10 %, más preferiblemente alrededor del 5 % de dióxido de carbono.
- 25 La incubación tiene lugar a una temperatura comprendida generalmente entre 30 °C y 45 °C, preferiblemente entre 35 °C y 40 °C e incluso más preferiblemente a aproximadamente 37 °C.
- 30 Las bacterias *S. uberis* se incuban durante un período de tiempo adecuado para el desarrollo del biofilm, generalmente durante un período comprendido entre 24 horas (1 día) y 168 horas (7 días), preferiblemente comprendido entre 36 horas (1,5 días) y 120 horas (5 días), y más preferiblemente comprendido entre 48 horas (2 días) y 72 horas (3 días).
- 35 La cepa de *S. uberis* productora de biofilm puede incubarse sobre cualquier soporte o superficie adecuada para cultivo celular, como bien sabe el experto en la materia. Por ejemplo, pueden usarse placas de cultivo, frascos de cultivo, placas de pocillos o tubos de cultivo, entre otros posibles soportes. Dichos soportes pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de la empresa Corning o DDBiolab, bajo la denominación de Falcon®.
- 40 El procedimiento de la invención incluye una etapa adicional después de la etapa a), que consiste en recuperar el biofilm del medio de cultivo que incluye las células bacterianas que permanecen en suspensión. En esta etapa del procedimiento, una vez que se ha formado el biofilm de *S. uberis* el medio de cultivo junto con las células bacterianas en suspensión se elimina, opcionalmente por decantación, y se desecha. El biofilm formado se recupera y se conserva para la siguiente etapa.
- 45 El procedimiento de la invención incluye una etapa adicional después de la etapa a) y antes de la etapa c), que consiste en recuperar el biofilm del medio de cultivo, un medio que incluye las células bacterianas en suspensión.
- 50 El biofilm producido por la cepa bacteriana de *S. uberis* generalmente está adherido a la superficie donde se ha producido y debe desprenderse de dicha superficie. Desprender el biofilm de la superficie puede llevarse a cabo simplemente mediante medios físicos, por ejemplo, con la ayuda de una espátula o un descamador, si es necesario.
- 55 Como alternativa o adicionalmente, se puede usar una sustancia para facilitar el desprendimiento del biofilm, en particular una proteasa, la cual se añade normalmente en forma de una solución acuosa sobre el biofilm en el mismo soporte de cultivo, mediante lo cual se desprende el biofilm de la superficie y se obtiene en forma de una suspensión acuosa. Posteriormente, se puede separar, por ejemplo, mediante centrifugación.
- 60 Por lo tanto, para recuperar el biofilm, también se puede usar tripsina, normalmente en forma de una solución acuosa, con el objetivo de facilitar el desprendimiento del biofilm. De esta manera, se recupera el biofilm en forma de una suspensión acuosa que contiene tripsina en solución. El residuo sedimentado insoluble formado por el biofilm se separa mediante centrifugación y el sobrenadante, que contiene la solución de tripsina, se desecha.
- 65 En una realización preferida, el procedimiento de la invención incluye la etapa b), que consiste en el uso de tripsina para recuperar el biofilm formado en la etapa a). Opcionalmente, el biofilm se puede purificar a partir de la solución de tripsina, por ejemplo, mediante un procedimiento de centrifugación, normalmente a una velocidad equivalente a entre 10.000 g y 20.000 g durante un período de tiempo de entre 5 y 25 minutos, conservando la fracción insoluble.
- En una realización preferida, el procedimiento de la invención incluye una etapa en donde el biofilm recuperado se

suspende en una solución acuosa, normalmente en agua para inyección, aunque también se pueden usar PBS o soluciones tamponadas análogas, entre otros.

5 Posteriormente, en la etapa c) del procedimiento de la invención el biofilm obtenido en la etapa anterior a), separada del medio de cultivo en la etapa b), y preferiblemente suspendida en una solución acuosa, se somete a un tratamiento térmico por calor, a una temperatura comprendida entre 80 °C y 130 °C, preferiblemente comprendida entre 100 °C y 125 °C y más preferiblemente a aproximadamente 121 °C. Dicho tratamiento generalmente tiene lugar durante un período comprendido entre 5 y 75 minutos, preferiblemente comprendido entre 15 y 50 minutos y más preferiblemente durante aproximadamente 45 minutos.

10 15 Después de la etapa c), el procedimiento de la invención incluye una etapa adicional d) en donde la fracción insoluble se separa del extracto soluble. La fracción insoluble se desecha y el extracto soluble que comprende el agente inmunogénico, resultante del procedimiento de la invención, se conserva y sorprendentemente es adecuado para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente por *S. uberis*.

El procedimiento de la invención incluye la etapa d) de desechar la fracción insoluble obtenida después del tratamiento térmico de la etapa c) y conservar el extracto soluble que comprende el agente inmunogénico de la invención.

20 25 La separación de ambas fracciones puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante centrifugación, normalmente a una velocidad equivalente a entre 10.000 g y 20.000 g durante un período de tiempo comprendido entre 5 y 30 minutos, preferiblemente de 10 a 25 minutos.

La fracción insoluble contiene normalmente las bacterias inactivadas y los componentes insolubles de la matriz extracelular. El sobrenadante comprende el extracto soluble que comprende el agente inmunogénico resultante del procedimiento de la invención.

30 35 Esta etapa adicional contribuye a proporcionar un agente inmunogénico más puro, dado que no incluye las bacterias inactivadas y los componentes insolubles de la matriz extracelular. El uso de un agente inmunogénico que incluye dichos componentes, que se pueden eliminar, también genera una respuesta inmunoprotectora, aunque la cantidad tiene que ajustarse de una manera bien conocida para los expertos en la materia.

Opcionalmente, el agua puede eliminarse, por ejemplo, por liofilización, mediante lo cual el agente inmunogénico se obtiene en forma sólida como un extracto seco.

El agente inmunogénico

Otro aspecto de la invención se refiere al agente inmunogénico obtenible mediante el procedimiento de la invención, en donde el agente inmunogénico proporciona una respuesta inmune protectora contra mastitis y/o infecciones causadas por *Streptococcus sp.* Dicho agente inmunogénico se denomina en lo sucesivo en el presente documento agente inmunogénico de la invención.

40 45 El agente inmunogénico está preferiblemente en forma de una suspensión acuosa, una solución acuosa o liofilizado.

50 55 Un producto o agente inmunogénico, o antígeno, se entiende como un componente de una vacuna o composición farmacéutica que tiene la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un animal, que lo protege frente a la infección posterior por un patógeno y/o frente a las patologías asociadas con dicha infección. Se entiende que dicha respuesta inmunitaria incluye cualquier tipo de inmunidad, ya sea de tipo celular o de tipo humorral, como bien sabe el experto en la materia.

En el marco de la presente invención, el término animal se refiere en sentido amplio a cualquier animal susceptible a infecciones provocadas por *Streptococcus sp.* y en particular por *S. uberis*, de forma más particular se refiere a mamíferos, incluyendo seres humanos. Preferiblemente, el animal es un rumiante, más preferiblemente son vacas (o ganado bovino), ovejas (ganado ovino), cerdos (o ganado porcino) o cabras (o ganado caprino). En una realización particularmente preferida, el agente inmunogénico de la invención se usa para la inmunización de ganado bovino.

