



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0909770-8 B1



(22) Data do Depósito: 16/04/2009

(45) Data de Concessão: 28/09/2021

(54) Título: VACINA DE ANTÍGENOS NÃO-VIVOS DE LAWSONIA INTRACELLULARIS, DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E CIRCOVÍRUS PORCINO

(51) Int.Cl.: A61K 39/295; A61K 39/106; A61P 31/04; A61P 31/12.

(30) Prioridade Unionista: 18/04/2008 EP 08154765.5; 18/04/2008 US 61/046,188.

(73) Titular(es): INTERVET INTERNATIONAL B.V..

(72) Inventor(es): ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAN JACOBS; PAUL VERMEIJ; RUUD PHILIP ANTOON MARIA SEGERS; CARLA CHRISTINA SCHRIER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009054517 de 16/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/127684 de 22/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/09/2010

(57) Resumo: VACINA, E, KIT A presente invenção refere-se a uma vacina compreendendo, em combinação, antígenos não-vivos de Lawsonia intracellularis, de Mycoplasma hyopneumoniae e circovírus porcino, e um veículo farmacologicamente aceitável. A invenção refere-se também a um kit compreendendo um primeiro recipiente apresentando, contidos no mesmo, antígenos não-vivos de Lawsonia intracellularis, um ou mais outros recipientes apresentando contidos nos mesmos antígenos de Mycoplasma hyopneumoniae e circovírus porcino e instruções para misturar os antígenos de Lawsonia intracellularis, Mycoplasma hyopneumoniae, e circovírus porcino para formular uma vacina de combinação vantajosa para vacinação sistêmica.

“VACINA DE ANTÍGENOS NÃO-VIVOS DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS*, DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* E CIRCOVÍRUS PORCINO”

A presente invenção refere-se a uma vacina para proteção
5 contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus
porcino. Proteção neste sentido significa que a vacina proporciona pelo menos
uma diminuição de uma influência negativa causada por *Lawsonia*
intracellularis, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino, sendo que
referida influência negativa é, p. ex., dano tissular e/ou sinais clínicos, como
10 ganho de peso diminuído, diarréia, tosse, espirros etc. A presente invenção
refere-se também a um kit compreendendo um primeiro recipiente
apresentando, contidos no mesmo, antígenos não-vivos de *Lawsonia*
intracellularis, um ou mais outros recipientes apresentando contidos nos
mesmos antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino e
15 instruções para misturar os antígenos de *Lawsonia intracellularis*,
Mycoplasma hyopneumoniae, e circovírus porcino para formular uma vacina
de combinação vantajosa para vacinação sistêmica.

A enteropatia proliferativa (PE ou PPE, também denominada
enterite ou ileíte) em muitos animais, em particular porcos, apresenta um sinal
20 clínico e síndrome patológica com hiperplasia mucosal de células epiteliais
imaturas das criptas, primariamente no íleo terminal. Outros sítios dos
intestinos que podem ser afetados incluem o jejuno, ceco e colo. Porcos
desmamados e porcos adultos jovens são afetados principalmente por
manifestação clínica típica de rápida perda de peso e desidratação. Doença
25 clínica natural em porcos ocorre em todo o mundo. A doença é associada
consistentemente com a presença de bactérias curvas intracelulares,
presentemente conhecidas como *Lawsonia intracellularis*.

Pneumonia micoplasmática de suínos causada pelo patógeno
bacteriano *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma doença crônica amplamente
30 disseminada em porcos. Particularmente leitões jovens são vulneráveis a esta
doença não-fatal. A pneumonia enzoótica é uma doença crônica que resulta

em pouca conversão do alimento e crescimento nanico. A doença é altamente contagiosa e a transmissão é usualmente por meio de contato direto com secreções do trato respiratório infectado, p. ex., em forma de gotículas infectadas após tosse/espirros. A consequência mais problemática desta

5 doença é que ela predispõe a todos os tipos de infecções secundárias do sistema respiratório. Estima-se que, p. ex., nos E.U.A., 99 % de todas as fazendas de porcos estão infectadas.

Considera-se que o circovírus porcino está relacionado com a síndrome de falência multissistêmica pós-desmame (PMWS, *post-weaning multisystemic wasting syndrome*) observada em porcos jovens. Esta doença

10 foi encontrada pela primeira vez no Canadá em 1991. Os sinais clínicos e a patologia foram publicados em 1997 e incluem falência progressiva, dispnéia, taquipnéia, e ocasionalmente íctero e icterícia. O circovírus porcino é um vírus pequeno (17 nm) icosaédrico não-envelopado contendo um genoma de

15 DNA de filamento simples circular. A síndrome de nefropatia e dermatite porcina PDNS (*porcine dermatitis and nephropathy syndrome*) é outro problema principal para criadores de porcos que ocorreu cerca de ao mesmo tempo que a PMWS e que também está relacionada com o circovírus porcino. São características da PDNS lesões vermelhas/castanhas circulares da pele

20 com hemorragias, usualmente nas orelhas, flancos, pernas e pernís.

Com relação à PE, a vacinação oral contra *Lawsonia intracellularis* mostrou ser uma medida economicamente eficiente para controlar a ileíte e permitir uma melhor exploração do potencial de crescimento genético do porco (*Porcine Proliferative Enteropathy Technical*

25 *manual 3.0*, julho de 2006; obtenível junto à Boehringer Ingelheim). Adicionalmente, vacinação oral ao invés de parenteral reduzirá a transmissão de infecções transmitidas pelo sangue, como PRRS, via agulhas de multi-uso e a redução de reações de sítio de injeção e agulhas retidas nas carcaças. Ela reduzirá estresses animais e humanos, tempo, custos de trabalho e esforço em

comparação com a vacinação individual (McOrist: "Ileitis - One Pathogen, Several Diseases" no Simpósio de ileíte da IPVS [International Pig Veterinary Society] em Hamburgo, 28 de junho de 2004).

