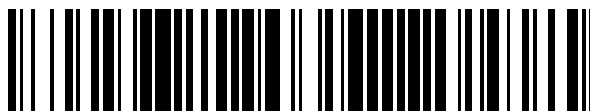


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 677**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2002 E 02760922 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1423141**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

**07.08.2001 NZ 51341801**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.02.2013**

73 Titular/es:

**MASSEY UNIVERSITY (33.3%)  
FITZHERBERT WEST  
PALMERSTON NORTH, NZ;  
NEW ZEALAND MEAT BOARD (33.3%) y  
WOOL PRODUCTION TECHNOLOGIES LTD  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**MURRAY, ALAN;  
DUPONT, CHRISTINE y  
RAE, JEREMY, LAWRENCE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 396 677 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.

## CAMPO TÉCNICO

**[0001]** La presente invención se refiere a vacunas que comprenden proteínas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

## TÉCNICA ANTERIOR

**[0002]** La enfermedad de Johne (paratuberculosis) es una infección contagiosa crónica con el bacilo de tinción acidorresistente *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb). La enfermedad afecta a rumiantes y se caracteriza por emaciación y diarrea intermitente o reblandecimiento de las heces. La enfermedad de Johne es una enfermedad importante en vacas, ovejas, cabras, ciervos y camellos (Beeman y col., The Compendium 11, 1415 (1989)).

**[0003]** El tratamiento preferido en la actualidad se basa en una vacuna de microorganismos vivos (Neoparasec, Meril). Esta vacuna contiene organismos vivos de la cepa Weybridge, una cepa atenuada de M. ptb. También se conocen vacunas inactivadas.

15 **[0004]** Las vacunas existentes presentan dos desventajas. Las carcasas de animales tratados con las vacunas contienen organismos enteros que no son fácilmente distinguibles de los organismos de la tuberculosis. Además, los dos tipos de vacunas dejan lesiones en el sitio de inyección que pueden confundirse fácilmente con lesiones de tuberculosis.

20 **[0005]** Un objeto de la presente invención es preparar una vacuna contra la enfermedad de Johne en la que las desventajas anteriores no estén presentes o se hayan reducido.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25 **[0006]** En un aspecto la invención proporciona una vacuna que comprende una proteína secretada derivada de una cepa de vacuna Weybridge de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que está sustancialmente libre de organismos enteros de esta especie vivos o muertos, en la que la proteína secretada se refiere a proteínas presentes en el sobrenadante de cultivos de organismos de M. ptb cultivados en fase semilogarítmica y después de centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g. Preferentemente no hay organismos de M. ptb. La vacuna de la invención puede usarse para tratar la enfermedad de Johne.

30 **[0007]** En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una vacuna contra la enfermedad de Johne que comprende un sobrenadante de una cepa de vacuna Weybridge de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* M. ptb que puede obtenerse mediante cultivo en fase semilogarítmica y centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g y el sobrenadante no contiene organismos enteros de esta especie, ni vivos ni muertos.

**[0008]** En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una proteína secretada según se define anteriormente, para la preparación de un medicamento con el fin de vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

35 **[0009]** En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un sobrenadante de una cepa de vacuna Weybridge de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que puede obtenerse por cultivo de M. ptb en fase semilogarítmica y centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g de manera que el sobrenadante no contiene organismos enteros de esta especie ni vivos ni muertos, para la preparación de un medicamento con el fin de vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

40 **[0010]** En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende proteína secretada derivada de una cepa de vacuna Weybridge de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que está sustancialmente libre de organismos enteros de esta especie, vivos o muertos, para su uso en la vacunación de un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en la que la proteína secretada se refiere a proteínas presentes en un sobrenadante de un cultivo en fase semilogarítmica de los organismos de M. ptb  
45 después de centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g.

**[0011]** En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un sobrenadante de un cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que no contiene organismos enteros de esta especie, ni vivos ni muertos, que puede obtenerse mediante cultivo en fase semilogarítmica y centrifugación del cultivo durante 10 minutos a 10.000 g para vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb).

**[0012]** El término "sustancialmente libre" indica que el número de organismos vivos o muertos es demasiado

bajo para tener importancia en el procedimiento de vacunación (por ejemplo, menor que 1.000/ml).

**[0013]** Preferentemente la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante.

**[0014]** Preferentemente la vacuna comprende una albúmina sérica, más preferentemente una albúmina sérica heteróloga. Para las ovejas la albúmina preferida en la actualidad es albúmina sérica bovina. Para las vacas se prefiere el uso de albúmina sérica ovina.

**[0015]** Preferentemente cuando las proteínas secretadas se obtienen de un cultivo de microorganismos, los microorganismos se eliminan por centrifugación y posteriormente se filtran para eliminar las bacterias residuales.

**[0016]** Preferentemente las proteínas secretadas se concentran usando ultrafiltración.

**[0017]** El término "proteínas secretadas" en la presente memoria descriptiva se refiere a proteínas presentes en el sobrenadante después de la centrifugación durante 10 min a 10.000 g de un cultivo de organismos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Además de proteínas exportadas el sobrenadante incluye proteínas que se han desprendido de los microorganismos o que están presentes en el cultivo como consecuencia de otras causas. Los animales para los cuales el procedimiento de la invención resulta especialmente útil incluyen los rumiantes, en particular las ovejas.

## 15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### **[0018]**

La fig. 1 es un gráfico que muestra isocitrato deshidrogenasa (ICD) en FC concentrado y en sonicados celulares representados con respecto a DO600.