Dicha respuesta inmunitaria protectora puede determinarse por una menor susceptibilidad de los animales tratados a una infección posterior por *S. uberis*, en particular, a cepas de *S. uberis* distintas de las usadas para preparar dicho producto inmunogénico y/o a las patologías asociadas de las mismas, en particular la mastitis, comparativamente con respecto a los animales no tratados.

60 Como se muestra en los ensayos de eficacia que se describen en la sección de Ejemplos, se confirma sorprendentemente que dicho agente es eficaz en la prevención de infecciones provocadas por *S. uberis*.

65 En particular, en dicha sección se proporcionan los resultados obtenidos cuando las vacas se vacunaron con el agente inmunogénico de la invención antes del parto. Se observó una clara reducción de la temperatura 2 días después de la

infección, una reducción sustancial de las UFC/ml en leche, un aumento en la producción de leche en comparación con el grupo control y un recuento más bajo de células somáticas (CS/ml) en la leche al final del estudio.

5 Por ello, es un aspecto de la invención el uso del agente inmunogénico de la invención para la preparación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*. En una realización preferida, el agente inmunogénico de la invención se utiliza para la preparación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*.

10 10 En otra realización preferida, el agente inmunogénico de la invención se utiliza para la preparación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica.

15 15 En otra realización preferida, el agente inmunogénico de la invención se utiliza para la preparación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis subclínica.

20 20 Por ello, es un aspecto de la invención el agente inmunogénico de la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*; preferiblemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*; preferiblemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica y/o la mastitis subclínica.

25 25 En el caso de la mastitis clínica, en animales no vacunados pueden identificarse los siguientes signos, entre otros, en comparación con los animales vacunados: inflamación de la glándula mamaria o aumento de la temperatura rectal, aparición de anomalías visibles en la leche, tal como agregados de proteínas o coágulos, posiblemente acompañado de dolor e inflamación de la glándula mamaria, incluso la producción de una secreción compuesta principalmente de agregados proteicos. Con respecto a los signos subclínicos de la mastitis, pueden indicarse los siguientes, entre otros: inflamación de la glándula mamaria que no genera cambios visibles en la leche o la ubre, menor producción de leche y leche de menor calidad.

Inhibición de la formación de biofilm por ácidos teicoicos

35 35 El agente inmunogénico de la invención es un producto de composición compleja. Dicha composición está determinada por el procedimiento usado en su preparación, que incluye la incubación de una cepa de *S. uberis* productora de biofilm para obtener un biofilm y el tratamiento térmico del biofilm producido por dicha cepa. Dicho agente comprende polisacáridos capsulares y además, entre los componentes se han identificado ácidos teicoicos, tales como ácidos lipoteicoicos. Además, se observa que se detecta un aumento sustancial de la presencia de anticuerpos anti-LTA en el plasma y en la leche en las vacas que han recibido una vacuna basada en el agente inmunogénico de la invención.

40 40 Como se divulga en Brown *et al.*, Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria, Annu. Rev. Microbiol., 2013, 67, 313-336, los ácidos teicoicos incluyen tanto ácidos lipoteicoicos (LTA, del inglés *lipoteichoic acids*) que están anclados en la membrana bacteriana a través de un glucolípido, como ácidos teicoicos de pared (WTA, del inglés *wall teichoic acids*), que están unidos covalentemente al peptidoglucano.

45 45 Los ácidos lipoteicoicos (LTA) son constituyentes de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, cuya estructura varía en función de la especie, y generalmente contienen una larga cadena de glicerol fosfato como unidad repetitiva, que se une a la membrana celular mediante un glucolípido y puede sustituirse adicionalmente por azúcares y aminoácidos, particularmente por D-alanina, por ejemplo, como se describe en el artículo de Czabanska *et al.*, Structural analysis of the lipoteichoic acids isolated from bovine mastitis *Streptococcus uberis* 233, *Streptococcus dysgalactiae* 20333 and *Streptococcus agalactiae* 0250, Carbohydrate Res., 2012, 361, 200-205.

55 55 Como se muestra en los Ejemplos, se observa que la formación de biofilms *in vitro* por *S. uberis* se inhibe significativamente tanto en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-LTA como en presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención.

60 60 Por lo tanto, la inhibición de la formación de biofilms por la presencia de anticuerpos monoclonales anti-LTA y en presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención produce una inhibición de la adhesión del microorganismo a las células epiteliales y, en consecuencia, reduce la probabilidad de colonización/infección por *S. uberis*.

65 65 Un aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente para su uso en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*. En una realización que no forma parte de la invención, la composición farmacéutica también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente

aceptable. Los vehículos y adyuvantes adecuados se describen en la siguiente sección, correspondiente a las vacunas.

En una realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para su uso en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*.

Otro aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm.

Como ya se ha mencionado, existen métodos, que conoce bien el experto en la materia, para identificar bacterias productoras de biofilms. Los ejemplos de bacterias productoras de biofilm son, entre otros, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Actenomyces israelii*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae* y *Burholderia cepacia*.

En una realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica.

En otra realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis subclínica.

En una realización preferida que no forma parte de la invención, la composición farmacéutica comprende ácidos lipoteicoicos procedentes de *Streptococcus uberis*. En una realización más preferida, los ácidos lipoteicoicos son de un agente inmunogénico que comprende un biofilm tratado térmicamente por calor del cultivo de una cepa de *S. uberis* productora de biofilm.

30 Vacunas

Un aspecto de la invención se refiere a una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del agente inmunogénico de la invención.

Dicha vacuna es adecuada para proporcionar una respuesta inmunoprotectora frente a infecciones provocadas por *S. uberis* y/o frente a las patologías derivadas de la infección por *S. uberis*, en particular frente a la mastitis.

Como se muestra en los resultados experimentales proporcionados en los ejemplos, dicha vacuna también es adecuada para inhibir la formación de biofilms de bacterias productoras de biofilm.

La expresión "inmunológicamente efectiva" significa que la cantidad del agente inmunogénico administrada en el procedimiento de vacunación, ya sea en una dosis única o en diversas dosis, es suficiente para inducir una respuesta inmunoprotectora efectiva en el animal vacunado frente a una infección por formas virulentas de *Streptococcus sp.*, preferiblemente por *S. uberis*.

Dicha respuesta protectora se puede evaluar, por ejemplo, por la ausencia o eliminación de bacterias virulentas o por la reducción de su número en los animales vacunados con respecto a los animales no vacunados, o por la ausencia de signos clínicos de infección, es decir, la no manifestación de ningún signo de mastitis clínica o subclínica, o por una atenuación o reducción de dichos signos en los animales vacunados. En el caso de la mastitis clínica, pueden indicarse los siguientes signos, entre otros: inflamación de la glándula mamaria o aumento de la temperatura rectal, aparición de anomalías visibles en la leche, tal como agregados de proteínas o coágulos, posiblemente acompañado de dolor e inflamación de la glándula mamaria, incluso la producción de una secreción compuesta principalmente de agregados proteicos. Con respecto a los signos subclínicos de la mastitis, pueden indicarse los siguientes, entre otros: inflamación de la glándula mamaria que no da cambios visibles en la leche o la ubre, menor producción de leche y leche de menor calidad.

En general, la vacuna comprende una cantidad del agente inmunogénico de la invención que comprende de 1 a 50 mg de extracto seco por dosis, preferiblemente que comprende de 2 a 25 mg por dosis y más preferiblemente que comprende de 4 a 12 mg por dosis.