Compreende-se geralmente que a vantagem de uma abordagem com vacina viva atenuada é que a eficácia da imunidade usualmente é relativamente boa, porque o sistema imune do hospedeiro é exposto a todas as propriedades antigênicas do organismo de uma maneira mais "natural". Especificamente para agentes antibacterianos intracelulares, como *Lawsonia intracellularis*, acredita-se que a abordagem com vacina viva atenuada oferece a melhor proteção obtível para animais vacinados, devido a uma resposta imune plena e apropriada baseada em células T. Isto contrasta com a variável para baixa imunidade associada com tipos de vacinas de subunidade ou morta para bactérias intracelulares. Isto também é particularmente verdadeiro para bactérias intracelulares obrigatórias, como *Lawsonia intracellularis* ou a *Chlamydia* sp, que causam infecções patogênicas no interior da mucosa. Estudos indicam que formas atenuadas vivas integrais das bactérias intracelulares em questão são fornecidas da melhor forma à mucosa-alvo, que elas são necessárias como formas bacterianas vivas integrais para produzir uma resposta imune plenamente protetora na mucosa-alvo, mas que elas também são imunologicamente superiores em comparação com o uso de componentes bacterianos parciais.

Tornou-se uma compreensão geral que uma vacina contra *Lawsonia intracellularis* precisa ser administrada oralmente (ver i.a. *Technical Manual 3.0* como referido acima). Isto baseia-se no fato de que a base da resistência do corpo à ileíte é a imunidade local no intestino, que é o produto de imunidade mediada com célula e defesa local via anticorpos, particularmente IgA. De acordo com o conhecimento corrente, anticorpos do soro (IgG) não proporcionam qualquer proteção simplesmente porque eles não atingem o lúmen do intestino. Demonstrou-se em estudos que a vacinação

oral produz imunidade mediada com célula e também produção local de IgA no intestino (Murtaugh, em *Agrar- und Veterinar-Akademie, Nutztierpraxis Aktuell*, edição 9, junho de 2004; e Hyland *et al.* em *Veterinary Immunology e Immunopathology* 102 (2004) 329-338). Em contraste, administração intramuscular não levou a proteção. Além disso, em seguida à compreensão geral de que uma vacina bem sucedida contra bactérias intracelulares precisa induzir imunidade mediada com célula e também a produção de anticorpos locais, a pessoa versada na técnica sabe que apenas um percentual muito baixo de antígenos ingeridos oralmente é efetivamente absorvido pelos enterócitos, e que a incorporação de *Lawsonia intracellularis* na célula é um processo ativo iniciado pela bactéria. Assim, uma vacina inativada poderia dotar o intestino com antígeno imunogênico insuficiente (Haesebrouck *et al.* em *Veterinary Microbiology* 100 (2004) 255-268). Esta é a razão porque se acredita que apenas vacinas vivas atenuadas induzem suficiente proteção mediada com célula nas células intestinais (ver *Technical Manual 3.0* como referido acima). Presentemente há apenas uma vacina no mercado para proteger contra *Lawsonia intracellularis*, viz. Enterisol® Ileitis comercializada pela Boehringer Ingelheim. Esta vacina é efetivamente uma vacina viva para administração oral.

Até o presente vacinas de combinação de *Lawsonia intracellularis* foram sugeridas no estado da técnica. No entanto, não muitas combinações do tipo referido foram efetivamente testadas quanto à eficácia. A razão para isto é que se compreende geralmente que a combinação de antígenos com antígenos de *Lawsonia intracellularis* só pode levar à proteção bem sucedida se os antígenos de *Lawsonia* forem proporcionados como células vivas (atenuadas). Com relação a isso nos referimos ao WO 2005/011731, que também sugere todos os tipos de vacinas de combinação baseadas em *Lawsonia intracellularis*. No entanto, com relação à descrição e estrutura de reivindicações, o pedido de patente, o requerente (Boehringer

Ingelheim) parece estar convencido de que só se pode esperar que vacinas de combinação tenham uma possibilidade razoável de sucesso quando antígenos de *Lawsonia* estiverem presentes em forma de células vivas. O mesmo é verdadeiro para o WO2006/099561, também atribuído à Boehringer Ingelheim. Efetivamente, com base no conhecimento comum este é um pensamento óbvio. No entanto, a combinação de antígenos vivos não é direta dada a elevada probabilidade de interferência entre os antígenos e a dificuldade de fabricar uma vacina de combinação do tipo referido.

É um objeto da presente invenção proporcionar uma vacina alternativa para combater *Lawsonia intracellularis*, e ao mesmo tempo combater um ou mais outros patógenos suínos. Para tanto concebeu-se o uso de uma vacina que compreende, em combinação, antígenos não-vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino, e um veículo farmacologicamente aceitável. Surpreendentemente, contra a compreensão geral persistente sobre como combater *Lawsonia intracellularis* e que uma vacina de combinação deveria compreender antígenos de *Lawsonia intracellularis* vivos, verificou-se que através do uso de antígenos de *Lawsonia intracellularis* não-vivos, em combinação com antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino, é possível proporcionar uma vacina que protege contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino.