La fig. 2 es una copia de un gel de SDS-PAGE de medio de cultivo (calle 2) y FC (calle 3).

20 La fig. 3 es un gráfico que muestra el interferón gamma producido en las muestras de sangre de seis animales vacunados y tres animales de control en respuesta a DPP de johnina y antígenos de vacuna candidatos.

La fig. 4 es un gráfico que muestra el interferón producido en muestras de sangre tomadas de animales no vacunados y animales vacunados con Neoparasec, Filtrado de Cultivo (FC) más Adyuvante de Neoparasec (ANP) y medio más ANP, en respuesta a DPP aviar y FC.

25 La fig. 5 es un gráfico que muestra el interferón producido en muestras de sangre tomadas de animales no vacunados y animales vacunados con Neoparasec y FC más adyuvante de Neoparasec, en respuesta a DPP aviar, DPP de johnina y antígeno de FC.

La fig. 6 es un gráfico de respuesta media de interferón gamma a DPP aviar con respecto al número de meses después de la vacunación.

30 La fig. 7 es un gráfico de respuesta media de interferón gamma a FC con respecto al número de meses después de la vacunación.

## **EJEMPLOS**

**[0019]** Los Ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la práctica de la invención.

### **EJEMPLO I**

35 **[0020]** Se realizaron estudios con corderos Romney macho castrados de tres meses de edad obtenidos de Massey Agricultural Services, Palmerston North, Nueva Zelanda. Los animales se mantuvieron en terrenos de explotación ganadera con pasto al aire libre y agua *ad libitum*. Las ovejas usadas en este estudio se seleccionaron basándose en la reactividad negativa con el antígeno micobacteriano de DPP de johnina, según la medición con el kit de ensayo de IFN- $\gamma$  de sangre entera BOVIGAM (CSL).

40 *Antígeno de FC*

**[0021]** Se preparó Filtrado de Cultivo (FC) de antígeno de vacuna de Johnne candidato, que contenía proteínas secretadas de *M. ptb*, a partir de cultivos de medios líquidos de cepa de vacuna Weybridge de *M. ptb* (Neoparasec). Se desarrollaron los cultivos en fase semilogarítmica temprana y se eliminaron las células por centrifugación. Se filtraron los sobrenadantes resultantes (que contenían proteínas secretadas por *M. ptb*) para eliminar las bacterias residuales y se concentraron aproximadamente 200 veces usando ultrafiltración.

**[0022]** Se cuantificaron muestras de control de FC y sólo de medio (M) usando un ensayo de proteínas y se diluyeron apropiadamente en Solución Salina con Tampón de Fosfato (PBS). Se estima que del 5 al 10% del FC

total es proteína secretada de *M. ptb*, siendo el resto albúmina sérica bovina (BSA).

#### *Cultivos de M. ptb y cuantificación de ICD*

**[0023]** La cepa de referencia Weybridge 316F de *M. ptb* se obtuvo de Rhone-Merieux en forma liofilizada y se rehidrató en caldo Middlebrook 7H9 (Difco), suplementado con 1 mg/l de micobactina J (Allied Monitor), bactoglicerol al 0,2% (Difco), Enriquecimiento Middlebrook ADC 1:100 (v/v) (Becton Dickenson) y dextrosa hasta una concentración final de 2 g/l. *M. ptb* se propagó en cuñas de agar 7H10 (Difco) suplementadas con Enriquecimiento Middlebrook OADC según las recomendaciones del fabricante (Becton Dickenson) y se añadió micobactina J como antes. Los cultivos líquidos (7H9) se cultivaron a 37°C con agitación vigorosa.

**[0024]** Se vigiló el crecimiento de *M. ptb* en medio líquido tomando lecturas de Densidad Óptica (DO) a 600 nm, en intervalos regulares durante un periodo de tres semanas. El grado de lisis en los cultivos se determinó por cuantificación de isocitrato deshidrogenasa (ICD), un marcador citoplásmico, en los sobrenadantes concentrados 200 veces (véase más adelante). Se usaron sonicados de *M. ptb* como controles positivos. La actividad de ICD se determinó usando el kit de diagnóstico de ICD para determinación cuantitativa (Sigma), con cambios en la absorbancia a 340 nm correspondientes a la reducción de NADP a NADPH. Los resultados se expresan en unidades internacionales, que son iguales a micromoles de NADPH formados por minuto a 25°C. Se observó una lisis muy escasa en la preparación de los filtrados celulares (véase fig. 1).

#### *Preparación de proteína de filtrado de cultivo (FC) de M. ptb*

**[0025]** Para la preparación de filtrado de cultivo, se cultivaron 5 ml de cultivo de inicio de *M. ptb* en fase logarítmica tardía, se inoculó 1:100 en medio nuevo y se cultivó en fase semilogarítmica (aproximadamente 3 semanas) a 37°C con agitación vigorosa. Se eliminaron las células por centrifugación a aproximadamente 10.000x g y se hizo pasar el sobrenadante del cultivo a través de un filtro de 0,22 µm y se concentró por ultrafiltración usando un aparato Amicon que contenía una membrana de corte a PM de 3.000. El material concentrado se sometió a intercambio con tampón mediante diluciones repetidas con tampón PBS y se reconcentró (dilución aprox. 1.000 veces). Para la etapa de concentración final, el FC se centrifugó a 3.000x g en un aparato Centriplus (Amicon) con un corte a PM de 3.000. El FC concentrado 200 veces resultante se guardó a -20°C hasta que fuera necesario. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando reactivo de Ensayo de Proteínas de Bio-Rad con albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. El control (muestras sólo de medio líquido) se preparó mediante filtración y concentración del medio según se describe anteriormente.