La cantidad inmunológicamente efectiva del antígeno de la presente invención puede variar en función de la especie, la edad y el peso del animal a vacunar, también en función de la salud y el estado físico del mismo, así como del modo de administración. Habitualmente, la cantidad inmunológicamente efectiva fluctúa dentro de un cierto rango y el experto en la materia no tiene ninguna dificultad para determinar dicha cantidad mediante ensayos rutinarios.

En una realización de la invención, la vacuna también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un

adyuvante farmacéuticamente aceptable.

El propio vehículo también puede actuar como un adyuvante, en particular cuando la vacuna comprende una fase acuosa y una fase oleosa, y está en forma de una emulsión.

5 Generalmente, la vacuna se administra en forma líquida, como una solución, emulsión o suspensión; preferiblemente está en forma de una emulsión. Además, puede estar en una forma sólida que se disuelve, suspende o emulsiona en un vehículo líquido antes de la administración.

10 Los vehículos adecuados para preparar la vacuna en forma líquida incluyen agua o una solución salina isotónica, es decir, con una concentración de sal igual a la del medio celular fisiológico, o un aceite, o el líquido de cultivo en donde se cultivan las bacterias, o mezclas de los mismos.

15 Adicionalmente, si se desea, el vehículo puede incluir otras sustancias auxiliares o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores (por ejemplo, tampón fosfato), agentes estabilizantes tales como hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, almidón o dextranos) o proteínas (por ejemplo, albúmina, caseína, seroalbúmina o leche desnatada).

20 Las características fisicoquímicas de los excipientes, así como el nombre de los productos comerciales con los cuales se comercializan, se pueden encontrar en el libro de R.C. Rowe *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4^a edición, Pharmaceutical Press, Londres, 2003 [ISBN: 0-85369-472-9].

25 Los adyuvantes, como es bien conocido en la técnica, son estimulantes inespecíficos del sistema inmunitario que, administrados junto con el antígeno, hacen que la respuesta inmunitaria sea más eficaz. Algunos ejemplos de adyuvantes son: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio, muramil dipéptidos, vitamina E, escualano, escualeno, *ginseng*, cimosano, glucanos, dimetilaminoetil-dextrans, dextrans, polímeros en bloque no iónicos, monofosforil lípido A, aceite vegetal, saponinas, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, emulsiones de tipo W/O, O/W, W/O/W, y mezclas de los mismos.

30 30 Las emulsiones se definen como la dispersión de un líquido que forma la fase dispersa, en un segundo líquido que es la fase continua en donde la primera fase no es miscible; en particular, las fases son agua y aceite. Las emulsiones pueden ser de tipo W/O, O/W, W/O/W, en función del tipo de tensioactivo utilizado como el emulsionante y también en función de la relación entre las dos fases.

35 35 En una realización de la invención, la vacuna está en forma de una emulsión, de forma que comprenda una fase acuosa, una fase oleosa y un tensioactivo que actúa como un agente emulsionante. El agente inmunogénico de la invención normalmente se disuelve en la fase acuosa.

40 40 En una realización particularmente preferida, la vacuna comprende un adyuvante basado en una combinación de un aceite mineral y un producto obtenido a partir de un ácido graso y un azúcar alcohol tal como, por ejemplo, los comercializados por la empresa SEPPIC con la denominación comercial Montanide™. Las emulsiones del tipo W/O/W se pueden preparar con dicho adyuvante.

45 45 Preferiblemente, la vacuna también comprende un adyuvante adicional que se selecciona de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio, muramil dipéptidos, vitamina E, escualano, *ginseng*, cimosano, glucanos, dimetilaminoetil-dextrans, dextrans, polímeros en bloque no iónicos, monofosforil lípido A, saponinas y mezclas de los mismos.

50 50 En una realización más preferida de la invención, la vacuna comprende monofosforil lípido A.

55 55 El monofosforil lípido A (MPLA o MPL) es un adyuvante conocido para la formulación de vacunas que se obtiene a partir de lipopolisacáridos bacterianos, normalmente del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota*, por ejemplo, el disponible comercialmente de la empresa SIGMA con la denominación MPL™, *monofosforil de Salmonella minnesota Re 595 (mutante Re)*" (producto L 6895). En el contexto de la presente invención, el monofosforil lípido A también incluye los derivados y análogos sintéticos de los mismos que también son adecuados como adyuvantes. Entre los derivados de monofosforil lípido A utilizados como adyuvantes, destaca el derivado 3-deacilado (3D-MPL o 3D-MPLA), por ejemplo, el disponible en el mercado de la empresa SIGMA con la denominación MPL™. Además se pueden usar análogos sintéticos del monofosforil lípido A, por ejemplo, los descritos en la solicitud de patente WO2008/153541-A1 o los disponibles en el mercado de las empresas Avanti Polar Lipids (producto PHAD™) o AdipoGen (producto AG-CU1-0002).

60 60 Las vacunas pueden administrarse por las siguientes vías: oral, tópica, transdérmica, transmucosal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intramamaria, preferiblemente se administran por las siguientes vías: intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intramamaria, más preferiblemente se administran por vía intramuscular.

Dicha vacuna se puede preparar de acuerdo con los métodos normalmente utilizados por el experto en la materia para la preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas para las distintas formas de administración, como se describe, por ejemplo, en el manual Remington The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2000 [ISBN: 0-683-306472].

5 El volumen habitual de una dosis de una vacuna inyectable como la de la invención está comprendido entre 0,5 ml y 5 ml, preferiblemente entre 1 ml y 3 ml, y más preferiblemente entre 1 ml y 2 ml.

10 Como se describe en los ensayos de eficacia de los ejemplos, la vacuna de acuerdo con la presente invención es eficaz en la protección de vacas en lactación frente a la infección por cepas virulentas de *S. uberis*, como se confirma por una clara reducción en el recuento de bacterias en la leche, 14 y 19 días después de la infección, y por una mejora en los signos clínicos de mastitis. La vacuna también es eficaz en un modelo experimental en conejos, observándose una reducción de los signos clínicos y una notable reducción en el recuento de *S. uberis* en el tejido mamario a las 24 horas o a las 48 horas después de la infección, con respecto a los animales no vacunados.

15 Además se ha observado en animales vacunados con la vacuna de la invención una reducción del recuento de *S. uberis* en el tejido mamario a las 24 horas posinfección, en comparación con animales vacunados con una bacterina clásica, obtenida de una cepa de *S. uberis* inactivada por tratamiento con formaldehído.

20 Otro aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a una vacuna que comprende el agente inmunogénico de la invención para el uso de la misma en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*; preferiblemente para su uso en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*

25 En una realización preferida, la invención se refiere a una vacuna para uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para su uso en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*.

30 En otra realización preferida, la invención se refiere a una vacuna para uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm.

En otra realización preferida, la invención se refiere a una vacuna para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica.

35 En otra realización preferida, la invención se refiere a una vacuna para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis subclínica.

40 En el marco de la presente invención, el término prevención se refiere a la administración de la vacuna con un objetivo preventivo o profiláctico, es decir, dirigido a prevenir o retrasar la aparición de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, en particular por *S. uberis*, o dirigido a reducir su incidencia. El término tratamiento se refiere a la administración de la vacuna con un objetivo terapéutico, es decir, dirigido a eliminar, reducir, mejorar o aliviar los síntomas de mastitis y/o de la infección por *Streptococcus sp.*, en particular por *S. uberis*, cuando estos ya se han mostrado.

