

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 756**

51 Int. Cl.:
A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09724781 .1**
96 Fecha de presentación: **25.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2280725**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

54 Título: **Vacuna para la protección contra Haemophilus parasuis serotipo 4 en lechones**

30 Prioridad:
26.03.2008 EP 08153290
26.03.2008 US 39590 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.08.2012

73 Titular/es:
Intervet International B.V.
P.O. Box 31 Wim De Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer

72 Inventor/es:
SEGERS, Ruud, Philip, Antoon, Maria;
WITVLIET, Maarten, Hendrik y
HENSEN, Selma, Marianne

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 756 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

Vacuna para la protección contra *Haemophilus parasuis* serotipo 4 en lechones

5 La presente invención se refiere a una vacuna para proteger a lechones contra *Haemophilus parasuis* serotipo 4.

10 *Haemophilus parasuis* es una bacteria patógena oportunista del tracto respiratorio superior de los cerdos. Es la causante de la enfermedad de Glässer, una afección que da como resultado una amplia diversidad de síntomas clínicos tales como artritis, pericarditis, pleuritis, poliserositis, meningitis y muerte aguda. La enfermedad de Glässer es principalmente un problema asociado con la lactancia de lechones. Sin embargo, con la prestación de nuevas tecnologías sanitarias, tales como el destete precoz segregado (DPS) y la aparición de nuevos patógenos, tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), la frecuencia de la enfermedad de Glässer ha aumentado. En primer lugar, los problemas con *Haemophilus parasuis* empeoran por infección del SRRP. Junto a esto, aunque las tecnologías del DPS han eliminado a *Haemophilus parasuis* de determinadas piaras, esto se ha convertido en un problema muy grave para compañías de cría de ganado: su objetivo es elevar el estado de salud de sus animales y en el proceso aumentar la susceptibilidad de ganado de reemplazo contra *Haemophilus parasuis*. La enfermedad aguda de Glässer se produce con frecuencia cuando en una granja infectada se introducen lechonas o verracos de reemplazo en un estado completamente sano. Por lo tanto, entre otras cosas, resulta de gran importancia inmunizar a animales vírgenes antes de introducirlos en granjas infectadas. En términos generales, la obtención de protección contra *Haemophilus parasuis* mediante inmunización se ha vuelto cada vez más importante. Existen diferentes serotipos conocidos de *Haemophilus parasuis*, pudiendo cada uno de estos identificarse usando la técnica de inmunodifusión (Kielstein et al. en J. Clin. Microbiol. 30:862-865; 1992 y Rapp Gabrielson et al. en AJVR 53:659-664; 1992).

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

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

50 La desventaja de las vacunas hasta ahora conocidas es que para tener protección contra los serotipos que son más prevalentes, es decir, los serotipos 4 y 5, ambos serotipos tienen que estar en la vacuna. Desde un punto de vista de seguridad esto es una desventaja (más bacterias presentes significa un mayor contenido de la vacuna de LPS), pero también desde un punto de vista económico: la presencia de dos tipos de bacterias en la vacuna implica una mayor posibilidad de fracaso de lote y un mayor riesgo de contaminación. Por lo tanto, aumenta la posibilidad de que se encuentre un lote inadecuado para la venta. Es por lo tanto un objeto de la presente invención superar, o al menos mitigar, las desventajas de las actuales vacunas contra *Haemophilus parasuis*.

60 Para este fin se ha descubierto que la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 puede usarse en la fabricación de una vacuna para la administración a una cerda o lechona preñada, para proteger a un lechón tras el parto, mediante la ingesta de calostro de dicha cerda o lechona, contra un trastorno producido por la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 4. El solicitante ha demostrado que, cuando se vacuna a la cerda o a la lechona con una vacuna basada en antígenos de la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5, cuando el lechón ingiere calostro de dicha cerda o lechona después del parto, al lechón se le protege contra un trastorno producido por la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 4. Dada la técnica anterior que, de manera específica y persistente, instruye acerca de que una vacuna que contiene antígenos de la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 no proporciona protección contra la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 4, esto podría no haberse esperado de manera razonable. Se observa que,

para el uso de acuerdo con la presente invención, pueden diseñarse muchas realizaciones una vez que se sabe que la protección cruzada contra el serotipo 4 puede proporcionarse inmunizando a la cerda o a la lechona contra *Haemophilus parasuis* serotipo 5. Por ejemplo, la bacteria podría introducirse en la vacuna como tal (atenuada viva o inactivada), la bacteria podría usarse para obtener un extracto de uno o más componentes inmunogénicos de la bacteria para introducir en la vacuna o podría usarse para llegar incluso a una subunidad recombinante de la bacteria para usar como el antígeno real para formular la propia vacuna.