**[0026]** La fig. 2 es una copia de un gel de SDS-PAGE que muestra una comparación entre las proteínas de FC (calle 3) y las proteínas del medio. Las bandas de *M. ptb* principales tienen pesos moleculares de aproximadamente 27 y 40 kD.

#### Experimento

**[0027]** Se seleccionó un grupo de doce corderos (de tres meses de edad) para probar la inmunogenicidad de los antígenos de FC. Se vacunó a seis ovejas con la vacuna de Johnne comercial Neoparasec (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las ovejas restantes se mantuvieron como control sin vacuna. En intervalos mensuales se obtuvo sangre de las ovejas y se analizaron los antígenos de vacunas candidatos usando un kit de ensayo de interferón gamma BOVIGAM. La producción de interferón gamma por linfocitos en sangre entera es una medida de la respuesta inmunitaria mediada por células (protectora) a un antígeno en particular. Cada antígeno fue incubado con 1 ml de sangre durante toda la noche, y a continuación se analizó el sobrenadante mediante ELISA de BOVIGAM para determinar los niveles de interferón gamma producido.

**[0028]** Seis meses después de la vacunación, se incluyó FC (que contenía proteínas secretadas de Neoparasec) en las obtenciones mensuales de sangre en las cantidades siguientes (por 1 ml de sangre de oveja): A = Alto = 150 µg, M = Medio = 75 µg y B = Bajo = 25 µg. De las lecturas de FC se restaron las lecturas correspondientes sólo al medio (que contenían cantidades equivalentes o proteínas del medio). En la mayoría de los casos, las lecturas para los controles negativos no superaron un valor de DO 0,1. El DPP de johnina (control positivo) fue de 12,5 µg para todos los animales. El DPP de johnina es un extracto de organismos enteros de *M. ptb*. La PBS sirvió como control negativo para DPP y se restó de las lecturas de DPP mostradas. Las DO mostradas en la fig. 3 son medias de lecturas por triplicado (incubaciones sangre/antígeno por triplicado).

**[0029]** La respuesta a FC fue más elevada de forma consistente en los animales vacunados que en los animales de control no vacunados. Este efecto se observó en las muestras recogidas en el periodo de 6 a 10 meses. En los animales, la respuesta a los filtrados de cultivo mostró tener respuestas significativamente superiores a los controles del medio entre los animales vacunados en casi todos los casos. En ocasiones, los controles mostraron reacciones importantes a la johnina y los FC (p. ej., 134c, fig. 3) pero este hecho no se observó de forma consistente en diferentes ensayos.

**[0030]** Para proporcionar una evidencia adicional de que las respuestas observadas procedían de los

antígenos de las proteínas en los FC, y no de otros FC de componentes (no proteínas), se precipitó la proteína usando sulfato de amonio (S.A.) y se incluyó en el ensayo de 7 meses. Seguía existiendo una reacción significativa a esta fracción, mientras que el sobrenadante restante de no proteínas (no mostrado) proporcionó una respuesta muy baja. Este resultado indica que la fracción de proteínas de FC es verdaderamente responsable de la estimulación observada.

#### Conclusiones

**[0031]** Al menos parte de la respuesta inmunitaria de "tipo protector" después de vacunación con Neoprasec de ovejas parece deberse a proteínas secretadas por la cepa de la vacuna.

#### EJEMPLO II

10 **[0032]** Se asignaron los animales aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento diferentes. El Grupo 1 no recibió vacunación. El Grupo 2 recibió Neoprasec según las instrucciones del fabricante. El Grupo 3 recibió FC más el adyuvante de Neoprasec. El Grupo 4 recibió medio más adyuvante de Neoprasec.

15 **[0033]** Después de 1, 2, 3, 4 y 6 meses se recogió sangre de cada uno de los animales. Se sometieron a ensayo estas muestras de sangre mensuales para analizar la producción de interferón gamma por linfocitos como una medida del medio celular (respuesta inmunitaria protectora) a DPP aviar, DPP de johnina y FC M. El resultado mostró que la inmunización con Neoprasec produjo una alta respuesta en todas las pruebas *in vitro* para todos los animales. Los animales que no fueron vacunados o que fueron vacunados con medio más ANP produjeron muestras que revelaron una producción de interferón muy baja en respuesta a DPP o FC M. Se mostró una respuesta intermedia en los animales que habían sido vacunados con FC más ANP. En la fig. 4 se muestran los resultados para el ensayo de 1 mes. Se mostraron resultados similares en las muestras de sangre durante los siguientes cuatro meses (no mostrados). La fig. 5 muestra que incluso 6 meses después de la vacunación, existe una respuesta de producción de interferón a DPP de johnina y FC. En las fig. 6 y 7 se muestra la evolución en el tiempo de la respuesta a DPP aviar y FC, respectivamente.

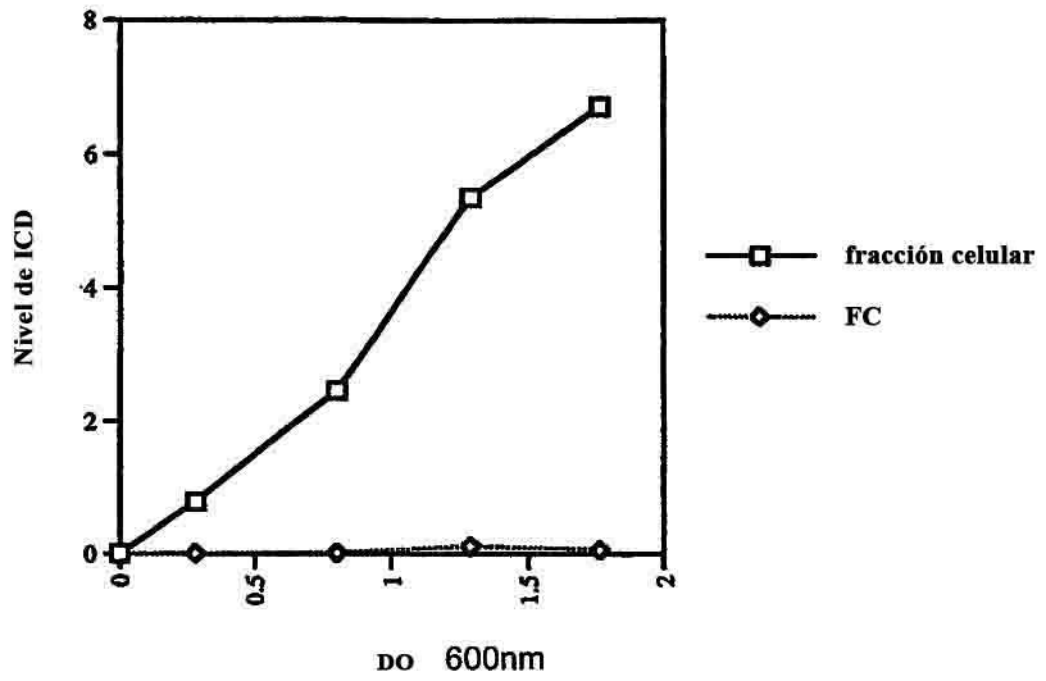
25 **[0034]** Las lesiones en el sitio de inyección se valoraron en 0,5, 1, 2, 3 y 4 meses después de la inyección. En el examen de 0,5 meses el grupo de FC más ANP tuvo la valoración media más alta de los cuatro grupos (incluidos los tratados con la vacuna de microorganismos vivos Neoprasec). En todos los exámenes posteriores las valoraciones medias para el grupo de FC más ANP habían descendido por debajo de las correspondientes al grupo de Neoprasec, pero seguían siendo superiores a las del grupo que recibió medio + ANP y al grupo sin vacunar.

30 **[0035]** A los 2 meses después de la vacunación, se midieron los niveles de anticuerpos usando Paracheck (ensayo inmunoenzimático absorbido de Johne para la determinación de paratuberculosis, CSL Ltd). Los niveles de anticuerpos fueron significativamente más elevados en los grupos vacunados con Neoprasec y en los vacunados con FC que en los animales que no habían recibido tratamiento.

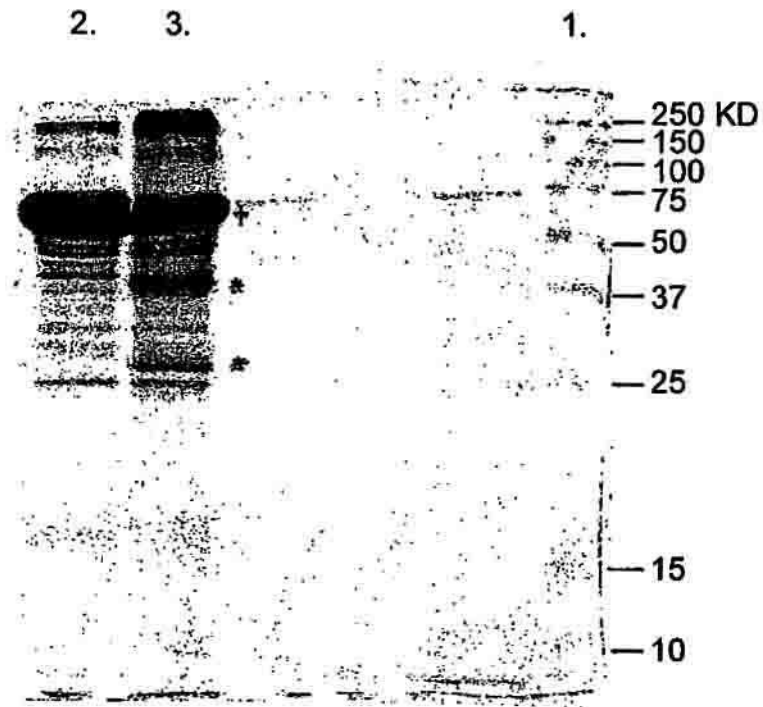
35 **[0036]** Los Ejemplos anteriores son ilustraciones de la práctica de la invención. Los expertos en la materia observarán que la invención puede ponerse en práctica con numerosas modificaciones y variaciones. Por ejemplo, las vacunaciones pueden usar una diversidad de adyuvantes diferentes, es posible variar la cepa de bacteria usada para preparar las proteínas secretadas y las proteínas secretadas pueden fraccionarse.

**REIVINDICACIONES**

1. Una vacuna que comprende una proteína secretada derivada de una cepa de vacuna Weybridge de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que está sustancialmente libre de organismos enteros de esta especie vivos o muertos, en la que la proteína secretada se refiere a proteínas presentes en el sobrenadante de cultivos de organismos de M. ptb cultivados en fase semilogarítmica y después de centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g.
2. Una vacuna según la reivindicación 1, que comprende un adyuvante.
3. Una vacuna según la reivindicación 1 ó 2, que comprende una albúmina sérica.
4. Una vacuna según la reivindicación 2, en la que las proteínas secretadas se obtienen de un cultivo de microorganismos, siendo los microorganismos eliminados por centrifugación y posterior filtración.
5. Una vacuna contra la enfermedad de Johne que comprende un sobrenadante de una cepa de vacuna Weybridge de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) obtenida por cultivo en fase semilogarítmica y centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g y el sobrenadante no contiene organismos enteros de esta especie, vivos o muertos.
6. El uso de una proteína secretada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento para vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
7. El uso de un sobrenadante de una cepa de vacuna Weybridge de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) obtenido por cultivo de M. ptb en fase semilogarítmica y centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g de manera que el sobrenadante no contiene organismos enteros de esta especie, vivos o muertos, para la preparación de un medicamento para vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento comprende un adyuvante.
9. El uso según la reivindicación 7 u 8, en el que el medicamento comprende una albúmina sérica.
10. El uso según la reivindicación 7, en el que el sobrenadante se obtiene de un cultivo de microorganismos, siendo los microorganismos eliminados por centrifugación y posterior filtración.
11. El uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que el animal es un rumiante.
12. Un uso según la reivindicación 11, en el que el rumiante es una oveja.
13. Una vacuna que comprende proteína secretada derivada de una cepa de vacuna Weybridge de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que está sustancialmente libre de organismos enteros de esta especie, vivos o muertos, para su uso en la vacunación de un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en la que la proteína secretada se refiere a proteínas presentes en el sobrenadante de un cultivo en fase semilogarítmica de los organismos de M. ptb después de centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g.
14. Una vacuna que comprende un sobrenadante de un cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb) que no contiene organismos enteros de esta especie, ni vivos ni muertos, obtenida por el cultivo en fase semilogarítmica y la centrifugación del cultivo durante 10 minutos a 10.000 g con el fin de vacunar a un animal contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (M. ptb).



**FIGURA 1**



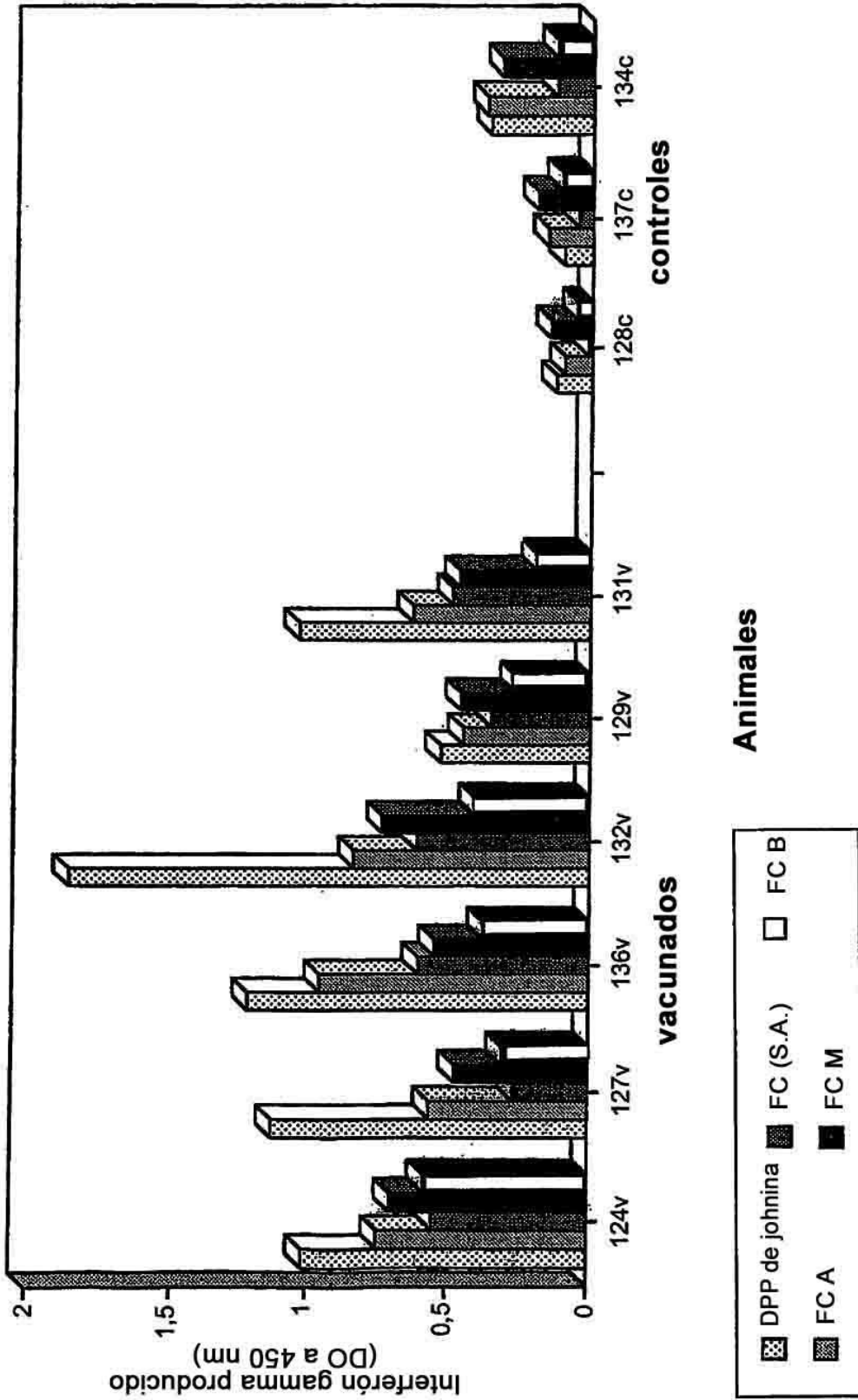
**Calle**

1. Proteína de precisión Biorad estándar
  2. 20 µg de medio de cultivo
  3. 20 µg de filtrado de cultivo (FC) de *M. ptb*
- \* Bandas principales de proteínas de *M. ptb*  
+ Banda de albúmina

**FIGURA 2**



Obtención de sangre 9 Bovigam 11/07/00 – 7 meses después de vacunación



Animales

FIGURA 3

Obtención de sangre 2 13/2/01: BOVIGAM de ovejas vacunadas con Neoparasec y FC – PBS/Medio

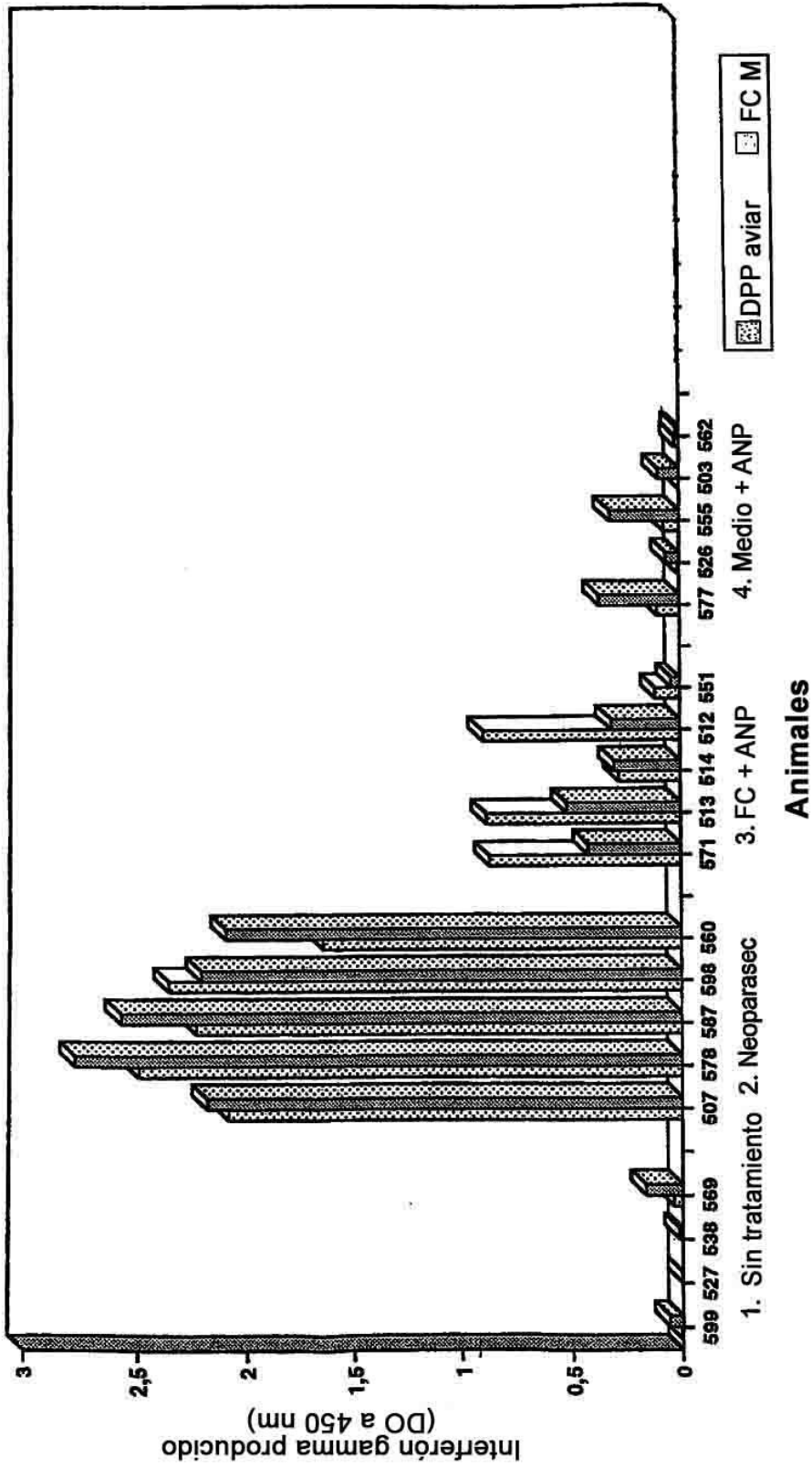
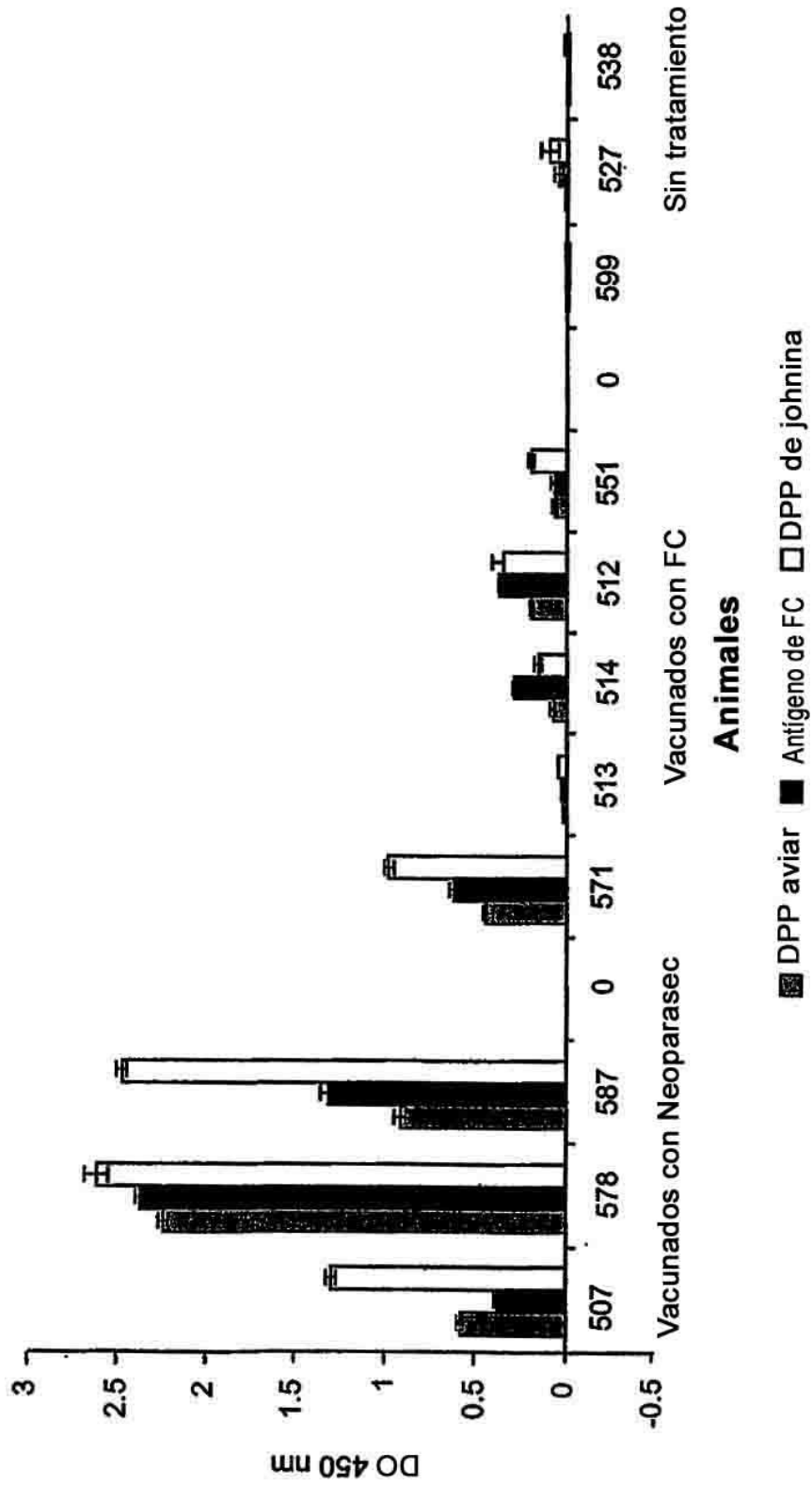