De uma maneira geral, uma vacina pode ser fabricada usando-se métodos conhecidos na técnica que compreendem basicamente misturar os antígenos com um veículo. Tipicamente o(s) antígeno(s) é/são combinado(s) com um meio para portar os antígenos, frequentemente referido simplesmente como um veículo ou "veículo farmacologicamente aceitável". Um veículo do tipo referido pode ser qualquer solvente, meio de dispersão, revestimento, agente antibacteriano e antifúngico, agente retardador de absorção e isotônico, e análogos que são fisiologicamente compatíveis com e aceitáveis pelo

animal-alvo, p. ex., por ser tornados estéreis, entre outros. Alguns exemplos de referido meio de suporte são água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, fluido de cultura de bactérias, dextrose, glicerol, etanol e análogos, e também combinações dos mesmos. Eles podem

5 proporcionar uma forma de dosagem líquida, semissólida e sólida, dependendo do modo de administração desejado. Como é de conhecimento geral, a presença de um meio de suporte não é essencial para a eficácia de uma vacina, mas ela pode simplificar significativamente a dosagem e a administração do antígeno. Assim, a fabricação da vacina pode ocorrer em um

10 ambiente industrial, mas os antígenos também poderiam ser misturados com os outros constituintes de vacina *in situ* (i.e. em uma veterinária, uma fazenda etc.), p. ex., (imediatamente) precedendo a administração efetiva a um animal. Na vacina, os antígenos deveriam estar presentes numa quantidade imunologicamente efetiva, i.e. numa quantidade capaz de estimular o sistema

15 imune do animal-alvo suficientemente para, pelo menos, reduzir os efeitos negativos de uma exposição pós-vacinação com microorganismos de tipo selvagem. Opcionalmente adiciona-se outras substâncias, como adjuvantes, estabilizantes, modificadores de viscosidade ou outros componentes, dependendo do uso desejado ou das propriedades requeridas da vacina.

20 Em uma concretização, a vacina encontra-se em uma forma adequada para administração sistêmica. Para surpresa dos requerentes verificou-se que é possível induzir uma proteção contra *Lawsonia intracellularis* que é comparável com, ou mesmo melhorada com relação à proteção proporcionada pelo uso da vacina viva (simples) Enterisol ® Ileitis

25 (administrada de acordo com as instruções correspondentes), quando a vacina de combinação de acordo com a presente invenção é administrada sistemicamente, i.e. de uma forma que ela alcance o sistema circulatório do corpo (compreendendo o sistema cardiovascular e linfático), desta forma afetando o corpo como um todo ao invés de um lócus específico, como o trato

gastrointestinal. A administração sistêmica pode ser realizada, p. ex., por meio da administração dos antígenos no tecido muscular (intramuscular), na derme (intradérmica), sob a pele (subcutânea), sob a mucosa (submucosal), nas veias (intravenosa) etc. Para vacinação sistêmica muitas formas são vantajosas, em particular formulações líquidas (com antígenos dissolvidos, emulsificados ou suspensos) mas também formulações sólidas, como implantes ou uma forma intermediária, como um veículo sólido para o antígeno suspenso em um líquido. Vacinação sistêmica, em particular vacinação parenteral (i.e. não através do canal alimentar), e formas vantajosas (físicas) de vacinas para vacinação sistêmica já são conhecidas há mais de 200 anos. Uma vantagem desta concretização é que é possível usar a mesma via de administração que é o padrão corrente para administração de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* ou circovírus porcino, viz. injeção parenteral, em particular via intramuscular ou intradérmica (no último caso frequência sem-agulha).

Em uma concretização os antígenos de *Lawsonia intracellularis* não-vivos são obtidos de uma composição contendo carboidrato, sendo que o carboidrato também é encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana celular exterior destas células. Inesperadamente, usando uma fração de células de *Lawsonia intracellularis* contendo carboidrato (i.e., uma composição contendo os carboidratos como presentes em células vivas de *Lawsonia intracellularis*) na vacina de combinação, poderia-se proporcionar boa proteção contra PE. Observa-se que, para formular a vacina, uma composição contendo carboidrato obtida diretamente de células de *Lawsonia intracellularis* poderia ser usada, mas também uma composição derivada da mesma, como uma diluição ou concentrado da composição original ou um extrato, um ou mais componentes purificados etc. Observa-se que subunidades de células de *Lawsonia intracellularis* foram reportadas como antígenos em uma vacina para proteção contra esta bactéria. No entanto, estas são principalmente

proteínas recombinantes e até aqui nenhuma delas provou ser capaz e [de] proporcionar boa proteção. Observa-se também que uma composição contendo carboidrato, em que o carboidrato também é encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana celular exterior destas células, é conhecida da Kroll *et al.* (*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, junho de 2005, 693-699). No entanto, esta composição é usada para diagnósticos. Ela não foi testada como um antígeno protetor por razões indicadas acima.

Em uma concretização, a composição contendo carboidrato é material resultante da morte de bactérias de *Lawsonia intracellularis*. Verificou-se que uma maneira muito conveniente de proporcionar o carboidrato para uso de acordo com a presente invenção consiste em simplesmente matar células de *Lawsonia intracellularis* e usar o material resultante daquilo como uma fonte para o carboidrato. Extração do carboidrato de células vivas também poderia ser realizada em teoria (analogamente à criação de células-fantasmas vivas por meio de remoção da parede celular) mas requer técnicas mais sofisticadas e, portanto, mais onerosas. O material como um todo poderia ser usado, p. ex., uma suspensão de células integrais ou um lisado de células de *Lawsonia intracellularis*, ou se poderia purificar ou mesmo isolar o carboidrato do material. Este método pode ser realizado usando-se técnicas relativamente simples conhecidas na técnica.

Em uma concretização preferida, a composição contendo carboidrato contém células integrais de bactérias de *Lawsonia intracellularis* mortas. Esta provou ser a maneira mais conveniente de proporcionar o carboidrato como um antígeno na vacina. Além disso, a eficácia da vacina é ainda mais incrementada, possivelmente porque esta maneira de oferecer o antígeno ao sistema imune do animal-alvo emula melhor o ambiente natural do carboidrato.