45 En el marco de la presente invención, mastitis y/o infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, en particular por *S. uberis*, como se ha indicado anteriormente, se refiere en general a su efecto sobre cualquier animal que sea susceptible a infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, en particular por *S. uberis*, normalmente mamíferos, preferiblemente rumiantes, más preferiblemente vacas (o ganado bovino), ovejas (o ganado ovino), cerdos (o ganado porcino) o cabras (o ganado caprino).

55 En una realización preferida, la vacuna que comprende el agente inmunogénico de la invención se usa para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis en ganado bovino (o mastitis bovina), más preferiblemente la mastitis provocada por *S. uberis* e incluso más preferiblemente se usa para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis bovina en vacas lecheras.

Los animales pueden vacunarse en cualquier momento adecuado. Por lo tanto, la vacuna se puede administrar de manera profiláctica a los animales que están en riesgo de infectarse por *Streptococcus sp.*, en particular por *S. uberis*.

60 En una realización particularmente preferida, la vacuna que comprende el agente inmunogénico de la invención se usa de forma profiláctica para la prevención de la mastitis.

65 La vacuna se puede administrar en una o dos dosis. Una vacunación de múltiples dosis, como es bien sabido en la técnica, consiste en la administración de una primera dosis inmunizante, seguido de una o más dosis adicionales que actúan como dosis de refuerzo. El número de dosis y el intervalo de tiempo entre ellas que son más adecuados para la vacunación, se pueden determinar de acuerdo con pruebas de rutina.

En una realización de la invención, la vacuna es de una administración de dosis única.

5 En otra realización de la invención, la vacuna se administra en más de una dosis, preferiblemente en 2 o en 3 dosis, más preferiblemente en 3 dosis. Las distintas dosis se administran preferiblemente con un intervalo de tiempo comprendido de 10 y 70 días, más preferiblemente de entre 20 y 60 días.

10 La vacuna puede comprender adicionalmente una combinación del agente inmunogénico obtenible mediante el procedimiento de la invención con uno o más agentes inmunogénicos adicionales.

15 Los agentes inmunogénicos que se pueden combinar con el agente inmunogénico de la invención incluyen: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Mycoplasma bovis* y *Staphylococcus aureus*, entre otros, preferiblemente *S. agalactiae*, *S. aureus* y/o *E. coli*.

20 Otro aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso como una vacuna en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente para su uso como una vacuna en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*

25 En una realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso como una vacuna en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para su uso como una vacuna en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*.

30 Otro aspecto que no forma parte de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso como una vacuna en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm.

35 En una realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso como una vacuna en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica.

En otra realización preferida que no forma parte de la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácidos teicoicos, preferiblemente ácidos lipoteicoicos, para su uso como una vacuna en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis subclínica.

Kit de vacunación

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de vacunación para vacunar animales frente a la infección por *S. uberis* y especialmente para vacunar animales frente a la mastitis.

Dicho kit de vacunación comprende un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del agente inmunogénico de la invención o de la vacuna de la invención.

45 En una realización preferida, dicho agente inmunogénico o dicha vacuna están en un único recipiente listo para usar.

En una realización preferida, el agente inmunogénico está en forma liofilizada.

50 En otra realización preferida, el kit también comprende un segundo recipiente que contiene un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esta realización es especialmente apropiada en el caso de usar el agente inmunogénico en forma liofilizada.

En otra realización preferida, el kit también comprende un manual o prospecto informativo que contiene la información para la administración del agente inmunogénico o la vacuna de la invención.

55 Por ello, es un aspecto de la invención el kit de vacunación para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.* o por bacterias productoras de biofilm, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp* o por bacterias productoras de biofilm; preferiblemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*, preferiblemente para la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *S. uberis*; preferiblemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis clínica y/o la mastitis subclínica, y está preferiblemente acompañado de un manual o prospecto informativo que contiene la información para la administración del agente inmunogénico o la vacuna de la invención.

Ejemplos**Ejemplo 1 Preparación del agente inmunogénico**

La cepa 5616 de *S. uberis* se usó en el procedimiento para preparar el agente inmunogénico de la invención, que es un aislado de campo obtenido de un caso de mastitis bovina clínica en España. Esta cepa era una productora de biofilm, como se comprobó en el ensayo de microplaca descrita en G.E. Moore, Biofilm production by *Streptococcus uberis* associated with intramammary infections, 2009, Proyectos de tesis de la University of Tennessee Honors.

En primer lugar se preparó un inóculo suspendiendo en agua para inyección estéril las bacterias liofilizadas, hasta obtener una concentración de 10^9 bacterias/ml, infectando posteriormente un medio de cultivo TSB + EL al 0,5 % con dicha suspensión, de acuerdo con una proporción de 1/100 e incubando durante 16 horas a 37 °C.

Después, se infectó un tubode cultivo celular tipo Falcon® de 225 cm² (DDBiolab) con 100 ml de una mezcla con una proporción de 1:100 preparada con el inóculo previamente preparada y TSB + EL al 0,5 %, y se incubó durante 4 días en un horno a 37 °C, en una atmósfera con un contenido de dióxido de carbono aproximadamente al 5%.

Una vez acabado el cultivo, el medio se retiró de la botella de cultivo, incluyendo las células bacterianas en suspensión, y se añadieron 40 ml de una solución acuosa de tripsina (solución de tripsina 1x, Sigma-Aldrich) y se mantuvo durante 15 minutos con agitación a una temperatura de 37 °C.

El contenido de la botella se vació y la suspensión obtenida se centrifugó a 15.300 g durante 15 minutos, desechándose el sobrenadante.

El residuo sedimentado se resuspendió en 0,5 ml de agua para inyección y dicha suspensión se calentó después hasta 121 °C durante 45 minutos. Después, se centrifugó a 15.300 g durante 15 minutos y se conservó el sobrenadante, mientras que el residuo sedimentado fue desechar.

La solución sobrenadante se liofilizó para obtener el agente inmunogénico seco.

Ejemplo 2 Ensayo de eficacia de la vacuna en conejas en lactación

Se inmunizó un grupo de 20 conejas en lactación mediante la administración subcutánea de 1 ml de una vacuna que contenía una solución del agente inmunogénico obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1, a una concentración de 4 mg/ml, formulada con un adyuvante oleoso de la serie Montanide™ (SEPPIC) en una proporción de solución acuosa:adyuvante de 1:1, en los días 13 y 27 de la gestación. Las diferencias se compararon con un grupo de control de 20 conejos. La infección se llevó a cabo por vía intramamaria mediante la inyección de 100 µl de una suspensión de una cepa de *S. uberis* virulenta a 10^3 UFC/ml, 15-20 días después del parto de la última coneja.

Para determinar la eficacia de la vacuna, se determinaron los siguientes parámetros para los animales vacunados e infectados, en relación al grupo control no vacunado e infectado: temperatura rectal, recuento de las UFC/g de tejido a las 24 horas posinfección y signos clínicos locales en la glándula mamaria infectada.

Los datos experimentales se procesaron estadísticamente mediante el programa SPSS 14.0. Se llevó a cabo un análisis ANOVA si los resultados seguían una distribución normal; de lo contrario, se usaron tests no paramétricos tal como el test U de Mann-Whitney o el test de la Chi al cuadrado en el caso de 2 grupos.