En una realización la vacuna comprende células inactivadas de la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 y/o sus derivados. Parece que una vacuna que comprende células inactivadas y/o sus derivados proporciona suficiente protección. La ventaja del componente inactivo es la seguridad. La bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 puede inactivarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como usando inactivadores químicos tales como beta-propiolactona, timerosal (u otro agente donante de mercurio), formaldehído, etc., aplicando métodos físicos tales como calor, luz UV, microondas, etc., usando métodos biológicos tales como métodos basados en enzimas para destruir a la bacteria y cualquier otro método aplicado normalmente en la técnica. Usando tales métodos, partes de las células bacterianas pueden perder su asociación con las células. En particular, esto podría ser el caso con los componentes asociados a la membrana celular tales como la propia membrana externa o proteínas de la membrana externa. De esta manera, en el sentido de la presente invención, las células no completamente inactivadas que permanecen pueden considerarse como derivados. También, las partes que pierden su asociación con las células pueden considerarse como derivados, en el sentido de la presente invención. Normalmente se sabe, en particular para componentes asociados con la membrana externa, que estos componentes pueden contribuir en general con la respuesta inmunológica eficaz del animal diana frente a la vacuna. Como tal, estos componentes podrían usarse en muchos casos como los únicos componentes en la vacuna. En el último caso, pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para obtener tal componente en forma (sustancialmente) pura, es decir, preparándolo mediante una técnica recombinante, sintetizando el componente o purificando el componente fuera del caldo de fermentación. En general, en el sentido de la presente invención, un derivado es un componente no vivo de la bacteria *Haemophilus parasuis*, distinto de células completas inactivadas.

En otra realización después de una primera vacunación de la cerda o de la lechona se realiza una segunda vacunación, teniendo lugar la primera y la segunda vacunación antes del parto de la cerda o de la lechona. Este esquema de vacunación ha demostrado conducir a una protección óptima del lechón. En una realización preferida la primera vacunación se realiza de 6 a 8 semanas antes de una fecha de parto esperada y la segunda vacunación se realiza de 2 a 4 semanas antes de esta fecha.

La invención también se refiere a bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 5 para su uso en la fabricación de una vacuna para la administración a una cerda o a una lechona preñada, para proteger a los lechones, después del parto, mediante la ingesta de calostro de dicha cerda o lechona, contra un trastorno producido por bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 4.

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

Diseño experimental

Se vacunaron cinco cerdas (cerdas SPF, por las siglas en inglés *H. parasuis free*, libre de bacteria *H. parasuis*) (por vía intramuscular, 2 ml) con la vacuna Porcilis Glässer DF, disponible en el mercado, en un intervalo de 6 a 8 semanas antes de la fecha de parto esperada y 4 semanas después (de nuevo por vía i.m., 2 ml). Esta vacuna se encuentra disponible en Intervet B.V., como parte de Schering-Plough Corporation, Boxmeer, Países Bajos. La vacuna comprende células completas de la bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 inactivadas con formaldehído y el componente activo se suspende en adyuvante Diluvac Forte (aceite en agua). En general, cualquier otra vacuna que comprenda antígenos de *H. parasuis* serotipo 5 puede formularse usando métodos conocidos en la técnica que básicamente comprende mezclar antígenos adecuados de *H. parasuis* (vivos o inactivados, células completas, extractos, fracción purificada o incluso subunidades) con un transportador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un transportador líquido tal como agua (opcionalmente tamponada) o un transportador sólido tal y como se usa normalmente para obtener vacunas liofilizadas. Opcionalmente se añaden otras sustancias tales como adyuvantes, estabilizantes, modificadores de la viscosidad u otros componentes dependiendo del uso al cual se destina o de las propiedades requeridas de la vacuna. En este ejemplo se usó la vacuna disponible en el mercado como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

Como controles negativos se incluyeron cinco cerdas no vacunadas. A aproximadamente 4 semanas de vida, 2 lechones de cada cerda se transfirieron a la granja experimental y se expusieron a *H. parasuis*. El examen post mortem se realizó 10 días después de la exposición o antes en caso de que el animal muriese o tuviese que someterse a eutanasia por razones de bienestar del animal. Se recogieron muestras de sangre y de calostro de las cerdas que iban a parir.

El componente de exposición es un aislado de campo (cepa viva) de *Haemophilus parasuis* serotipo 4. El aislado se obtuvo usando un método conocido a partir de la referencia de Oliveira, como se ha mencionado anteriormente en el

presente documento. El cultivo de exposición se preparó poco antes de la exposición. *Haemophilus parasuis* se cultivó en placas de agar con chocolate con NAD a 37 °C durante 24-72 horas. La bacteria se recogió con 2 a 5 ml de medio CYS por placa y esto se usó para inocular el medio CYS con NAD (de 2 a 5 ml por 100 ml de medio). A continuación se realizó incubación a 37 °C durante ± 5 horas. Después, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 2.000 g y el sedimento se resuspendió en PBS 0,04 M. Los materiales de exposición se conservaron en hielo hasta su uso, cuyo uso se realizó en 2 horas. Los lechones se expusieron a *Haemophilus parasuis* a través de aerosol en un compartimento para aerosol. Esto se realizó en dos grupos de 10 lechones cada uno (5 lechones se inmunizaron de manera pasiva y 5 fueron controles). El aerosol se proporcionó mediante un nebulizador de tipo Devilbis. La cantidad total de cultivo de exposición por grupo de 10 lechones fue de 50 ml. El cultivo de exposición contenía ± 10⁸ ufc/ml. Los lechones se dejaron en los compartimentos para aerosol durante aproximadamente 30 minutos.