Em uma concretização a vacina compreende um adjuvante de

óleo em água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico. De uma maneira geral, um adjuvante é um agente imunoestimulador não-específico. Principalmente, cada substância que é capaz de favorecer ou amplificar um processo particular na cascata de eventos imunológicos, levando finalmente a uma melhor resposta imunológica (i.e. a resposta corporal integrada a um antígeno, em particular uma mediada por linfócitos e envolvendo tipicamente o reconhecimento de antígenos por anticorpos específicos ou linfócitos previamente sensibilizados), pode ser definida como um adjuvante. Mostrou-se que usando um adjuvante de óleo em água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico proporciona uma proteção muito boa contra *Lawsonia intracellularis*. Efetivamente, a aplicação de adjuvantes óleo em água tais quais é comum em conexão com antígenos não-vivos. No entanto, é de conhecimento geral que as melhores propriedades imunoestimuladoras são obtidas quando as gotículas de óleo são de diâmetro grande. Em particular, usa-se gotículas de óleo com um diâmetro abaixo de 1 micrômetro, em particular quando se acredita que segurança é uma questão importante. Nesse caso, poderia-se usar gotículas pequenas porque estas são conhecidas por suscitarem menor dano ao tecido, sinais clínicos etc. No entanto, no caso de obter proteção para um distúrbio associado com o intestino via vacinação sistêmica (como é o caso na presente invenção), deveria-se selecionar gotículas grandes porque se poderia esperar que a resposta imune tenha que ser reforçada significativamente. Em contraste, foi verificado que usando gotículas de óleo pequenas na composição proporciona-se resultados muito bons com relação à proteção contra *Lawsonia intracellularis*.

Em uma concretização ainda mais preferida, o adjuvante compreende gotículas de óleo biodegradável e gotículas de óleo mineral, as gotículas de óleo biodegradável apresentando um tamanho médio que difere do tamanho médio das gotículas de óleo mineral. Mostrou-se que o uso de

uma mistura de óleo biodegradável e óleo mineral proporciona resultados muito bons com relação à eficácia e segurança. Adicionalmente a isto, a estabilidade da composição é muito alta, o que é uma vantagem econômica importante. A estabilidade provou ser muito boa, em particular quando o tamanho médio (ponderado por volume) das gotículas de óleo biodegradáveis ou das gotículas minerais situa-se abaixo de 500 nm (de preferência em torno de 400 nm).

A presente invenção refere-se também a um kit compreendendo um primeiro recipiente apresentando, contidos no mesmo, antígenos não-vivos de *Lawsonia intracellularis*, um ou mais outros recipientes apresentando contidos nos mesmos antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino e instruções para misturar os antígenos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, e circovírus porcino para formular uma vacina de combinação vantajosa para vacinação sistêmica. Nesta concretização proporciona-se um recipiente separado para os antígenos de *Lawsonia intracellularis* em um kit também contendo os outros antígenos (que são ou combinados em um recipiente como é conhecido do estado da técnica ou mesmo presentes em recipientes separados que fazem parte do conteúdo do kit. Uma vantagem desta concretização é que os antígenos de *Lawsonia* podem ser impedidos de apresentarem interações com os outros antígenos até imediatamente antes da administração da vacina. Da mesma forma, como os antígenos encontram-se em um recipiente separado ocorrerão menores perdas de produção. Em uma concretização os antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino estão contidos em um recipiente, formulados em um adjuvante de óleo em água. Nesta concretização, os antígenos de *Lawsonia* podem ser misturados com os outros imediatamente antes do uso.

A invenção será explicada adicionalmente com base nos exemplos a seguir.

O Exemplo 1 descreve um método para obter uma composição contendo carboidrato substancialmente isenta de proteína e uma vacina que é preparada usando esta composição.

5 O Exemplo 2 descreve um experimento em que uma vacina de *Lawsonia intracellularis* não-viva é comparada com a vacina atualmente no mercado e uma vacina experimental compreendendo proteínas de subunidade de *Lawsonia intracellularis*.

10 O Exemplo 3 descreve um experimento em que duas vacinas diferentes de antígenos de *Lawsonia intracellularis* não-vivos são comparados com a vacina viva atualmente no mercado.

Exemplo 1

15 Neste exemplo descreve-se um método para obter uma composição de carboidrato substancialmente isenta de proteína associada com a membrana celular exterior de células de *Lawsonia intracellularis* e uma vacina que pode ser realizada usando esta composição. De uma maneira geral, um carboidrato é um composto orgânico que contém carbono, hidrogênio, e oxigênio, usualmente na relação de 1:2:1. Exemplos de carboidratos são açúcares (sacarídeos), amidos, celulosas, e gomas. Usualmente eles servem como uma fonte principal de energia na dieta de animais. *Lawsonia*
20 *intracellularis* é uma bactéria gram negativa, que contém, portanto, uma membrana exterior que não é construída unicamente de fosfolípido e proteína, mas também contém carboidratos, em particular polissacarídeo (usualmente polissacarídeos, como lipopolissacarídeo, lipo-oligossacarídeo, ou mesmo não-lipo polissacarídeos).

25 FRAÇÃO DE CARBOIDRATO PARA PREPARAÇÃO DE VACINA

Tomou-se vinte mililitros de água tamponada (0,04 M de PBS, solução salina tamponada com fosfato) contendo células de *Lawsonia intracellularis* a uma concentração de $3,7E8$ ($= 3,7 \times 10^8$) células/ml. As células foram lisadas mantendo-se as mesmas a $100^{\circ}C$ durante 10 minutos.

