

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 445**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2011 E 11720079 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2569007**

54 Título: **Vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* apta para la administración en presencia de anticuerpos de origen materno**

30 Prioridad:

11.05.2010 US 333502 P
11.05.2010 EP 10162580

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2016

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

WITVLIET, MAARTEN HENDRIK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 559 445 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 contra *Mycoplasma hyopneumoniae* apta para la administración en presencia de anticuerpos de origen materno.

5 La presente invención se refiere a una vacuna que comprende antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivados para su uso en un método para proteger activamente a un animal contra un trastorno que surge a partir de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, incluso cuando se administra en presencia de anticuerpos de origen materno dirigidos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

10 La neumonía micoplásmica de la especie porcina causada por el patógeno bacteriano *Mycoplasma hyopneumoniae* (también abreviado Mhyo) es una enfermedad respiratoria crónica generalizada en cerdos. Especialmente, los lechones jóvenes son vulnerables a esta enfermedad no mortal. La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica que da lugar a una pobre conversión alimenticia y a un crecimiento atrofiado. La enfermedad es altamente
15 contagiosa y la transmisión se produce generalmente a través del contacto directo con secreciones infectadas del tracto respiratorio, p. ej., en forma de gotas infectadas tras toser/estornudar. Una consecuencia problemática importante de esta enfermedad es que se predispone para todo tipo de infecciones secundarias del sistema respiratorio, que puede causar un crecimiento medio diario bajo o incluso la muerte. Se estima que, p. ej., en EE. UU., el 99 % de todas las explotaciones porcinas están infectadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se estima que
20 las pérdidas anuales tienen un coste entre 100 y 300 millones de dólares.

Se conocen en la materia numerosas vacunas para proteger a un animal contra una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se describen vacunas eficaces, que comprenden una preparación de una célula entera o parcial
25 viva modificada o inactivada, una vacuna con subunidades o una vacuna de ácido nucleico o de ADN. Las vacunas disponibles comercialmente, tales como Porcilis® M HYO (disponible en Intervet Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Países Bajos) se basan en muchos casos en preparaciones de células enteras inactivadas (bacterinas).

Se sabe que los lechones jóvenes, incluso en presencia de anticuerpos de origen materno (AOM) contra *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden protegerse (en parte) cuando se vacunan por vía intramuscular con una
30 vacuna contra Mhyo (Drexler *et al* en Veterinary Record, Asociación Veterinaria Británica, Londres, vol. 166, n.º 3, 16 de enero de 2010, págs. 70-74. Sin embargo, se podría mejorar la protección, en particular, tras una única vacunación en presencia de AOM.

A tal efecto, se ha descubierto que la aplicación intradérmica de una vacuna contra Mhyo puede inducir una mejor
35 protección activa cuando se compara con la vacunación intramuscular. Esto permite al menos una mejor protección activa contra Mhyo, que puede inducirse en animales muy jóvenes, sin abandonar una posibilidad en la que apenas se protege a los animales contra Mhyo, y sin correr un riesgo considerable de no administrar vacuna alguna. La invención concierne también al uso de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para la aplicación intradérmica a un animal que posee anticuerpos de origen materno contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en su suero, y a un método para proteger activamente a un animal que posee anticuerpos de origen
40 materno contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, contra un trastorno que surge a partir de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Cabe señalar que Jones ha descrito (*Journal of Swine Health and Production*, vol. 13, n.º 1, págs. 19-27) que la
45 aplicación intradérmica de una vacuna contra Mhyo en cerdos de 13 semanas conduce a títulos de anticuerpos más elevados que la aplicación intramuscular de la misma vacuna. Sin embargo, Jones también reconoció que los títulos de anticuerpos no se correlacionan con la protección efectiva. No se realizó una comparación entre la protección efectiva obtenida tras la aplicación intradérmica o intramuscular. De hecho, Jones concluye que solo la aplicación intradérmica de una vacuna contra Mhyo "es factible y protectora".
50

Cabe señalar asimismo que el documento WO 2007/103042 describe la aplicación intradérmica de una vacuna
55 contra Mhyo. Sin embargo, para ensayar la eficacia de la vacuna, se utilizó la baja incidencia colectiva de *Mycoplasma hyopneumoniae* (véase la página 24, líneas 19-20). No se describen resultados en animales positivos a AOM, por no hablar de una comparación entre la protección obtenida tras la aplicación intramuscular e intradérmica.