Después de la exposición, se puntuaron diariamente la temperatura rectal, el estado general, anomalías en cuanto a locomoción, sistema nervioso y otras anomalías.

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

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

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

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

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

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

El sistema de puntuación para otras anomalías fue el siguiente:

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

De manera automática, cualquier lechón que proporcionó una puntuación de 4 para la categoría de síntoma clínico que conducía al criterio de valoración desde el punto de vista humano se sometió a eutanasia. La puntuación clínica total por lechón fue la suma de las puntuaciones clínicas diarias desde la exposición hasta el examen post mortem.

Resultados

Después de las vacunaciones con Porcilis Glässer las cerdas mostraron un buen aumento en cuanto a las titulaciones en suero contra *H. parasuis*. Antes de la vacunación las titulaciones en suero de todas las cerdas estaban por debajo de 6,7 log₂, a excepción de una cerda del grupo vacunado que tuvo una titulación en suero de 8,4 log₂ antes de la primera vacunación. Las titulaciones en suero justo antes del parto variaban de 8,6 a 12,6 log₂ para las cerdas vacunadas, mientras que las titulaciones de las cerdas no vacunadas permanecieron por debajo del límite de detección del análisis inmunoenzimático ELISA (< 6,7 log₂). Las titulaciones en el calostro de las cerdas vacunadas variaban de 9,0 a > 13,7 log₂, mientras que las titulaciones en el calostro de las cerdas no vacunadas variaban de < 6,6 a 7,9 log₂. A las 4 semanas de vida, 2 lechones de cada cerda se expusieron a *H. parasuis* serotipo 4. En la Tabla 1 se presentan los resultados.

La Tabla 1 muestra que la puntuación clínica media (es decir, el valor medio de los 10 cerdos de la puntuación clínica total por lechón, es decir, la suma de las puntuaciones clínicas diarias desde la exposición hasta el examen post mortem) para los 10 lechones que habían tomado calostro de cerdas vacunadas es mucho menor que la puntuación clínica media para los animales de control. Lo mismo sucede para la mortalidad.

Tabla 1. Resultados de protección de los lechones

Tratamiento	Nº de lechones	Puntuación clínica media	Mortalidad [n/n _{tot}]
Inmunizados de manera pasiva	10	1,2	0/10
Controles	10	48	6/10

En el estudio descrito en el presente documento, tras la exposición, se observaron reducciones significativas de los síntomas clínicos y mortalidad en los lechones inmunizados de manera pasiva comparados con los lechones de control. La cerda que ya tenía una titulación en suero contra *H. parasuis* al inicio del experimento respondió bien a la vacunación a medida que la titulación en suero aumentaba. Los resultados después de la exposición de los dos lechones de esta cerda fueron completamente comparables con los de otros lechones del mismo grupo. Esto indica que una mayor titulación de la cerda al inicio del estudio no ejerció influencia sobre el resultado del estudio. Para verificar que no había ningún efecto sobre el resultado del estudio, se repitieron los datos estadísticos después de excluir los resultados de los dos lechones procedentes de esta cerda. Los síntomas clínicos y la mortalidad fueron de nuevo significativamente diferentes de los del grupo de control. En conjunto, se puede llegar a la conclusión de que usando las bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 5 para fabricar una vacuna para la administración a una cerda o lechona preñada, se puede proteger a un lechón mediante la ingesta de calostro de dicha cerda o lechona, después de que haya parido, contra un trastorno producido por las bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 4.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 5 en la fabricación de una vacuna para la administración a una cerda o lechona preñada, para proteger a un lechón, mediante la ingesta de calostro de dicha cerda o lechona, después de que haya parido, contra un trastorno producido por las bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 4.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la vacuna comprende células inactivadas de bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 5 y/o sus derivados.
- 10 3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** después de una primera vacunación de la cerda o lechona se realiza una segunda vacunación, realizándose la primera y la segunda vacunación antes de que la cerda o la lechona haya parido.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la primera vacunación se realiza en un intervalo de 6 a 8 semanas antes de una fecha de parto prevista y la segunda vacunación se realiza en un intervalo de 2 a 4 semanas antes de esta fecha.
- 20 5. La bacteria *Haemophilus parasuis* serotipo 5 para su uso en la fabricación de una vacuna para la administración a una cerda o a una lechona preñada, para proteger a lechones, mediante la ingesta de calostro de dicha cerda o lechona después de que haya parido, contra un trastorno producido por bacterias *Haemophilus parasuis* serotipo 4.