Adicionou-se proteinase K (10 mg/ml) em 0,04 M de PBS a uma concentração final de 1,7 mg/ml. Esta mistura foi incubada a 60°C durante 60 minutos para degradar todas as proteínas e manter os carboidratos intactos. Subsequentemente, a mistura foi incubada a 100°C durante 10 minutos para inativar a Proteinase K. O material resultante, que é uma composição contendo carboidrato, em particular contendo os carboidratos como presentes em bactérias de *Lawsonia intracellularis* vivas em associação com sua membrana celular exterior (ver parágrafo abaixo), foi armazenado a 2-8°C até o uso ulterior. A composição foi formulada em adjuvante Diluvac forte que também serve como um veículo para os antígenos. Este adjuvante (ver também EP 0 382 271) compreende 7,5 por cento em peso de gotículas de acetato de vitamina E com um tamanho ponderado por volume médio de aproximadamente 400 nm, suspenso em água e estabilizado com 0,5 por cento em peso de Tween 80 (mono-oleato de polioxietileno sorbitol). Cada vacina de mililitro continha material que havia sido extraído de 1,2E8 células de *Lawsonia intracellularis*.

PRECIPITAÇÃO IMUNE DE ANTÍGENOS DE CARBOIDRATO DE LAWSONIA

Duas bateladas de anticorpos monoclonais (MoAb's) desenvolvidos contra *Lawsonia intracellularis* de células integrais foram precipitadas com Na₂SO₄ saturado à temperatura ambiente de acordo com procedimentos convencionais. O precipitado foi pelotizado por meio de centrifugação (10.000 g durante 10 minutos). O pellet foi lavado com 20 % de Na₂SO₄ e ressuspensas em 0,04 M de PBS. Pérolas Dynal ativadas com Tylosyl (DynaBeads, DK) foram pré-lavadas com 0,1 M de NaPO₄ (pH 7,4), de acordo com o manual do fabricante. Cada uma das bateladas de 140 µg de MoAbs foi tomada e adicionada a 2E8 pérolas pré-lavadas e incubada de um dia para o outro a 37°C. As pérolas foram pelotizadas por meio de centrifugação e MoAbs não-ligados foram removidos por aspiração do

sobrenadante. Medições espectrofotométricas mostraram que entre 20 e 35 % dos MoAbs adicionados haviam se ligado às pérolas.

Duas bateladas de 1 ml de células de *Lawsonia intracellularis* (3,7E8/ml) em 0,04 M de PBS foram sonicadas durante 1 minuto. Os lisados de células resultantes foram adicionados às pérolas ativadas com Tylosyl - complexos monoclonais e incubados de um dia para o outro a 4°C. As pérolas ativadas com Tylosyl - complexos monoclonais foram lavadas três vezes com 0,1 M de NaPO₄ (pH 7,4). Os compostos ligados foram eluídos lavando-se as pérolas em 0,5 ml de uréia 8M em 0,04 M de PBS (E1); 0,5 ml de glicina 10 mM pH 2,5 (E2); e 0,5 ml de HCl 50 mM (E3), de uma maneira sequencial. Após eluição E2 e E3 foram neutralizados com 100 µl e 200 µl de 1 M Tris/HCl (pH8,0).

Coletou-se amostras de cada etapa e foram carregadas sobre géis SDS-PAGE. Géis foram corados usando azul Commassie Brilliant Blue (CBB) e manchamento prata [Silver] ou manchados. Os manchamentos foram revelados usando-se os mesmos MoAbs como mencionado acima. Inspeção dos géis e manchamentos mostrou que os MoAbs reconheceram bandas com um peso molecular aparente de 21 e 24 kDa que não vistos nos géis de CBB, mas foram visíveis nos géis manchados com Silver. Da mesma forma, determinou-se que a fração das células que se ligaram aos MoAbs foi resistente a Proteinase K. Assim, com base nestes resultados pode-se concluir que esta fração contém carboidratos (ou seja: toda a proteína é lisada, e frações de DNA sonicadas não mostrarão como uma banda clara em um manchamento Silver), e que os carboidratos encontram-se em associação com (i.e. formando parte de ou sendo ligados a) a membrana celular exterior de *Lawsonia intracellularis* (ou seja: os MoAbs desenvolvidos contra esta fração também reconheceram células integrais de *Lawsonia intracellularis*). Dado o fato de que *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria gram-negativa, acredita-se que a composição de carboidrato compreende polissacarídeo(s).

Exemplo 2

Este experimento foi realizado para testar uma maneira conveniente para formular o antígeno de carboidrato em uma vacina, viz. via uma célula integral morta (também conhecida como bacterina). Como
5 controles usou-se a vacina comercialmente obtível Enterisol® Ileitis e uma vacina de subunidade experimental compreendendo subunidades de proteína. Em seguida a isto usou-se animais não-vacinados como um controle.

PROJETO EXPERIMENTAL DO EXEMPLO 2

Realizou-se uma vacina de células integrais inativadas como a
10 seguir. Coletou-se células vivas de *Lawsonia intracellularis* derivadas dos intestinos de porcos com PPE. As células foram inativadas com 0,01 % de BPL (beta-propiolactona). O material resultante, que é inerentemente uma composição não-viva contendo carboidrato no sentido da presente invenção (em particular porque contém os carboidratos como presentes em bactérias de
15 *Lawsonia intracellularis* vivas em associação com sua membrana exterior da célula), foi formulado em adjuvante Diluvac forte (ver Exemplo 1) a uma concentração de aproximadamente $2,8 \times 10^8$ células por ml de vacina.

A vacina de subunidade continha P1/2 e P4 recombinante como se conhece da EP 1219711 (as proteínas com 19/21 e 37 kDa
20 respectivamente), e as proteínas recombinantes expressas por genes 5074, 4320 e 5464 como descrito no WO2005/070958. As proteínas foram formuladas em adjuvante Diluvac forte. A vacina continha aproximadamente 50 µg de cada uma das proteínas por mililitro.