FIGURA 4

**IFN- $\gamma$  6 meses después de vacunación**



**FIGURA 5**

Respuesta media de IFN- $\gamma$  a DPP aviar con el tiempo

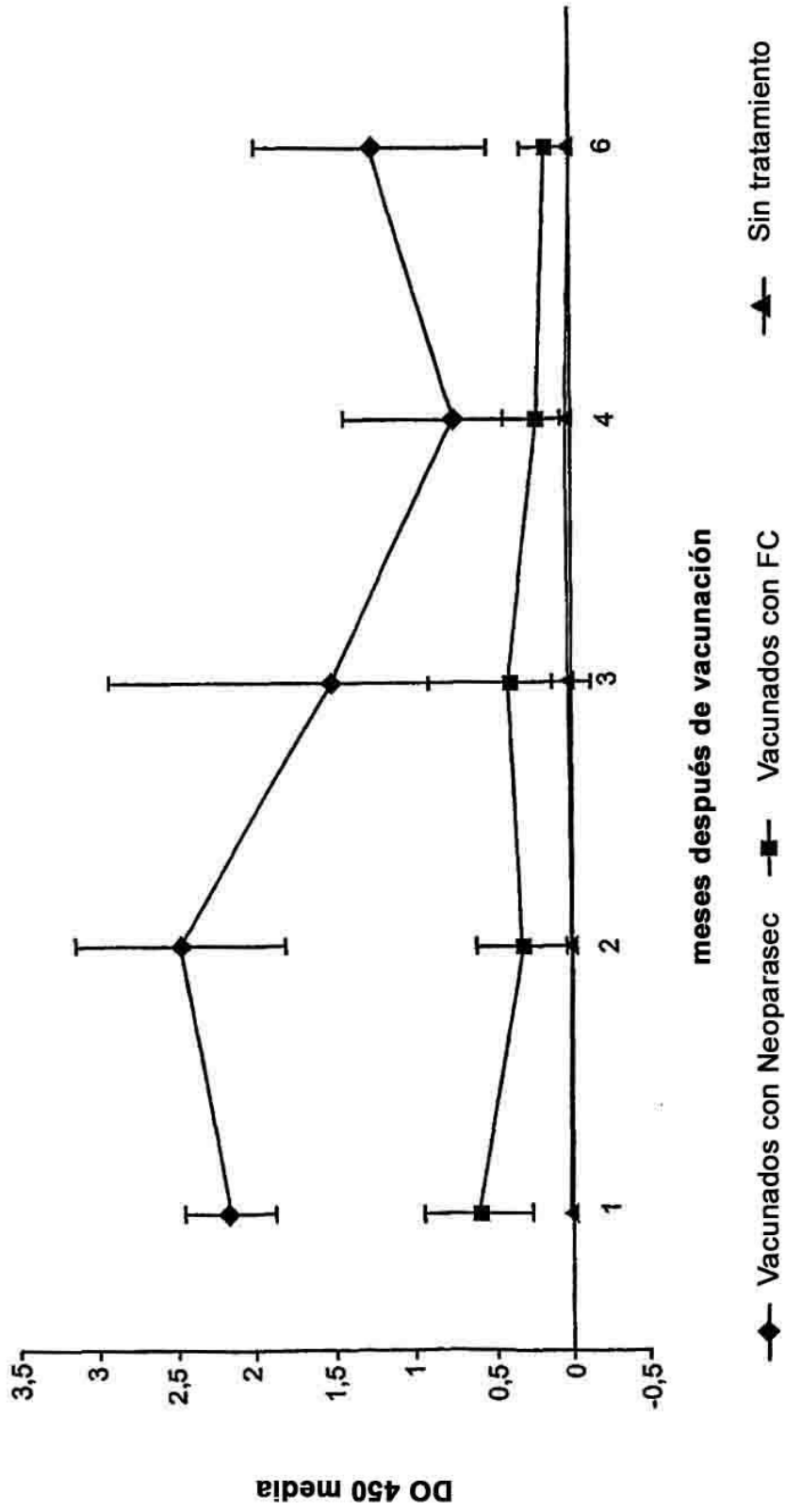
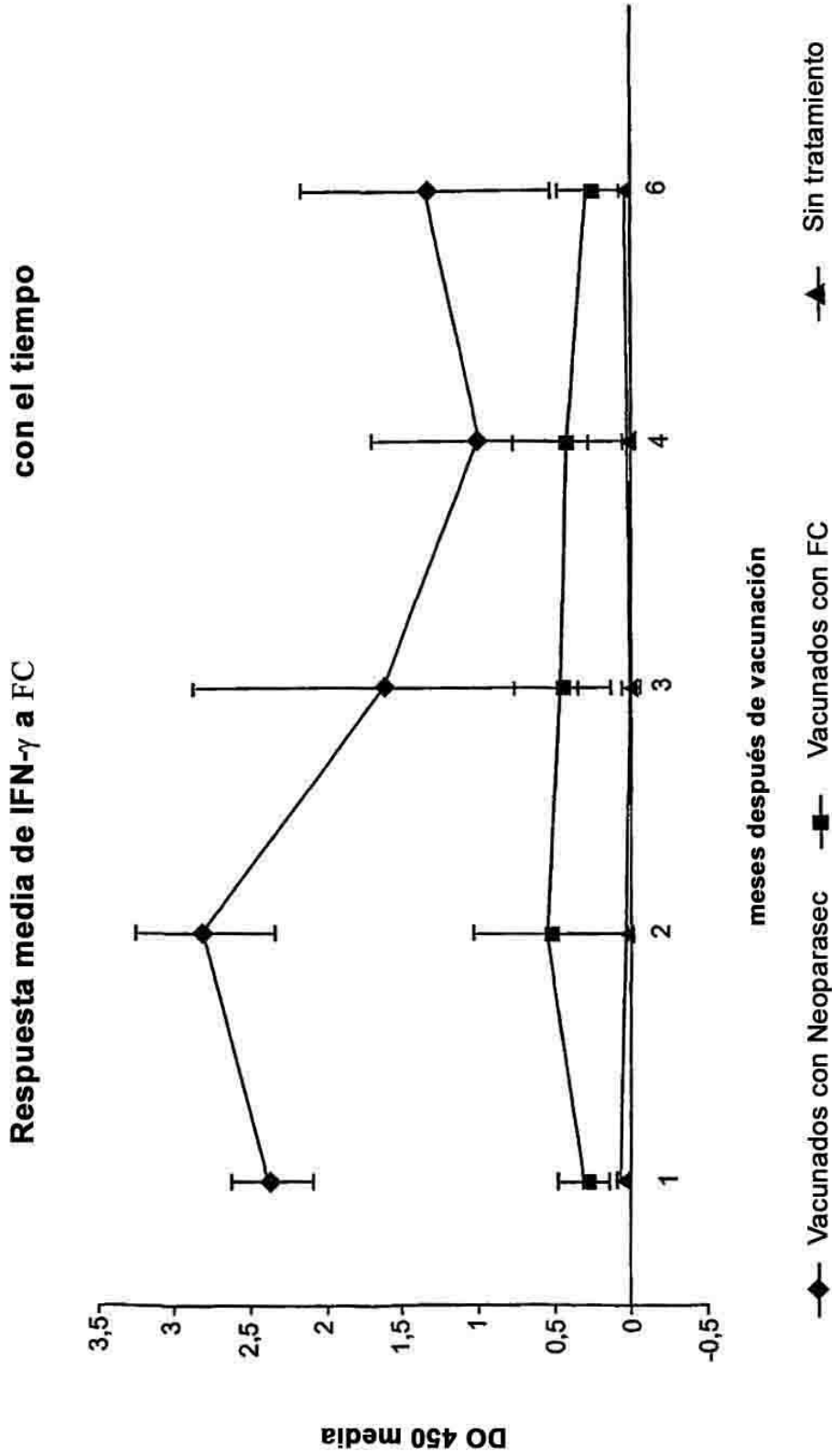


FIGURA 6



**FIGURA 7**