Los resultados demostraron claramente la eficacia del agente inmunogénico de la invención para prevenir infecciones provocadas por *S. uberis*, ya que se observó:

- Una reducción del promedio de la temperatura 24 horas después de la infección (Figura 1),
- Una reducción de las UFC/g de tejido a las 24 horas después de la infección (Figura 2) y
- Una reducción de la afectación de la glándula afectada después de la infección (Figura 3)

Ejemplo 3 Ensayo de eficacia de la vacuna en vacas en lactación

Se inmunizó un grupo de 10 vacas en lactación a las que se les administró, por la vía intramuscular, 2 ml de una vacuna que contenía el agente inmunogénico obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1, a una concentración de 4 mg/ml, formulada con un adyuvante oleoso de la serie Montanide™ (SEPPIC) en una proporción de solución acuosa:adyuvante de 1:1, 31 y 10 días antes de la fecha estimada de parto. Las diferencias se compararon con un grupo de control formado por 10 vacas. La infección tuvo lugar por la vía intramamaria, mediante la inyección de 5 ml de una suspensión de una cepa de *S. uberis* virulenta a 10^2 UFC/ml, 16 días después de la fecha estimada de parto.

Para determinar la seguridad de la vacuna, se determinaron los siguientes parámetros para los animales vacunados e infectados, en relación al grupo control no vacunado e infectado: la temperatura rectal, los recuentos de las UFC/ml y las CS/ml (CS = células somáticas) en la leche posinfección y los signos clínicos locales en la mama infectada.

La respuesta serológica inducida en las vacas inmunizadas también se analizó usando la vacuna experimental. Los sueros se analizaron mediante ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos frente a *S. uberis*.

5 Para comprobar la eficacia de la vacunación, se evaluaron después de la inmunización los posibles signos clínicos observados en las vacas. También se evaluaron los signos clínicos y la mortalidad de los terneros después del alumbramiento, para descartar un posible efecto negativo de la vacunación en los animales.

10 Los datos experimentales se procesaron estadísticamente mediante el programa SPSS 14.0. Se llevó a cabo un análisis ANOVA si los resultados seguían una distribución normal; de lo contrario, se usaron tests no paramétricos tal como el test U de Mann-Whitney o el test de la Chi al cuadrado en el caso de 2 grupos.

En relación con la temperatura rectal durante la vacunación, no se observaron diferencias entre los grupos durante los días anteriores a la vacunación y la revacunación, ni durante los tres días siguientes, cuando se registró la temperatura.

15 Los resultados demostraron claramente la eficacia del agente inmunogénico de la invención para prevenir infecciones provocadas por *S. uberis*, dado que después de la infección se observó lo siguiente en el grupo vacunado con respecto al grupo de control:

- 20
- Una reducción de la temperatura 2 días después de la infección (Figura 4),
 - Una reducción de las UFC/ml en la leche (Figura 5),
 - Un aumento de la producción de leche en comparación con el grupo de control (Figura 6), y
 - Un recuento más bajo de células somáticas (CS/ml) en la leche al final del estudio (Figura 7).

25 Por lo tanto, se puede concluir que el agente inmunogénico de la invención es eficaz para prevenir la mastitis provocada por *S. uberis* y que es adecuado para la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*, preferiblemente por *S. uberis*.

Ejemplo 4 Inhibición de la producción de biofilm *in vitro* por la presencia de anticuerpos monoclonales anti-LTA en cultivos de *S. uberis*

30 En este ensayo, se cultivó la cepa de *S. uberis* en presencia de cuatro concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-LTA, en una micropalca de 96 pocillos, siguiendo sustancialmente la metodología divulgada en Stepanovic *et al.*, (ob. cit.).

35 En este ensayo se usó la cepa de *S. uberis* referenciada como 5616. Para propagar y cultivar la cepa se usó TSB + EL al 0,5 % a pH 7,5, en un incubador ajustado a 37 °C y CO₂ al 5 %, durante 20 h y 24 h, respectivamente.

40 El anticuerpo monoclonal anti-LTA se adquirió en Hycult Biotech (Países Bajos), N.º de catálogo HM2048, que muestra una concentración de > 200 µg/ml, en un medio de cultivo con un bajo nivel de endotoxinas que contiene azida sódica al 0,02 %.

Las diluciones de anticuerpo monoclonal utilizadas en este ensayo fueron: 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100.

Además se preparó un cultivo de control de *S. uberis* sin anticuerpo monoclonal.

45 Las cepas se incubaron en los pocillos sin agitación. Para cada referencia se usaron 8 pocillos.

Después de la incubación se registró la densidad óptica a 550 nm para comprobar la capacidad de crecimiento de los microorganismos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

50 Después, los pocillos se decantaron y se lavaron con PBS (pH 7,3), y se secaron aproximadamente 1 h a 37 °C. Los tubos secos se tiñeron con cristal violeta (al 0,1 %). Se eliminó el exceso de tinción y los pocillos se lavaron con agua estéril.

55 El colorante se solubilizó con etanol al 95 % y se registró la densidad óptica a 595 nm para evaluar la inhibición de la producción de biofilm.

Los resultados obtenidos para cada grupo se muestran en la Tabla I:

TABLA I

Grupo	DO ₅₉₅
ACM 1:10	0,503*
ACM 1:25	0,975*
ACM 1:50	1,216

ACM 1:100	1,265
Grupo de control (GC)	1,138

en donde * muestra que los resultados fueron estadísticamente significativos a valores de $p < 0,05$, en comparación con el grupo de control de acuerdo con el análisis ANOVA de un factor utilizando el programa informático SPSS v22 (IBM Analytics).

- 5 En la Figura 8, se representan las densidades ópticas a 595 nm correspondientes al cultivo *in vitro* de *S. uberis* con distintas concentraciones (diluciones 1:10 a 1:25) de anticuerpos monoclonales anti-LTA y en su ausencia (grupo de control, GC).

10 Los resultados indican que la presencia de los anticuerpos monoclonales anti-LTA en el cultivo, a diluciones de 1:10 y 1:25, inhibe significativamente la formación de biofilm en condiciones *in vitro*, en comparación con el cultivo en ausencia de tales anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 5 Inhibición de la producción de biofilm *in vitro* en cultivos de *S. uberis* por la presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico del Ejemplo 1

15 En este ensayo, se cultivó la cepa de *S. uberis* en presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico del Ejemplo 1. En este estudio se usó la cepa de *S. uberis* referenciada como 5616. Para propagar y cultivar la cepa se usó TSB + EL al 0,5 % a pH 7,5, en un incubador ajustado a 37 °C y CO₂ al 5 %, durante 20 h y 24 h, respectivamente.

20 Se usó el suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, a una dilución de 1:2000 en la referencia designada como grupo vacunado (GV).

Además se preparó un cultivo de control (GC) de *S. uberis* sin suero de una animal vacunado.

25 Las cepas se incubaron en los pocillos sin agitación. Para cada referencia se usaron 8 pocillos.

Después de la incubación se registró la densidad óptica a 550 nm para comprobar la capacidad de crecimiento de los microorganismos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos.

30 Después, los pocillos se decantaron y se lavaron con PBS (pH 7,3), y se secaron aproximadamente 1 h a 37 °C. Los tubos secos se tiñeron con cristal violeta (al 0,1 %). Se eliminó el exceso de tinción y los pocillos se lavaron con agua estéril.