Usou-se quarenta porcos SPF com 6 semanas de vida. Os
25 porcos foram divididos em 4 grupos de dez porcos cada um. O grupo 1 foi vacinado uma vez oralmente (em T=0) com 2 ml de Enterisol ® Ileitis vivo" (Boehringer Ingelheim) de acordo com as instruções do fabricante. Os grupos 2 e 3 foram vacinados duas vezes intramuscularmente (em T=0 e T=4w) com 2 ml da vacina de células integrais de *Lawsonia* inativada e a vacina de

combinação de subunidade recombinante como descrito acima, respectivamente. O grupo 4 foi deixado como controle não-vacinado. Em T=6w todos os porcos foram expostos oralmente com mucosa homogeneizada infectada com *Lawsonia intracellularis*. Subsequentemente todos os porcos foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de enteropatia proliferativa porcina (PPE). Em momentos regulares antes e após a exposição coletou-se dos porcos amostras de sangue sérico (para sorologia) e fezes (para PCR). Em T=9w todos os porcos foram eutanizados e necropsiados. Coletou-se amostras histológicas do íleo que foram examinadas microscopicamente.

10 O inóculo de exposição foi preparado de mucosa infectada: 500 gramas de mucosa infectada (raspada de intestinos infectados) foram descongelados e misturados com 500 ml de solução salina fisiológica. Esta mistura foi homogeneizada em um omnimixer durante um minuto a plena velocidade sobre gelo. Todos os porcos foram expostos oralmente com 20 ml de inóculo de exposição em T=6w.

15 Em T=0, 4, 6, 7, 8 e 9w coletou-se uma amostra de fezes (quantidades em gramas) e uma amostra de sangue sérico de cada porco e isto foi armazenado até a testagem. As amostras de fezes foram testadas em um teste de PCR quantitativo (Q-PCR) e expressas como um logaritmo da quantidade encontrada em picogramas (pg). Amostras de soro foram testadas no teste IFT comumente aplicado (teste de anticorpos imuno-fluorescentes para detectar anticorpos contra células integrais de *Lawsonia intracellularis* no soro). Para classificação histológica tomou-se uma amostra relevante do íleo, que foi fixada em formalina tamponada a 4 %, embutida rotineiramente e cortada em lâminas. Estas lâminas foram manchadas com Hematoxilina-Eosina (manchamento com HE) e com um manchamento imuno-histoquímico usando anticorpos monoclonais anti-*Lawsonia intracellularis* (manchamento com IHC). As lâminas foram examinadas microscopicamente. As pontuações de histologia são como a seguir:

manchamento com HE:	
não foram detectadas anormalidades	pontuação=0
lesão duvidosa	pontuação = ¹ / ₂
lesões brandas	pontuação =1
lesões moderadas	pontuação =2
lesões severas	pontuação =3
sem evidência de bactérias de <i>L. intracellularis</i>	pontuação =0
presença duvidosa de bactérias	pontuação = ¹ / ₂
presença de números pequenos/individuais de bactérias na lâmina	pontuação =1
presença de números moderados de bactérias na lâmina	pontuação =2
presença de grandes números de bactérias na lâmina	pontuação =3

Todos os dados foram registrados para cada porco individualmente. A pontuação por grupo foi calculada como a média dos animais positivos para os diferentes parâmetros após a exposição. Usou-se o teste U de Mann-Whitney não-paramétrico para avaliar a significância estatística (testado de dois lados e nível de significância ajustado em 0,05).

Resultados do Exemplo 2

Sorologia

Antes da primeira vacinação todos os porcos foram soronegativos quando testados quanto a titulações de anticorpos no IFT. Após a vacinação com a bacterina de células integrais (grupo 2) porcos desenvolveram altas titulações de anticorpos no IFT, enquanto que os controles e os porcos vacinados com a vacina de subunidade permaneceram negativos até a exposição (Tabela 1). Dois dos porcos vacinados com Enterisol (grupo 1) desenvolveram titulações moderadas no IFT, enquanto que todos os outros porcos neste grupo permaneceram soronegativos. Após a exposição todos os porcos desenvolveram altas titulações de anticorpos no IFT [*immuno fluorescence test*]. Resultados médios são ilustrados na Tabela 1 (com a diluição usada, 1,0 foi o nível de detecção no lado inferior).

Tabela 1. Titulações médias de anticorpos no IFT (2log) de soro de porco após vacinação e exposição

Grupo	T=0 semanas	T=4 semanas	T=6 semanas	T=9 semanas
1	<1,0	1,1	1,7	>11,4
2	<1,0	3,7	>11,8	>12,0
3	<1,0	<1,0	<1,0	>11,6
4	<1,0	<1,0	<1,0	>12,0

PCR em tempo-real em amostras de fezes

Antes da exposição todas as amostras de fezes foram negativas. Após a exposição encontrou-se reações positivas em todos os grupos. Grupo 1 ($p=0,02$), grupo 2 ($p=0,01$) e grupo 3 ($p=0,03$) apresentaram um nível de desprendimento significativamente menor em comparação com o controle. Uma sinopse pós-exposição é dada na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados médios de PCR em amostras de fezes (log pg) após vacinação e exposição

Grupo	T=6 semanas	T=7 semanas	T=8 semanas	T=9 semanas	Pós-exposição total
1	0	1,3	3,6	1,8	6,3
2	0	0,8	2,8	1,9	5,5
3	0	0,5	3,8	2,0	5,9
4	0	0,8	4,9	4,9	10,0

Pontuações de histologia

O Grupo 2 apresentou a menor pontuação de histologia com HE ($p=0,05$), pontuação de IHC ($p=0,08$) e pontuação total de histologia ($p=0,08$). Os outros grupos apresentaram pontuações mais altas e não foram significativamente diferentes do grupo de controle. Ver tabela 3.

Tabela 3. Pontuações média de histologia para o íleo.