Una vacuna en el sentido de la presente invención es una constitución adecuada para la aplicación a un animal, que
60 comprende uno o más antígenos tales como microorganismos atenuados o muertos y/o subunidades de los mismos, o cualquier otra sustancia tal como un metabolito del microorganismo, en una cantidad inmunológicamente eficaz (es decir, capaz de estimular suficientemente el sistema inmunitario del animal diana para reducir al menos los efectos negativos de una exposición a los microorganismos de tipo salvaje), normalmente en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido que contiene agua, que tras la administración al animal induce una respuesta inmunitaria para tratar una enfermedad o trastorno, es decir, ayudar a prevenir, mejorar o curar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, tos, disnea y diarrea) debido a la infección. En general, una vacuna puede fabricarse utilizando métodos conocidos en la materia que básicamente comprenden mezclar los antígenos (o
65 una composición que contiene los antígenos) con el transportador farmacéuticamente aceptable. Los antígenos estimulan suficientemente el sistema inmunitario del animal diana para reducir al menos los efectos negativos de

una exposición posterior a la vacunación (por ejemplo, por infección natural) con microorganismos de tipo salvaje. De manera opcional, se añaden otras sustancias tales como adyuvantes, estabilizadores, modificadores de la viscosidad u otros componentes en función del uso previsto o las propiedades requeridas de la vacuna.

5 En una realización, la vacuna induce una protección activa tras una única vacunación. Sorprendentemente, se descubrió que incluso en presencia de anticuerpos de origen materno dirigidos contra Mhyo, es posible inducir la protección activa contra una infección por Mhyo, cuando la vacuna se administra por vía intradérmica. Esto significa que incluso para una protección prolongada, por ejemplo durante el engorde, se puede prescindir de una vacuna de refuerzo.

10 En una realización, la vacuna es para la administración a animales con edades comprendidas entre 10 y 18 días. Se descubrió que incluso en animales positivos a AOM de tan solo 10 días, en los que los animales poseen títulos elevados de anticuerpos de origen materno, es posible inducir una protección activa adecuada contra una infección por Mhyo. Si no se administra sustancialmente tras 18 días de vida, esto significa que la protección combinada de los anticuerpos de origen materno (protección pasiva durante aproximadamente las primeras 3-4 semanas de vida) y una respuesta inmunitaria activamente inducida (protección activa durante 1-6 meses de vida) pueden proporcionar una protección casi completa contra una infección por Mhyo.

15 Los antígenos de la vacuna comprenden antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivados. Los antígenos inactivados, es decir, antígenos diferentes a las bacterias de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivas (tales como bacterinas, subunidades, etc.) son seguros y han demostrado proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada en cerdos. En particular, cuando se utiliza un adyuvante que comprende acetato de vitamina E (también conocido como acetato de α -tocoferil), puede obtenerse una protección muy buena en animales jóvenes que poseen AOM, incluso tras una única vacunación intradérmica.

20 La invención se explicará ahora adicionalmente utilizando los siguientes ejemplos.

Preparación del ensayo general

30 Se llevó a cabo un ensayo siguiendo un diseño aleatorio y parcialmente ciego. En una granja de ciclo cerrado, sin antecedentes de vacunación contra Mhyo, y con una presencia constante de infección por Mhyo, se dividieron aleatoriamente 1026 lechones (se excluyeron los lechones que muestran signos de la enfermedad, aproximadamente 100 crías) en tres grupos. Un grupo (llamado "IM") se vacunó por vía intramuscular con una vacuna que comprende los mismos antígenos de Mhyo que la vacuna disponible comercialmente en Porcilis M Hyo.

35 Los antígenos se formularon en un adyuvante de emulsión doble llamado "X". Este adyuvante es una mezcla de 5 partes en volumen del adyuvante "A" y 1 parte en volumen del adyuvante "B". El adyuvante "A" consiste en gotas de aceite mineral (Marcol 52) con un tamaño medio aproximado (volumen ponderado) de aproximadamente 1 μ m, estabilizado con Tween 80 en agua. El adyuvante "A" comprende un 25 % en peso de aceite mineral y 1 % en peso de Tween. El resto es agua. El adyuvante "B" consiste en gotas de acetato de vitamina E biodegradable con un tamaño medio aproximado (volumen ponderado) de 400 nm, estabilizado también con Tween 80. El adyuvante "B" comprende un 15 % en peso de acetato de vitamina E y un 6 % en peso de Tween 80, el resto es agua. Un segundo grupo (llamado "ID") se vacunó por vía intradérmica con la misma vacuna (pero más concentrada), y un tercer grupo (llamado "Control") recibió únicamente el adyuvante por inyección intramuscular. Se administró una única vacunación a los 10-18 días de vida.

45 En el momento del ingreso, los lechones se ensayaron para la presencia de anticuerpos de origen materno contra Mhyo. Los lechones se pesaron individualmente en el momento del ingreso y poco antes de sacrificarlos (aproximadamente a los 150 días de vida). En el matadero, los pulmones se puntuaron para las lesiones pulmonares típicas de la infección por Mhyo y pleuritis. La morbilidad (enfermedad definida como la necesidad percibida para el tratamiento individual) y la mortalidad se anotaron durante el ensayo. Los parámetros principales para la eficacia de las vacunas eran la puntuación media de la lesión pulmonar y el aumento de peso medio diario (AMD). La morbilidad, la mortalidad y las lesiones de pleuritis se consideraron parámetros secundarios de eficacia.

Métodos específicos

55 *Vacunación y exposición*

La vacuna de referencia era Porcilis® M HYO, un tipo común de vacuna contra Mhyo, que comprende bacterias de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivadas. Puesto que esta vacuna comercialmente disponible es una vacuna de 2 dosis y la presente preparación es una vacunación de dosis única, la vacuna actual se concentró con respecto a Porcilis® M HYO para tener un contenido antigénico más elevado por ml de vacuna. El grupo IM recibió 2 ml de una vacuna concentrada 5 veces detrás de la oreja izquierda. El grupo ID recibió 0,2 ml de una vacuna concentrada 30 veces en la parte superior del cuerpo, principalmente en el cuello detrás de las orejas utilizando un inyector intradérmico sin aguja como se describe en el documento EP 1 515 763. El efecto neto fue que los animales en el grupo ID recibieron aproximadamente el 60 % de la masa antigénica en comparación con los animales del grupo IM. Además, es preciso darse cuenta que con un denominado dispositivo de administración intradérmica tal como el

dispositivo conocido del documento EP 1 515 763, solo se deposita en realidad una parte de esta masa antigénica en la dermis, depositándose la parte principal en el tejido muscular subyacente. El grupo de control recibió 2 ml de solo adyuvante, inyectado por vía intramuscular detrás de la oreja izquierda.

- 5 La fuente de infección se produjo por la exposición natural presente en la granja, y la infección se produjo por la exposición natural.

Medición de los efectos

- 10 La presencia y la gravedad de las lesiones pulmonares asociadas con la neumonía enzoótica se evaluaron según el método comúnmente conocido de Goodwin y Whittlestone. Para cada uno de los siete lóbulos pulmonares, se estimó la proporción de la superficie con signos de inflamación asociada a Mhyo. Estas proporciones se multiplicaron con los factores de ponderación enumerados a continuación en la Tabla 1 y se sumaron para obtener la puntuación total de la lesión.

15

Tabla 1

	Factor de ponderación
Lóbulos apicales	10
Lóbulos diafragmáticos	5
Lóbulo cardíaco	10
Lóbulo accesorio	5

El aumento de peso medio diario (AMD) se calculó dividiendo el aumento de peso desde la vacunación al matadero, dividido por la duración de ese periodo (en promedio aproximadamente 136 días).

20

La persona que puntuó los pulmones para las lesiones neumónicas también puntuó las lesiones de pleuritis. La presencia se puntuó de la siguiente manera. Uno (1), cuando no presentaron lesiones; Dos (2), cuando presentaron lesiones tóxicas (manchas) y Tres (3) cuando presentaron adhesiones mayores.

- 25 Para la serología, en el momento del ingreso y en el sacrificio, se tomaron muestras de sangre de 30 cerdos por grupo experimental. Estas muestras se ensayaron para los anticuerpos por ELISA (CHECKIT-Hyoptest II, IDEXX).

Resultados

- 30 En el momento del ingreso, el 92 % de los lechones eran seropositivos para los antígenos de Mhyo, lo que muestra que casi todos los animales poseían anticuerpos de origen materno. La edad media era de 13,4 días, los animales más jóvenes tenían 10 días de vida, el mayor 18 días. En un ensayo precedente con animales negativos a AOM (cerdos SPF, exposición experimental con bacterias Mhyo de tipo salvaje) la vacunación intradérmica aproximadamente a las 2 semanas de vida no proporcionó mejores resultados de eficacia que la vacunación intramuscular (los datos no se muestran). Sin embargo, en los cerdos positivos a AOM del presente ensayo, se descubrió una eficacia mejorada significativa en el grupo que recibió la vacuna por vía intradérmica. Las puntuaciones medias de la lesión pulmonar (aproximadamente 315 pulmones por grupo) en el momento del sacrificio se presentan en la Tabla 2. El efecto en el tratamiento de la puntuación de la lesión fue estadísticamente significativo ($P < 0,0001$) según el ensayo de suma de clasificación de Wicoxon.

40

Tabla 2

	IM	ID	Control
Puntuación media de la lesión	18,4	14,1	19,5

El crecimiento de los cerdos se representa en la Tabla 3, que muestra el AMD (en gramos) entre el momento de la vacunación y el sacrificio aproximadamente a los 150 días de vida. Los resultados del grupo ID e IM se compararon utilizando el método de Tukey para comparaciones múltiples. Parece ser que el aumento de peso del grupo ID fue significativamente superior ($P < 0,05$).

45

Tabla 3

	IM	ID	Control
AMD	622	640	617

50

El resultado de las lesiones de pleuritis se representa en la Tabla 4. En la tabla, se proporciona el número de cerdos por tipo de puntuación.

Tabla 4

	IM	ID	Control
1 (sin lesiones)	292	308	274
2 (manchas)	19	12	28
3 (adhesiones mayores)	4	2	6

5 La incidencia de la enfermedad clínica (morbilidad) durante el periodo de crianza era aproximadamente del 28 % en los tres grupos. Sin embargo, durante el periodo final, la morbilidad era del 21 % en el grupo de control, 17 % en el grupo IM y simplemente 8 % en el grupo ID (estadísticamente significativa, $P=0,0007$, según las tablas de contingencia 2x2 por el ensayo de chi cuadrado). Los signos "tos" y/o "disnea" se registraron en el 76 % de los animales infectados. La mortalidad fue ligeramente diferente para los tres grupos: 4,6 % para los controles, 2,2 % para el grupo IM y 1,2 % para el grupo ID. El hecho de que en siete parámetros que son indicativos para la protección efectiva ("puntuación media de la lesión", "AMD", "lesiones", "manchas", "adhesiones mayores", "morbilidad" y "mortalidad"), la vacunación intradérmica puntúa mejor que la vacunación intramuscular, significa que existe una certeza de más del 99 % ($P = 1 - (1/2)^7 = 0,993$) que la vacunación intradérmica proporciona una mejor protección en lechones positivos a AOM.

Conclusión

20 La vacunación intradérmica de animales con anticuerpos de origen materno contra Mhyo, en particular con una vacuna inactivada (tal como por ejemplo Porcilis Mhyo™, aunque cualquier otra vacuna inactivada, que comprende p. ej. bacterias muertas y/o partes de las mismas purificadas a partir de bacterias Mhyo o expresadas de forma recombinante, proporcionará resultados comparables dado que las vacunas inactivadas en principio provocan el mismo tipo de respuesta inmunitaria), proporciona significativamente una mejor protección que la vacunación intramuscular. En particular, el aumento de peso medio diario, y por consiguiente el peso vivo obtenible al final del periodo final se beneficia de este nuevo régimen de administración para los animales seropositivos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivados para la aplicación intradérmica a un animal que posee anticuerpos de origen materno dirigidos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, para su uso en un método para proteger activamente al animal contra un trastorno que surge a partir de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 10 2. Una vacuna para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** induce una protección activa tras una única vacunación.
3. Una vacuna para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** es para la administración a animales con edades comprendidas entre 10 y 18 días.
- 15 4. Una vacuna para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la vacuna comprende acetato de vitamina E como adyuvante.
- 20 5. Uso de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivados para la fabricación de una vacuna para la aplicación intradérmica a un animal que posee anticuerpos de origen materno contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en su suero, para proteger al animal contra un trastorno que surge a partir de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.