35 El colorante se solubilizó con etanol al 95 % y se registró la densidad óptica a 595 nm para evaluar la inhibición de la producción de biofilm.

40 En la Figura 9, se representan las densidades ópticas a 595 nm correspondientes al cultivo *in vitro* de *S. uberis* en presencia (grupo vacunado, GV) y en ausencia (grupo de control, GC) de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención.

Los resultados indican que la presencia de suero de un animal vacunado con el agente inmunogénico de la invención inhibe significativamente (valor de $p < 0,05$, test de t de Student) la formación de biofilm en condiciones *in vitro*, en comparación con el cultivo en ausencia de tal suero.

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un agente inmunogénico, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) incubar una cepa de *S. uberis* productora de biofilm para obtener un biofilm,
 - b) recuperar el biofilm del medio de cultivo,
 - c) someter el biofilm obtenido en la etapa b) a un tratamiento térmico por calor llevado a cabo a una temperatura comprendida entre 80 °C y 130 °C, y
 - d) descartar la fracción insoluble obtenida después del tratamiento térmico por calor de la etapa c) y conservar el extracto soluble.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo en una atmósfera que comprende dióxido de carbono entre el 1% y el 10%.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque en la etapa b) el tratamiento térmico por calor se lleva a cabo durante un período comprendido entre los 5 y 75 minutos.
- 20 4. Un agente inmunogénico obtenible mediante el procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente inmunogénico proporciona una respuesta inmune protectora contra mastitis y/o infecciones causadas por *Streptococcus sp.*
5. Un agente inmunogénico como se define en la reivindicación 4, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*
- 25 6. El agente inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la prevención de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*
7. Una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del agente inmunogénico como se define en la reivindicación 4.
- 30 8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 35 9. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque el adyuvante farmacéuticamente aceptable es seleccionado de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio, muramidipéptidos, vitamina E, escualano, escualeno, *ginseng*, cimosano, glucanos, dimetilaminoetil-dextrano, dextranos, polímeros no iónicos de bloque, monofosforil lípido A, saponinas y mezclas de los mismos.
10. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque comprende monofosforil lípido A.
- 40 11. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizada porque se administra por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intramamaria.
12. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, caracterizada porque se administra en una o más de una dosis.
- 45 13. Una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por *Streptococcus sp.*
- 50 14. Una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la mastitis y/o de infecciones provocadas por bacterias productoras de biofilm.
- 55 15. Un kit de vacunación caracterizado porque comprende un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del agente inmunogénico como se define en la reivindicación 4 o de la vacuna como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

ES 2 960 326 T3

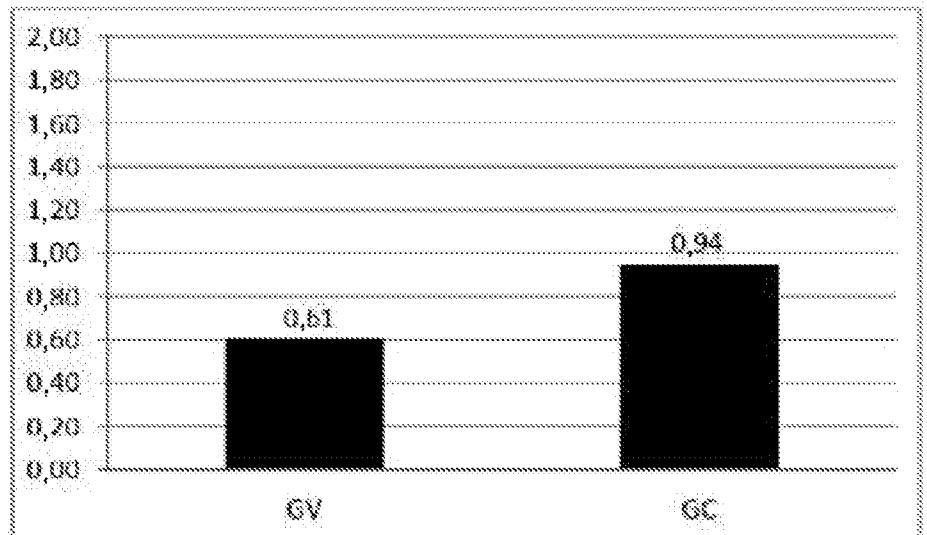


FIGURA 1

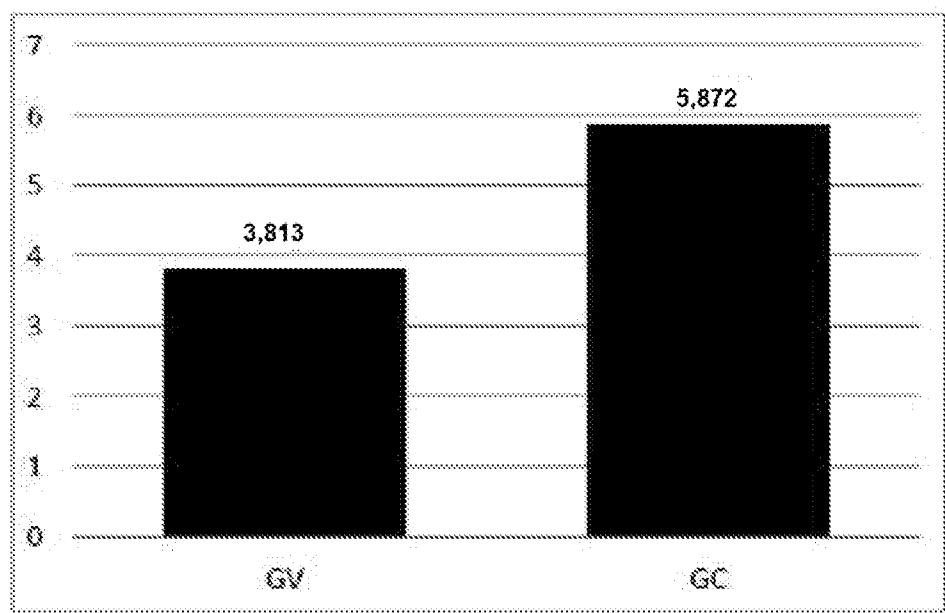


FIGURA 2

ES 2 960 326 T3

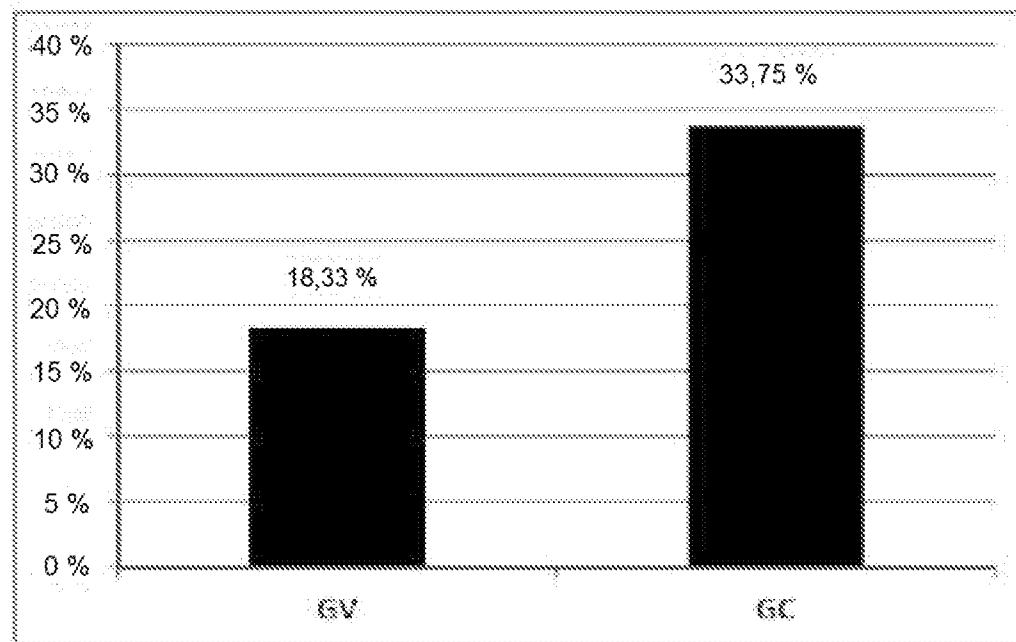


FIGURA 3

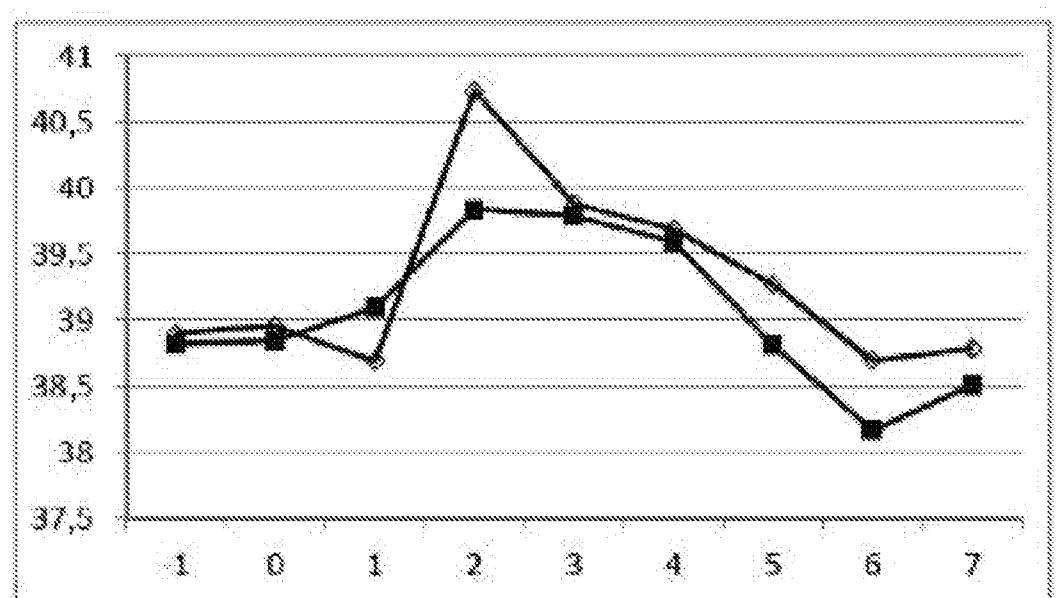


FIGURA 4

ES 2 960 326 T3

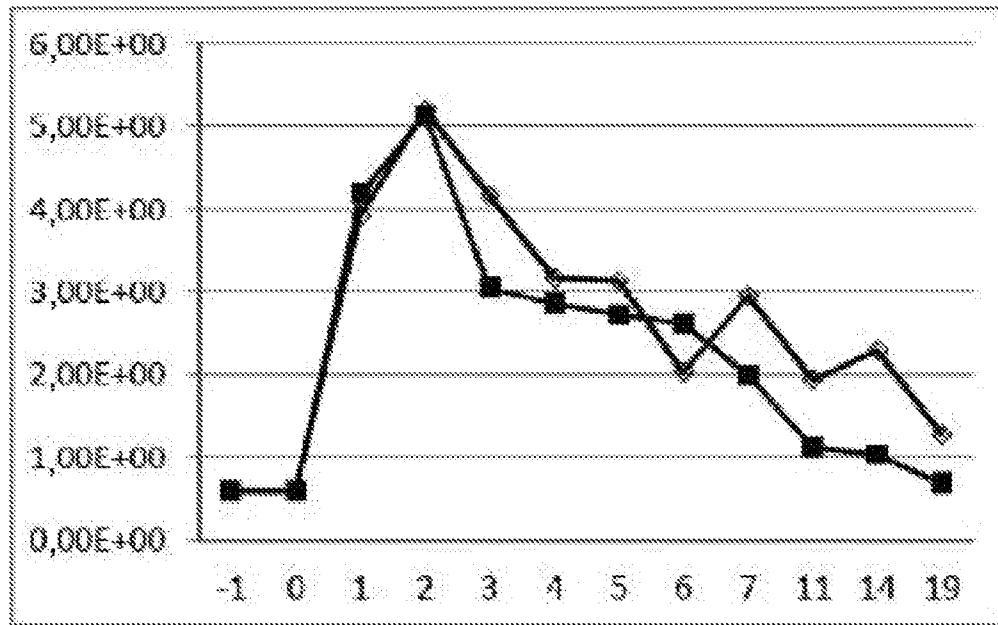


FIGURA 5

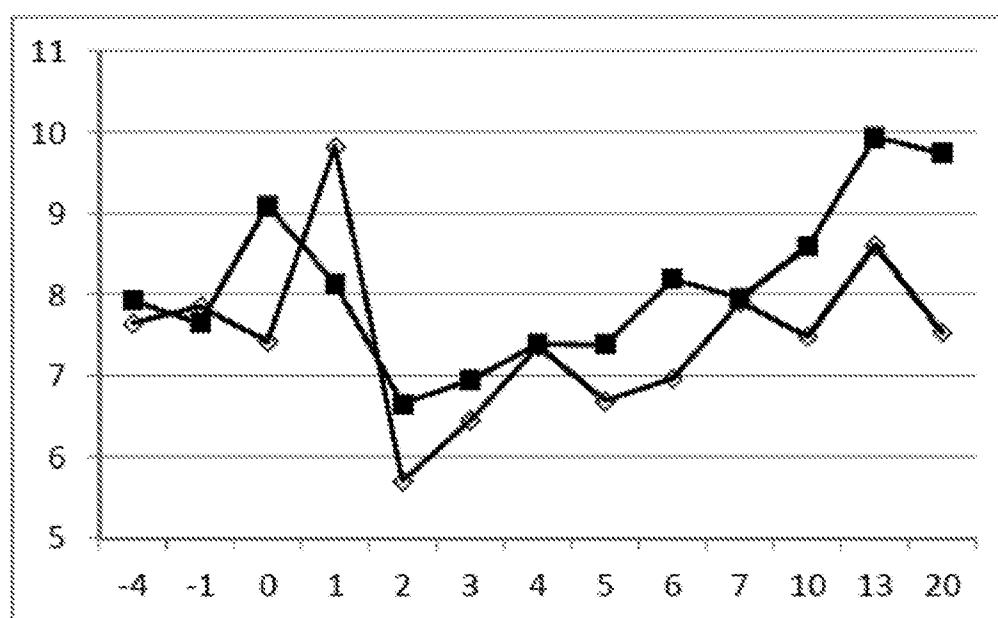


FIGURA 6

ES 2 960 326 T3

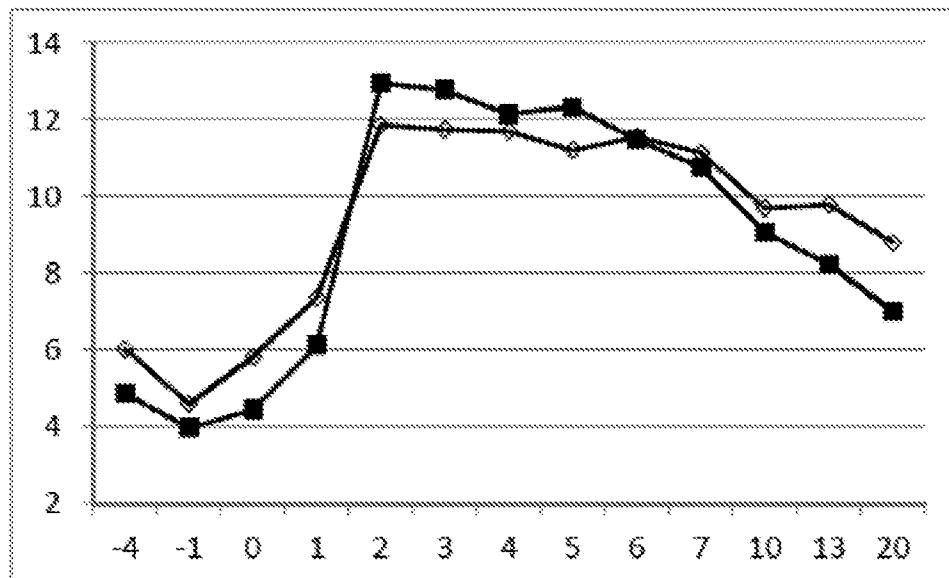


FIGURA 7

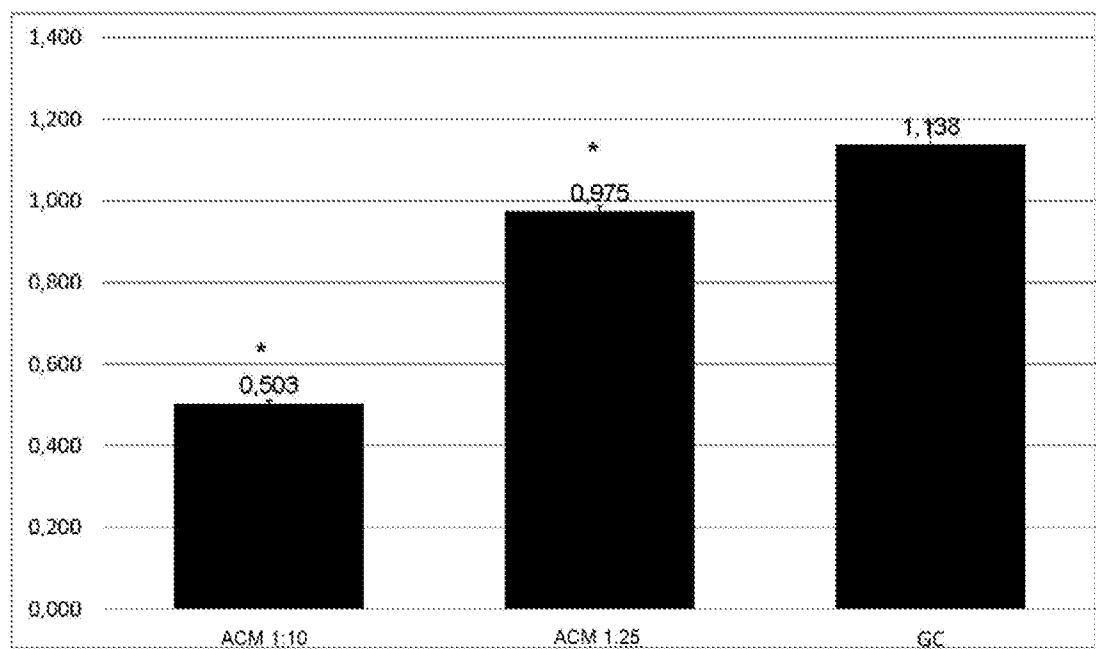


FIGURA 8

ES 2 960 326 T3

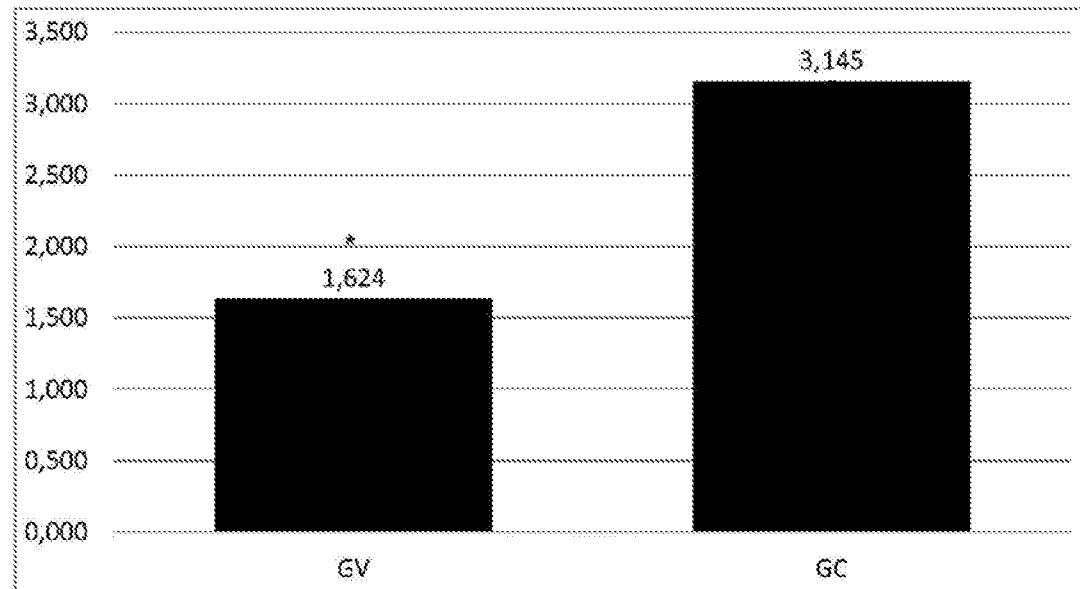


FIGURA 9

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO9641879A
- WO0196381A
- WO2010041056A
- WO2015042449A
- WO2008153541A

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **FINCH et al.** Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, 3599-603
- **HILL et al.** Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1994, vol. 8, 109-118
- **LEIGH et al.** Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. *Vaccine*, 1999, vol. 17, 851-857
- **PRADO et al.** Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2011, vol. 141, 201-208
- **D. NEIL WEDLOCK et al.** Dairy cows produce cytokine and cytotoxic T cell responses following vaccination with an antigenic fraction from *Streptococcus uberis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, vol. 160 (1-2), 51-60
- **FINCH et al.** Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, 3599-603
- **HILL et al.** Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1994, vol. 8, 109-118
- **LEIGH et al.** Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. *Vaccine*, 1999, vol. 17, 851-857
- **PRADO et al.** Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2011, vol. 141, 201-208
- **D. NEIL WEDLOCK et al.** Dairy cows produce cytokine and cytotoxic T cell responses following vaccination with an antigenic fraction from *Streptococcus uberis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, vol. 160 (1-2), 51-60