Grupo	pontuação HE	pontuação IHC	pontuação total
1	1,8	1,5	3,3
2	1,3	1,5	2,7
3	1,8	1,6	3,4
4	2,4	2,3	4,7

15 Conclusões com relação ao Exemplo 2

Dos resultados pode-se concluir que a administração sistêmica da vacina de células integrais não-vivas de *Lawsonia intracellularis* que contém inerentemente o carboidrato como também encontrado em associação com a membrana exterior de células vivas de *Lawsonia intracellularis*, induziu pelo menos proteção parcial. Todos os parâmetros estudados e pontuações de histologia foram significativamente ou quase significativamente melhores em comparação com os controles.

Exemplo 3

Este experimento foi realizado para testar uma vacina compreendendo uma composição contendo carboidrato substancialmente isenta de proteína como antígeno. Uma segunda vacina a ser testada continha, adicionalmente a células integrais mortas de *Lawsonia intracellularis*,
5 antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino (a vacina "combi"). Como um controle usou-se a vacina comercialmente obtível Enterisol® Ileitis. Em seguida a isto, usou-se animais não vacinados como um segundo controle.

Projeto experimental do Exemplo 3

10 A vacina baseada em uma composição contendo carboidrato substancialmente isenta de proteína foi obtida como descrito no Exemplo 1.

A vacina combi experimental continha antígeno de células integrais de *Lawsonia intracellularis* inativadas (ver Exemplo 2 para o método usado de proporcionar as bactérias inativadas) em um nível de
15 1,7x10⁸ células/ml. Em seguida a isto ela continha antígeno PCV-2 inativado (20 µg da proteína codificada em ORF 2 de PCV 2 por ml; sendo que a proteína é expressa em um sistema de expressão de baculovírus como é de conhecimento geral na técnica, p. ex., como descrito no WO 2007/028823) e antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado (o mesmo antígeno na
20 mesma dose como é conhecido da vacina comercialmente obtível Porcilis Mhyo®, obtível da Intervet, Boxmeer, Países Baixos). Os antígenos foram formulados em um adjuvante de emulsão duplo "X". Este adjuvante é uma mistura de 5 partes em volume de adjuvante "A" e 1 parte em volume de adjuvante "B". Adjuvante "A" consiste de gotículas de óleo mineral com um
25 tamanho médio aproximado (ponderado por volume) em torno de 1 µm, estabilizado com Tween 80 em água. Adjuvante "A" compreende 25 % em peso do óleo mineral e 1 % em peso do Tween. O resto é água. O adjuvante "B" consiste de gotículas de acetato de vitamina E biodegradável com um tamanho médio aproximado (ponderado por volume) de 400 nm, também

estabilizado com Tween 80. O adjuvante "B" compreende 15 % em peso de acetato de vitamina E e 6 % em peso de Tween 80, o resto é água.

Usou-se sessenta e quatro leitões SPF com 3 dias de vida. Os porcos foram divididos em quatro grupos de 14 leitões e um grupo de 8 leitões (grupo 4). O grupo 1 foi vacinado intramuscularmente aos 3 dias de vida com 2 ml da vacina combi, seguido de uma segunda vacinação aos 25 dias de vida. O grupo 2 foi vacinado intramuscularmente uma vez com 2 ml de vacina combi aos 25 dias de vida. O grupo 3 foi vacinado oralmente com 2 ml de Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim) aos 25 dias de vida de acordo com as prescrições. O grupo 4 foi vacinado intramuscularmente aos 3 e 25 dias de idade com 2 ml da vacina de carboidrato não-proteína. O grupo 5 foi deixado não-vacinado como um grupo de controle de exposição. A 46 dias de vida todos os porcos foram expostos oralmente com mucosa infectada homogeneizada. Subsequentemente todos os porcos foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de enteropatia proliferativa porcina (PPE). Em tempos regulares antes e após a exposição obteve-se amostras de sangue sérico e fezes dos porcos quanto à sorologia e PCR respectivamente. Aos 68 dias de vida todos os porcos foram eutanizados e examinados pós-mortem. O íleo foi examinado histologicamente.

Os outros tecidos no projeto experimental foram os mesmos como descrito no Exemplo 2, exceto se indicado de outra forma.

Resultados do Exemplo 3

Sorologia

1- Lawsonia

Antes da primeira vacinação todos os porcos foram soronegativos para titulações de anticorpos no IFT. Após vacinação com a vacina combi (grupos 1 e 2) e a vacina de carboidrato não-proteína (grupo 4), muitos porcos desenvolveram titulações de anticorpos no IFT, enquanto que os controles e os porcos vacinados com Enterisol permaneceram

soronegativos até a exposição. Após a exposição todos os porcos (exceto dois no grupo Enterisol) desenvolveram titulações de anticorpos no IFT. Para uma sinopse dos valores médios obtidos, ver Tabela 4 (devido à maior diluição quando comparado com o exemplo 2, o nível de detecção foi de 4,0).

5 Tabela 4. Titulações médias de anticorpos de Lawsonia no IFT (2log) de soro de porco após vacinação e exposição

Grupo	T=3 dias	T=25 dias	T=46 dias	T=67 dias
1	<4,0	<4,0	7,9	10,3
2	<4,0	<4,0	4,8	9,8
3	<4,0	<4,0	<4,0	8,5
4	<4,0	<4,0	6,9	10,6
5	<4,0	<4,0	<4,0	9,0

2- Mycoplasma hyopneumoniae

Com relação a Mhyo, no início do experimento e também no dia do reforço (25 dias de vida) todos os porcos foram soronegativos para Mhyo. Após a vacinação de reforço o grupo 1 desenvolveu elevadas titulações de anticorpos Mhyo, no mesmo nível daquelas obtidos com a vacina de reforço de iniciador de Porcilis Mhyo® comercialmente obtível. Os resultados são dados na Tabela 5 abaixo. Aparentemente, nestas circunstâncias (dada intramuscularmente) apenas quando uma vacinação de reforço é dada as titulações de anticorpos aos 46 dias encontram-se acima do nível de detecção (6,0 para o método usado). No entanto, sabe-se que uma vacinação de dose única com antígenos de Mhyo pode proporcionar suficiente proteção, em particular quando administrada intradermicamente (ver p. ex., WO 2007/103042).

20 Tabela 5. Titulações médias de anticorpos de Mhyo no IFT (2log) de soro de porco após vacinação

Grupo	T=3 dias	T=25 dias	T=46 dias
1	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção	8,3
2	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção
5	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção	Abaixo do nível de detecção

3- Circovírus porcino

Com relação ao PCV, aos 3 dias de vida os leitões apresentaram elevadas titulações de anticorpos de PCV derivados materno. No dia do reforço (25 dias de vida) os vacinados (grupo 1) apresentaram uma titulação similar em comparação com o grupo 2 e o grupo de controle. A titulação de PCV aos 25 dias de vida foi ligeiramente menor em comparação com a titulação aos 3 dias de vida. Após a vacinação aos 25 dias de vida as titulações do grupo 1 (2 vacinações: no dia 3 e 25) e grupo 2 (uma vacinação no dia 25) permaneceram em um nível elevado, enquanto que leitões de controle apresentaram uma diminuição normal em anticorpos derivados materno. As titulações de PCV obtidas são comparáveis com as titulações obtíveis com uma vacina simples contendo o mesmo antígeno (p. ex., Intervet's Circumvent PCV, sendo que referida vacina proporciona proteção muito boa contra PCV). Para uma sinopse dos valores médios, ver a tabela dada abaixo.

Tabela 6. Titulações médias de anticorpos de PCV no IFT (2log) de soro de porco após vacinação

Grupo	T=3 dias	T=25 dias	T=46 dias
1	11,5	9,6	10,1
2	12,1	9,5	10,8
5	10,9	9,1	7,0

PCR em tempo real em amostras de fezes

Três semanas após a exposição, porcos do grupo 1, 2 e 4 apresentaram menos *Lawsonia* (DNA) em suas fezes em comparação com grupos 3 e 5. Apenas as diferenças entre grupo 1 e 3 (Enterisol) e grupo 4 e 3 foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$, teste U de Mann-Whitney). Para os resultados médios, ver a Tabela 7.

Tabela 7. Resultados médios de PCR em amostras de fezes (log pg) após vacinação e exposição

Grupo	Valor médio
1	1,0
2	1,2
3	2,0
4	0,6
5	1,8

Pontuações histológicas

Pontuações de histologia do grupo 1 e 4 foram significativamente menores em comparação com aqueles dos grupos 3 e 5 ($p < 0,05$, teste U de dois lados de Mann-Whitney (ver Tabela 8)). O número de porcos com PPE confirmada foram 2/13 no grupo 1, 6/12 no grupo 2, 12/14 no grupo 3, 2/7 no grupo 4 e 12/14 no grupo de controle 5. Grupos 1 e 4 apresentaram uma incidência significativamente menor de PPE em comparação com grupos 3 e 5 ($p < 0,05$, teste exato de dois lados de Fischers).

Tabela 8. Pontuação média de histologia para o íleo.

Grupo	pontuação de HE	pontuação de IHC	pontuação total
1	0,4	0,6	1,0
2	0,7	0,7	1,4
3	1,6	1,4	3,0
4	0,4	0,4	0,8
5	1,9	1,5	3,4

10 Conclusão do Exemplo 3

Dos resultados pode-se concluir que o antígeno de membrana celular exterior de carboidrato oferece uma proteção relativamente boa contra ileíte. Verificou-se também a bacterina Lawsonia de células integrais é um bom meio de oferecer o antígeno de carboidrato em uma vacina para combater ileíte. Além disso, dado o fato de que a vacina de combinação proporcionou titulações para anticorpos de Mhyo e PCV em um nível comparável com os níveis obtíveis com vacinas simples disponíveis que são adequadas para combater estes microorganismos, demonstrou-se que uma vacina de combinação compreendendo antígenos de *Lawsonia intracellularis* não-vivos em combinação com antígenos de Mhyo e PCV é vantajosa para combater *Lawsonia intracellularis* e também *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende, em combinação, antígenos não-vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* inativo e ORF2 de PCV-2, e um veículo, o antígeno de *Lawsonia intracellularis* não-vivo sendo uma composição contendo carboidratos, contendo os carboidratos que, em células vivas de *Lawsonia intracellularis*, estão em associação com a membrana celular exterior destas células.

2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a vacina se encontra em uma forma adequada para administração sistêmica.

3. Vacina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a composição contendo carboidrato é material resultante da morte de bactérias de *Lawsonia intracellularis*.

4. Vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a composição contendo carboidrato contém células integrais de bactérias de *Lawsonia intracellularis* mortas.

5. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a vacina compreende um adjuvante de óleo em água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico.

6. Vacina de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o adjuvante compreende gotículas de óleo biodegradável e gotículas de óleo mineral, sendo que as gotículas de óleo biodegradável apresentam um tamanho médio que difere do tamanho médio das gotículas de óleo mineral.

7. Vacina compreendendo, em combinação, antígenos não-vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino, e um veículo, o antígeno de *Lawsonia intracellularis* sendo células integrais inativadas de *Lawsonia intracellularis*, o antígeno de *Mycoplasma*

hyopneumoniae sendo *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado e o antígeno de circovírus porcino sendo um antígeno inativado de PCV-2, caracterizada pelo fato de que é para uso na proteção contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino.