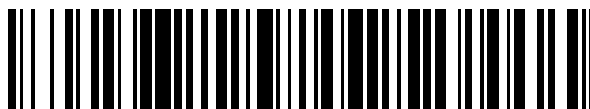


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 194**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2014** **PCT/EP2014/076223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015** **WO15082457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2014** **E 14805616 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3076995**

54 Título: **Vacuna contra Lawsonia intracellularis y el circovirus porcino de tipo 2**

30 Prioridad:

03.12.2013 EP 13195515

01.10.2014 EP 14187317

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN;
FACHINGER, VICKY;
SNO, MELANIE y
WITVLIET, MAARTEN HENDRIK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 786 194 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 *Lawsonia intracellularis* y el circovirus porcino de tipo 2

5 **Campo general de la invención**

La invención se refiere al campo de la salud porcina. Los cerdos son sensibles a muchos microorganismos patógenos. El control de la infección se realiza habitualmente mediante estabilidad y control de la alimentación, tratamiento con productos farmacéuticos, tal como medicamentos antivirales y antibióticos, o tratamiento profiláctico con vacunas.

Objeto de la invención

Existe una necesidad continua de medios cómodos, seguros y eficaces para el manejo de la salud porcina.

Sumario de la invención

Para cumplir con el objetivo de la invención, se diseña una nueva vacuna para la protección combinada de cerdos contra infecciones con diversos microorganismos causantes de enfermedades, comprendiendo la vacuna una combinación las células enteras muertas de bacterias *Lawsonia intracellularis* y la proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2). Tanto el PCV2 como las bacterias *Lawsonia intracellularis* son responsables de pérdidas económicas sustanciales debido a su influencia negativa sobre la salud de los cerdos. Aunque los fármacos y las vacunas son conocidos y están disponibles comercialmente para tratar las infecciones por PCV2 y/o *Lawsonia*, Existe la necesidad continua de nuevas formas de proporcionar una buena protección de una manera segura y cómoda. Se han descrito vacunas combinadas contra la infección por PCV2 y *Lawsonia*, pero no están disponibles comercialmente. De hecho, no todas las combinaciones de antígenos contempladas o sugeridas, en particular no en todas y cada una de las formas de administración, puede conducir a una vacuna combinada segura y efectiva. De hecho, siempre existe un nivel de incertidumbre con respecto a la seguridad y la eficacia de la vacuna combinada, en particular cuando se altera el régimen de administración.

El comité de medicamentos veterinarios de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) en su publicación "Nota orientativa: requisitos para productos veterinarios combinados "(EMA, 2000, CVMP/IWP/52/97-FINAL), declaró (página 2/6) que "el desarrollo de vacunas combinadas no es sencillo. Cada combinación debe desarrollarse y estudiarse individualmente en términos de calidad, seguridad y eficacia ". El comité indica además que la búsqueda de una buena vacuna combinada generalmente incluye la compatibilidad entre los componentes individuales de la vacuna combinada, incluyendo, por ejemplo, conservantes, excipientes y estabilizantes, agentes inactivadores y adyuvantes. En la página 3, párrafo superior, se afirma que "En las vacunas combinadas, la presencia de más de un componente a menudo puede causar una interacción, que conduce a una respuesta disminuida o aumentada a los componentes individuales, en comparación con cuando el (los) componente(s) específico(s) se administra(n) de forma individual. Tales interacciones son a menudo de naturaleza inmunológica, pero también pueden estar causadas por otros factores con menos efectos directos sobre el sistema inmunológico "y también" Cuando se usa un adyuvante para aumentar la respuesta inmunológica a una vacuna combinada, pueden aparecer problemas especiales".

El departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Administración de Alimentos y Fármacos, Centro de Evaluación e Investigación Biológica, publicó en abril de 1997 una "Orientación para la industria, para la evaluación de vacunas combinadas para enfermedades prevenibles: Producción, Pruebas y Estudios Clínicos", orientación en la que se establece (página 3, en "Compatibilidad de componentes") que "La experiencia ha demostrado que la combinación de vacunas monovalentes puede dar como resultado una nueva combinación que es menos segura o efectiva de lo deseable. A veces, los componentes de las vacunas inactivadas pueden actuar negativamente sobre uno o más de los componentes activos", lo que indica que especialmente una vacuna inactivada puede influir negativamente sobre la eficacia de una vacuna viva, como, por ejemplo, cuando se combinó una vacuna viva contra la tos ferina y una vacuna inactivada contra el poliovirus, que dio como resultado una vacuna con potencia disminuida de tos ferina. Se ha indicado que cualquier componente adicional en la vacuna podría complicar la seguridad y la potencia del producto final en comparación con las vacunas individuales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado un curso de aprendizaje electrónico llamado "Conceptos básicos de seguridad de vacunas", que, en el MÓDULO 2, contempla vacunas combinadas. Este módulo comienza con "Las vacunas combinadas autorizadas son sometidas a pruebas exhaustivas antes de su aprobación por las autoridades nacionales para garantizar que los productos sean seguros, eficaces y de calidad aceptable". También se afirma que "Con todas las combinaciones, por lo tanto, los fabricantes deben evaluar la potencia de cada componente antigénico, la efectividad de los componentes de la vacuna cuando se combinan para inducir inmunidad, el riesgo de posible reversión a toxicidad y la reacción con otros componentes de la vacuna".

En la página 53 de este curso de aprendizaje electrónico, la OMS informa de que "La vía de administración es la forma por la cual una vacuna (o fármaco) se pone en contacto con el cuerpo. Este es un factor crucial para el éxito

de la inmunización. Una sustancia debe ser transportada desde el sitio de entrada a la parte del cuerpo donde se desea que tenga lugar su acción. El uso de los mecanismos de transporte del cuerpo para este propósito, sin embargo, no es trivial".

- 5 La Subdivisión de Inmunización del Departamento de Servicios de Salud de California ha publicado pautas para la inmunización correcta (http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/d/vacuna_admin.pdf). Con respecto al sitio de administración se indica en la página 7, primer párrafo completo que "*La ruta y el sitio recomendados para cada vacuna se basan en ensayos clínicos, experiencia práctica y consideraciones teóricas. Esta información se incluye en la información del producto del fabricante para cada vacuna. Hay cinco rutas utilizadas en la administración de vacunas. La desviación de la ruta recomendada puede reducir la eficacia de la vacuna o aumentar las reacciones adversas locales*". En la página 14, se aborda la única vacuna intradérmica autorizada en EE. UU.: "*Fluzone Intradermal es la única vacuna autorizada en EE. UU. que se administra por vía intradérmica. Está aprobado solo para su uso en personas de 18 a 64 años de edad. Esta formulación de Fluzone no es igual que las formulaciones intramusculares de la vacuna inactivada contra la gripe (TIV). Otras formulaciones de TIV NO deben administrarse por vía intradérmica*". El documento WO2009/127684 desvela una vacuna que comprende células enteras muertas de la bacteria *Lawsonia intracellularis* y la proteína ORF2 de PCV2 para uso intramuscular.

20 Considerándolo todo, cualquier combinación de antígenos particulares y un sitio de administración no es sencilla y requiere experimentación para determinar la seguridad y la eficacia.

La presente invención, junto a la vacuna como tal, también describe un método para proteger a un cerdo contra una infección con la bacteria *Lawsonia intracellularis* y el PCV2, que comprende administrar dicha vacuna por vía intradérmica y un método para constituir dicha vacuna.

25 Definiciones

Una *vacuna* es una constitución que protege contra una infección (después de la vacunación) con un microorganismo patógeno.

30 *La protección contra una infección* con un microorganismo patógeno denota prevenir o reducir la infección por el propio microorganismo o prevenir o reducir una enfermedad (sub)clínica que resulta de la infección, normalmente al interferir con el propio microorganismo, por ejemplo, a través de anticuerpos, en el huésped vacunado.

35 Una composición que comprende *bacterias de células enteras muertas* como antígeno comprende una constitución antigénica que se obtiene con e la muerte de las células enteras de las bacterias. Esto no excluye que las células bacterianas se rompan, al menos parcialmente, durante el proceso de destrucción, o que un extracto u homogeneizado de las células completas muertas se proporcione realmente como el antígeno en la "vacuna que comprende las bacterias de células enteras muertas" en el sentido de la presente invención. Las bacterias de *Lawsonia intracellularis* de células enteras muertas se conocen, por ejemplo, a partir de los documentos WO2009/144088 y WO97/20050.

45 La proteína *ORF2 del PCV2* es la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2. La ORF 2 del PCV 2 codifica una proteína de aproximadamente 28 kDa. La ORF 2 de todos los aislados de PCV-2 comparte una identidad de secuencia de nucleótidos del 91-100 % y una identidad de secuencia de aminoácidos deducida del 90-100 % (Fenau et al., J.Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000). La proteína ORF2 puede, por ejemplo, expresarse de forma recombinante, por ejemplo en un sistema de expresión de baculovirus, tal como se describe en los documentos WO2007/028823, WO 2007/094893 o WO2008/076915.

50 La *administración intradérmica de una vacuna* significa que se deposita una cantidad suficiente de la vacuna en la dermis, que conduce a una respuesta inmunológica significativamente diferente (en particular: cuando se usa la prueba de suma de rangos de Wilcoxon en una prueba configurada como se describe en el Ejemplo 3, el valor de p debe ser menor que 0,10, preferentemente menor que 0,05) de una administración intramuscular con la misma vacuna y volumen de la misma. Varios dispositivos están disponibles comercialmente para la vacunación intradérmica, por ejemplo el vacunador IDAL® (MSD Animal Health), Pulse 50 MicroDose (Pulse Needle Free Systems) u otros dispositivos como se describe en Vaccine, 2012 Jan 11;30(3):523-38 (véase en particular la Tabla 1, página 525: "Una visión general de los diferentes dispositivos para la administración de formulaciones líquidas y sólidas")

60 La *administración una sola vez* a de una vacuna para uso en la protección significa que para obtener inmunidad protectora, no es necesario reforzar la vacunación con una segunda administración. En un régimen de dos administraciones, la primera vacuna (de sensibilización) generalmente se refuerza a las 6 semanas de la primera administración, habitualmente a las 3 o incluso 2 semanas de la primera administración, y solo después de la segunda administración (refuerzo) se entiende que se obtiene inmunidad protectora.

65 Un *vehículo farmacéuticamente aceptable* es un medio biocompatible, es decir, un medio que después de la administración no induce reacciones adversas significativas en el animal sujeto, capaz de presentar el antígeno al

sistema inmunológico del animal huésped después de la administración de la vacuna. Tal vehículo puede ser un líquido que contenga agua y/o cualquier otro disolvente biocompatible, pero también puede ser un sólido como el utilizado habitualmente para obtener vacunas liofilizadas (a base de azúcares y/o proteínas).

5 Realizaciones de la invención

En una realización, la vacuna es para la protección del cerdo después de una única administración. Se descubrió ventajosamente que un cerdo está protegido contra ambos patógenos incluso después de una sola administración de la vacuna. Esta realización no excluye que se administre una vacuna de seguimiento, por ejemplo, de 6 a 12 meses después de la primera vacunación para renovar el nivel de protección. Esta vacunación de seguimiento difiere de una vacunación de refuerzo en un esquema de vacunación de sensibilización-refuerzo, en el que se cree que la protección solo se obtiene después de la vacunación de refuerzo. En un esquema de sensibilización-refuerzo, las dos vacunas suelen tener una diferencia de 2-3 semanas.

La vacuna comprende un adyuvante. Se descubrió que un adyuvante, que generalmente se usa para mejorar la respuesta inmunológica de los antígenos inactivados, no interfiere negativamente con los antígenos de *Lawsonia* o del PCV2 cuando se administra la vacuna en la dermis (que es un sitio conocido por sus reacciones adversas), ni aumenta excesivamente la reactividad al otro antígeno, a pesar de que la OMS advierte explícitamente este tipo de interferencia y reactividad en su curso de Principios básicos de seguridad de la vacuna (véase anteriormente) en la página 1 del curso, últimas dos líneas (sección "Vacunas combinadas"). El adyuvante es un aceite de hidrocarburo saturado que se puede obtener de ExxonMobil® (Marcol® 52), entre 2,5 % (v/v) y 12,5 % (v/v).

En una realización, la vacuna comprende además antígenos inactivados de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), preferentemente bacterina Mhyo. Se ha demostrado que esto conduce a una vacuna cómoda, segura y eficaz contra tres patógenos porcinos principales.

En otra realización más, la vacuna comprende por dosis 1×10^9 bacterias muertas de *Lawsonia intracellularis*, es decir, los antígenos de *Lawsonia intracellularis* inactivados están en una carga tal que la vacuna comprende el antígeno de *Lawsonia intracellularis* correspondiente a 1×10^9 bacterias de *Lawsonia intracellularis* por dosis. Una mayor carga de antígeno, que no está excluido en esta realización, puede influir positivamente en el nivel de protección y la duración de la inmunidad.

En una realización, las bacterias *Lawsonia* se liofilizan antes de agregar las bacterias a una composición, por ejemplo una ORF2 del PCV2 que comprende composición acuosa o emulsión, para constituir la vacuna.

Del mismo modo, en el método para constituir una vacuna para administración intradérmica, en el que el método comprende combinar las células enteras muertas de bacterias *Lawsonia intracellularis* y la proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, las células enteras muertas de bacterias *Lawsonia intracellularis* pueden estar en forma liofilizada y añadirse a una formulación líquida que comprende el vehículo y la proteína ORF2 del PCV2, normalmente en el plazo de 1 hora antes de la administración.

La invención se explicará adicionalmente usando los siguientes ejemplos y figuras.

Ejemplos

El ejemplo 1 es un experimento para demostrar que una vacuna intradérmica de dosis única puede proporcionar veintitrés semanas de inmunidad contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2.

El ejemplo 2 es otro experimento con una estrategia de vacunación ID de PCV2 de una vez que muestra que la vacunación es segura y conduce a títulos protectores.

El ejemplo 3 es una comparación directa entre la vacunación intradérmica y la intramuscular.

El ejemplo 4 describe experimentos con vacunación intradérmica combinada.

El ejemplo 5 describe un experimento con vacunas combinadas, diversas dosis de antígeno y diversos adyuvantes. El ejemplo 6 describe otro experimento con vacunas combinadas.

Figura 1. Serología en un estudio de DOI

Figura 2. Carga viral en suero, heces y órganos

Figura 3. Temperatura corporal promedio

Figura 4. Promedio total de resultados de Ab Ig frente al PCV2

Figura 5 Promedio total de resultados de Ab IgM frente al PCV2

Figura 6. Títulos de anticuerpos en un estudio de duración

Figura 7. Carga viral en los órganos

Figura 8. Carga viral en los órganos

Ejemplo 1

DISEÑO EXPERIMENTAL

La progenie de 10 cerdas con anticuerpos contra PCV2 se utilizó para este estudio. Los lechones se dividieron en las camadas en 2 grupos de 15 animales cada uno. A las 3 semanas de edad, se vacunó a los lechones del grupo 1 por vía intradérmica en el lado derecho del cuello con 0,2 ml de una vacuna que comprende la proteína ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2 (véase el documento WO 2007/028823 para el suministro de la proteína), utilizando el dispositivo de vacunación intradérmica disponible comercialmente IDAL® (disponible de MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos), mientras que el grupo 2 se dejó sin vacunar y sirvió como grupo de control. Se observó a todos los animales del estudio diariamente para detectar signos clínicos. Se tomaron muestras de sangre de todos los animales en el momento de la vacunación, 9, 17, 19 y 21 semanas después. Veintitrés semanas después de la vacunación, cada animal fue expuesto a la infección usando una cepa de virus de exposición del PCV2 de tipo salvaje aplicada intranasalmente.

Se tomaron muestras de suero y frotis fecales un día antes de la exposición y una, dos y tres semanas después de la exposición y se examinaron para detectar el ácido nucleico viral de PCV2 por PCR cuantitativa. Además, se examinaron muestras de suero para detectar anticuerpos contra PCV2. Tres semanas después de la exposición, se realizó la necropsia de todos los animales y se obtuvieron muestras de los ganglios linfáticos inguinales, las amígdalas y los pulmones para determinar el antígeno viral del PCV2 y el ácido nucleico.

La vacuna utilizada se administró como una emulsión de aceite en agua, que comprende 5 % v/v del aceite mineral Marcol® 52 (Exxon), 0,30 % p/v de acetato de vitamina E y 0,32 % de polisorbato 80 (Tween 80; Sigma Aldrich), agua para inyectables y 2000 UA de proteína de PCV2 por 0,2 ml. Las unidades UA se calculan en base a una prueba AlphaLISA de PerkinElmer. Para esta prueba, los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno se llenan con diluciones en serie de la muestra de prueba que contiene el antígeno ORF2 de PCV2 junto con diluciones en serie de un patrón de referencia. Estas diluciones se incuban con perlas aceptoras (recubiertas con anticuerpo monoclonal dirigido contra ORF2 de PCV2) y anticuerpo secundario marcado con biotina que también se dirige contra ORF2 de PCV2. A continuación, la cantidad de anticuerpo secundario unido se cuantifica por incubación con perlas de donantes recubiertas con estreptavidina y detección quimioluminiscente. El patrón de referencia es tal que la vacuna comercialmente disponible Porcilis® PCV está configurada para contener 5000 UA por dosis (2 ml).

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Observación diaria

Se observó a todos los cerdos diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad. Las observaciones consistieron en reacciones sistémicas, que incluyeron pérdida de apetito, tendencia a tumbarse, apatía o somnolencia, temblores, erizado, edema (especialmente alrededor de los ojos), vómitos, diarrea y disnea.

Muestreo de sangre

Se recogieron muestras de sangre antes de la vacunación, 9, 17, 19 y 21 semanas después. Se recogieron muestras de sangre un día antes de la exposición y 7, 13 y 19 días después de la exposición. Esto se realizó en todos los cerdos individualmente.

Frotis fecal

Se tomaron frotis fecales de todos los animales, usando un hisopo seco por animal, un día antes de la exposición, 7, 13 y 18 días después de la exposición. Los frotis se tomaron utilizando procedimientos estándar, en medio que contenía antibióticos. Las suspensiones del material de frotis en medio se clarificaron por centrifugación, se alicuotaron y almacenaron a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

Serología

Todas las muestras de suero fueron examinadas para detectar anticuerpos contra el PCV2, utilizando procedimientos ELISA estándar. En resumen, las muestras de suero diluidas en serie se incubaron en placas de microtitulación recubiertas con antígeno ORF2 de PCV2 expresado en baculovirus. Después de retirar los sueros, todos los pocillos se incubaron con una cantidad fija de anticuerpo monoclonal específico de PCV2 marcado con biotina. A continuación, el MoAb unido se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa, seguido de detección con cromóforos. Los títulos se expresaron como títulos en log2.

Exploración posmortem

Al final del experimento, se sacrificó a todos los animales mediante exanguinación tras aturdimiento. Durante la necropsia, se abrió al animal y las vísceras se inspeccionaron *in situ*, prestando especial atención a los siguientes órganos: pulmones, ganglios linfáticos inguinales y mesentéricos, amígdalas, timo, bazo, hígado y riñones. Después de esto, se extrajeron muestras de amígdalas, pulmón (accesorios lobulares) y ganglios linfáticos inguinales para congelación rápida y posterior análisis por PCR cuantitativa (qPCR).

PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en todos los sueros y frotis fecales, y en el 10 % de los homogeneizados de tejido de amígdalas, pulmón y ganglios linfáticos inguinales. En resumen, se extrajo el ADN de las muestras usando un kit comercial. El ADN genómico del PCV2 en cada muestra se cuantificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores y una sonda de hidrólisis doblemente marcada específica para PCV2. El número de ciclo donde la fluorescencia específica excedió el umbral se correlacionó con los números de ciclo para un conjunto de muestras que contenían cantidades conocidas de un plásmido que contenía el PCV2. Los resultados se expresaron como log10 copias/μl de la mezcla de reacción (log10 c/μl).

Resultados

Al comienzo del experimento, se descubrió que todos los animales estaban sanos. En el grupo de control, se encontró a un animal muerto a las 6 semanas de la vacunación (spv). Dos animales vacunados tuvieron problemas locales leves, es decir, una ligera disfunción motora (rigidez en una pata). Dado que el problema era leve, no se trató a estos animales. Ninguno de los animales vacunados mostró signos de enfermedad o reacciones sistémicas, tal como hipertermia, ingesta reducida de alimento, shock anafiláctico o vómitos.

Los resultados de la serología se dan en la Figura 1. Está claro que los animales vacunados mantienen un título anti-PCV2 que parece nivelarse a aproximadamente 4,0 log₂, mientras que en los animales de control el título disminuye por debajo del límite de detección. Después de la exposición (23 spv, a una edad de 26 semanas), los títulos aumentan ligeramente en el grupo vacunado. En el grupo de control, los títulos se elevan al mismo nivel.

Los resultados de la qPCR se muestran en las Figuras 2A, 2B y 2C ("dpe" = días después de la exposición). Parece que los animales vacunados, a las 23 semanas de la vacunación estaban protegidos de la infección por la exposición a PCV2, como lo demuestra la reducción significativa del ácido nucleico del PCV2 en suero, los órganos linfoides y los pulmones. Además, la vacuna fue capaz de reducir el desprendimiento viral, como lo demostró una reducción significativa de la carga viral en los frotis fecales contra PCV2 de al menos 23 semanas. Esto se realizó en animales de campo, con títulos circulantes de anticuerpos contra PCV2 de aproximadamente 7 log₂, que se considera un nivel medio.

Ejemplo 2

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se asignó un total de 46 lechones de un lote de parto a 4 grupos de tratamiento: dos grupos vacunados de 13 lechones cada uno y dos grupos de control de 10 lechones. El grupo uno se vacunó como se indicó anteriormente en el Ejemplo 1 cuando los lechones tenían aproximadamente dos semanas de edad, el grupo dos fue vacunado cuando los lechones tenían aproximadamente tres semanas de edad. Se vacunó a los lechones por vía intradérmica en el lado derecho del cuello con una dosis única de vacuna. Los grupos 3 (grupo de control de 2 semanas de edad) y 4 (grupo de control de 3 semanas de edad) no fueron vacunados. Se extrajeron muestras de suero de todos los animales el día de la vacunación, 2, 3 y 4 semanas después de la vacunación. Las temperaturas se tomaron un día antes de la vacunación, al día de la vacunación y cuatro horas después y los días 1, 2, 3, 4 después de la vacunación.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Antes de la vacunación, se observó a los lechones para determinar su salud general. Se tomaron las temperaturas corporales de todos los lechones, el día T= -1, el día T= 0 a 0 y 4 horas después de la vacunación y el día T= 1, 2, 3, 4 después de la vacunación.

Se extrajeron muestras de sangre el día de la vacunación y 2, 3 y 4 semanas después. Esto se realizó en todos los cerdos individualmente de acuerdo con procedimientos estándar. Las muestras de sangre se recogieron sin la adición de anticoagulante. Se preparó suero a partir de las muestras de sangre coagulada y se llenaron alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.

Los ELISA de anticuerpo Ig total frente PCV2 y el anticuerpo IgM frente a PCV2 se realizaron como se indica anteriormente en el Ejemplo 1 ("Serología"), excepto que en el caso del ELISA de anticuerpos IgM, las placas se recubrieron con anticuerpo IgM y luego se incubaron con el antígeno ORF2 de PCV2, antes de la incubación con una cantidad fija de anticuerpo monoclonal específico de PCV2 marcado con biotina.

Resultados

Al comienzo del experimento, se descubrió que todos los animales estaban sanos. Los resultados promedio de la temperatura corporal se muestran en la Figura 3. No se pudo ver ninguna diferencia en el aumento promedio de la temperatura corporal entre los animales de dos y tres semanas de edad (el aumento promedio máximo fue entre 0,0-0,3 °C). Además, el aumento máximo de la temperatura corporal de los animales individuales en el grupo 1 y en el

grupo 2 fue comparable al aumento máximo de la temperatura de los animales individuales en los dos grupos de control.

ELISA de anticuerpos Ig totales frente a PCV2

Los resultados promedio de la respuesta total de anticuerpos Ig frente a PCV2 se resumen en la Figura 4. En el momento de la vacunación, los lechones vacunados a las 2 semanas de edad tenían títulos de anticuerpos contra PCV2 más altos (probablemente derivados de la madre) que los lechones vacunados a las 3 semanas de edad. Los animales vacunados mostraron un aumento en el título considerablemente más alto que los animales de control.

ELISA de anticuerpos IgM frente a PCV2

Los resultados promedio de la respuesta de anticuerpos IgM contra PCV2 se muestran en la Figura 5. En el momento de la vacunación, todos los animales eran negativos para anticuerpos IgM. Después de la vacunación, los animales de tres semanas tuvieron una respuesta de anticuerpos IgM considerablemente más rápida y alta que los animales de dos semanas. Los animales de control permanecieron negativos durante todo el estudio.

Según estos resultados, se puede concluir que la vacuna intradérmica de una dosis de los lechones a las 2 y 3 semanas de edad dio como resultado un perfil de seguridad aceptable y una buena respuesta serológica. Se obtuvieron resultados comparables con otro experimento (datos no mostrados) donde el nivel inicial de los títulos de anticuerpos circulantes fue aún mayor, es decir, de hasta 9,4 log 2, que se considera en el extremo superior de un intervalo medio.

Ejemplo 3

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se asignó un total de 30 lechones a tres grupos de tratamiento de 30 lechones cada uno. Los lechones del grupo 1 fueron vacunados por vía intradérmica con una dosis única de vacuna como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 1. Los lechones del grupo 2 fueron vacunados por vía intramuscular con una dosis única de la misma vacuna, con la misma cantidad en el mismo lugar (en el cuello), y los lechones del grupo 3 se dejaron sin tratar. Se extrajeron muestras de suero de todos los animales el día de la vacunación, tres y cinco semanas después de la vacunación.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Antes de la vacunación, se observó a los lechones para determinar su salud general, de acuerdo con los procedimientos patrón. La obtención de muestras de sangre y la serología de los anticuerpos totales anti-PCV2 y los anticuerpos IgM específicos de ORF2 de PCV2 se realizaron de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente en el Ejemplo 2.

RESULTADOS

Al comienzo del estudio, se descubrió que todos los animales estaban sanos. Los resultados de la serología se resumen en la Tabla 1 (títulos expresados como log2). En el momento de la vacunación, los títulos medios de anticuerpos eran relativamente altos. Después de la vacunación, ninguno de los animales mostró un aumento en el título de Ab frente a PCV2. A las 3 y 5 semanas de la vacunación, se pudieron observar títulos medios de anticuerpos anti-PCV2 más altos que en el grupo IM.

Los resultados de la serología de IgM anti-PCV2 se resumen en la Tabla 2 (títulos expresados como log2). A las tres semanas de la vacunación, los títulos de anticuerpos IgM anti-PCV2 del grupo ID fueron considerablemente más altos que los del grupo IM y del grupo de control.

Tabla 1: Resultados del promedio de anticuerpos

Grupos	Título 0 spv	Título 3 spv	Título 5 spv
1	8,2	7,3	6,2
2	8,6	6,5	5,1
3	8,4	6,2	4,3

Tabla 2: Resultados promedio de anticuerpos IgM anti-PCV2

Grupo	Título de IgM 3 spv
1	12,7
2	3,4
3	1,0

Al aplicar la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, el valor de p para la diferencia en la respuesta de IgM para el grupo ID frente al grupo IM fue de 0,0001.

Ejemplo 4

En este estudio se dispuso de progenie de varias cerdas con anticuerpos contra PCV2. Los lechones se dividieron en las camadas en 3 grupos de 18 animales. A las 3 semanas de edad, se vacunó a los lechones de los grupos 1 y 2 por vía intradérmica como se ha indicado en el presente documento anteriormente en el Ejemplo 1. Los animales del grupo 2 fueron vacunados por vía intradérmica al mismo tiempo con la vacuna Mhyo inactivada disponible comercialmente Porcilis® M Hyo ID Once (que contiene una bacterina Mhyo) según las instrucciones del fabricante en el otro lado del cuello. Los animales del grupo 3 (grupo control) permanecieron sin tratar. Se observó a todos los animales del estudio diariamente. Se tomaron muestras de suero en el momento de la vacunación y cada dos semanas hasta que los animales fueron enviados a sacrificar (23-25 semanas de edad). Estas muestras se analizaron para detectar anticuerpos frente al PCV2.

Los procedimientos experimentales fueron como se ha indicado en el presente documento anteriormente en el Ejemplo 1. La serología resultante se muestra en la figura 6. A partir de esta figura, queda claro que los títulos anti-PCV2 permanecen muy por encima del nivel de 4 log 2 establecido con los experimentos como se describe en el Ejemplo 1 y se descubrió que eran protectores. No hay indicios de interferencia negativa entre las vacunas.

Este experimento se repitió para verificar la protección contra *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento. Para este experimento repetido se utilizaron sesenta lechones. Cuarenta animales fueron vacunados a la edad de 18-24 días con la vacuna Mhyo y veinte de estos animales también fueron vacunados con la vacuna PCV. No se vacunó a veinte animales, que sirvieron como controles de desafío. Tres semanas después de la vacunación, se infectó a todos los animales con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* y tres semanas después de la exposición, se analizó a todos los animales posmortem para detectar lesiones pulmonares. Las puntuaciones de lesión pulmonar (LLS) se compararon entre los grupos.

Las LLS para los grupos vacunados con Porcilis® M Hyo ID Once fueron significativamente más bajas que las del grupo de control ($p < 0,05$, prueba de Dunn). No hubo diferencias significativas entre los grupos que habían sido vacunados con Porcilis® M Hyo ID Once solo o en asociación con la vacuna PCV. Por lo tanto, se puede concluir que la vacunación combinada no tiene un efecto negativo sobre la inmunidad obtenida con Porcilis® M Hyo ID Once.

Ejemplo 5

En total, se formularon ocho vacunas que contenían proteína ORF2 del PCV2 (250 a 6000 UA/0,2 ml), Mhyo (al mismo nivel que en Porcilis® Mhyo ID Once) y antígeno de *Lawsonia* (véase el documento WO 20089/127684, ejemplo 2 para los antígenos de células enteras muertas: a un nivel de aproximadamente 1×10^9 células por 0,2 ml). Las vacunas contenían diferentes adyuvantes. Algunas vacunas utilizan el aceite biodegradable existente que contiene adyuvante Diluvac Forte (MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos; llamado "DF"). Otras usaron la formulación adyuvante como se ha descrito en el presente documento anteriormente en el Ejemplo 1 (llamado "X-solve 12"), o adyuvantes formulados con los mismos constituyentes que X-solve 12, pero a la mitad de las concentraciones (llamado "X-solve 6"), o 2½ veces las concentraciones que en X-solve 12 (llamado "X-solve 30"). Las vacunas resultantes fueron las siguientes (no se citan los antígenos Mhyo y de *Lawsonia*; contenido por dosis):

Grupo 1: 2000 UA de PCV2/X-solve 30
Grupo 2: 250 UA de PCV2/X-solve 12

Grupo 3: 500 UA de PCV2/X-solve 12
Grupo 4: 2000 UA de PCV2/X-solve 12
Grupo 5: 2000 UA de PCV2/X-solve 6
Grupo 6: 500 UA de PCV2/DF
Grupo 7: 2000 UA de PCV2/DF
Grupo 8: 6000 UA de PCV2/DF

En este estudio se usó la progenie de 8 cerdas. Los lechones tenían anticuerpos moderados (nivel medio) derivados de la madre (MDA) contra PCV2 (promedio: 6,7 log₂). A las tres o cuatro semanas de edad, los lechones de los grupos uno a ocho fueron vacunados por vía intradérmica con una dosis única, utilizando IDAL® vaccinator. Los lechones del grupo nueve permanecieron sin vacunar. A las siete semanas de la vacunación, se llevó a todos los animales a las instalaciones de exposición. Un día después, se expuso a todos los animales a infección con una cepa de PCV2. Se observó a todos los lechones diariamente para detectar signos clínicos. Las reacciones locales se vigilaron por palpación, comenzando el día de la vacunación y cada dos días después de la vacunación hasta veinte días después de la vacunación.

Se recogieron muestras de sangre de todos los animales el día de la vacunación y tres semanas después, un día antes de la exposición, 1 y 2 semanas después y en el momento de la necropsia. Las muestras de suero tomadas de cada animal se analizaron para detectar anticuerpos contra PCV2 y M hyo. Durante la necropsia, se tomaron muestras de los ganglios linfáticos mesentéricos e inguinales, las amígdalas y los pulmones para cuantificar el ácido nucleico del PCV2.

Los procedimientos experimentales fueron los mismos que los descritos anteriormente en el Ejemplo 2. La respuesta del anticuerpos IgM frente al PCV2 en el momento de la vacunación fue inferior al nivel de detección para todos los grupos (inferior a 2,0 log₂). A las 3 semanas después de la vacunación, el título de anticuerpos frente a PVC fue el más alto para la vacuna 2000 UA de PCV2/X-solve 30, es decir, 20 log₂. Los grupos de X-solve 12, que comprenden 250, E 500 y 2000 UA de antígeno del PCV2 por dosis tuvieron un título de 9, 16 y 19 log₂ respectivamente. El grupo que recibió la vacuna 2000 UA/X-solve 6 tuvo un título de 15 log₂. Los grupos de DF que comprenden 500-, 2000 y 6000 UA de antígeno PCV2 por dosis tuvieron un título de 8, 14 y 16 log₂ respectivamente. Los controles tuvieron un título por debajo del nivel de detección.

En este estudio, se evaluaron las reacciones sistémicas y locales. No se observaron reacciones sistémicas atribuibles a la vacunación. En cuanto a los efectos locales, no más de tres animales vacunados (que recibieron 500 y 2000 UA de X-solve 12 y 6000 UA de DF DE PCV2 por dosis de vacuna respectivamente) tuvieron problemas leves de motilidad, el mismo número que en los animales de control. Por lo tanto, estas reacciones pueden considerarse razonablemente no relacionadas con la vacunación. Con respecto a otras reacciones locales, muchos animales (entre aproximadamente 60-100 %) vacunados con X-solve mostraron reacciones locales, el tamaño promedio de las inflamaciones fue inferior a 3 cm, es decir, entre 1-2 cm, y las inflamaciones desaparecieron en 2-6 días. Usando DF, solo aproximadamente el 30 % de los animales mostró inflamaciones locales, siendo el tamaño medio inferior a 0,5 cm y desaparecieron en un día.

En las figuras 7 y 8 se representa la carga viral en los órganos (promediada) para las diversas vacunas. Parece que todas las vacunas pueden reducir sustancialmente (en estos casos al menos 3 log) la carga viral en los órganos relevantes.

En este estudio, parecía que todos los adyuvantes utilizados eran seguros, indujeron una respuesta anti PCV2 de tipo IgM y pudieron tratar a un animal contra una infección con el circovirus porcino de tipo 2 patogénico. No se encontraron interferencias negativas entre los diferentes antígenos. La serología de *Lawsonia* (no mostrada) muestra una buena respuesta de anticuerpos, según la cual se cree que se obtuvo protección contra una infección con *Lawsonia intracellularis*. Para confirmarlo, se realizó un siguiente experimento que incluyó una exposición a *Lawsonia intracellularis* patogénica (véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 6

Para confirmar que los animales están protegidos contra una exposición a *Lawsonia intracellularis*, La formulación de vacuna con diferentes cantidades del adyuvante X-solve, como se describe en el Ejemplo 5, se formuló de nuevo para varios experimentos de exposición. La base de estas vacunas era una vacuna contra el PCV2 que contenía la proteína ORF2 del PCV2. Se formuló una primera vacuna en X-solve 30 como se indica en el Ejemplo 5. Se formuló una segunda vacuna en X-solve 12, en la que se introdujo el antígeno de *Lawsonia* añadiendo células de *Lawsonia* muertas liofilizadas (el mismo antígeno que se usó en el Ejemplo 5) a la vacuna frente al PCV2 lista para usar en los 30 minutos antes de la administración. La concentración final de la proteína ORF2 del PCV2 en ambas vacunas fue de 2000 UA/0,2 ml. La concentración del antígeno de *Lawsonia* fue la misma que la utilizada para los experimentos como se describe en el Ejemplo 5 (aproximadamente 1x10⁹ células por 0,2 ml). Las vacunas resultantes fueron las siguientes:

- 1:2000 UA de PCV2/*lawsonia*/X-solve 30
- 2:2000 UA de PCV2/*lawsonia*/X-solve 12

Se realizó un primer estudio con la vacuna número 1 (X-solve 30). Se usaron treinta y nueve cerdos, asignados a dos grupos de 19 y 20 cerdos respectivamente. Ambos grupos fueron vacunados a la edad de tres semanas con 0,2 ml de la vacuna por vacunación intradérmica en el cuello como se indica en el Ejemplo 1. El primer grupo fue vacunado con la vacuna número 1 como se ha indicado en el presente documento anteriormente, el segundo grupo con la misma vacuna pero sin los antígenos de *Lawsonia*. Este grupo sirvió como control para la exposición a

Lawsonia. Todos los animales fueron expuestos a la edad de 22 semanas. No se observaron problemas de seguridad inaceptables. Los resultados con respecto al aumento de peso diario promedio (durante los días 14-21 después de la exposición), las puntuaciones del íleon (3 semanas después de la exposición; la puntuación es proporcional a la presencia de lesiones en el íleon debido a la presencia de una infección por *Lawsonia*) y la incidencia de EPP se indica en la Tabla 3. Valores estadísticamente diferentes (pruebas de dos colas, $p < 0,05$; Prueba ANCOVA para ADWG, el modelo logit acumulativo para la puntuación del íleon y la prueba exacta de Fischer para la incidencia de EPP) se indican con un asterisco.

Tabla 3

Vacuna	ADWG en kg	Puntuación del íleon	Incidencia de EPP
Vacuna 1	1,100*	50*	4/19*
Vacuna de control	0,886	83,5	11/20

Se realizó un segundo estudio utilizando la vacuna número 2 (X-solve 12). Se usaron cincuenta cerdos, asignados a dos grupos de 25 cerdos cada uno. Un grupo fue vacunado a la edad de tres semanas con la vacuna indicada en el presente documento como número 2 con 0,2 ml de esta vacuna por vacunación intradérmica en el cuello como se indica en el Ejemplo 1. El segundo grupo no fue vacunado y sirvió como control. Todos los animales fueron expuestos a la edad de 24 semanas. Los resultados con respecto al aumento de peso diario promedio (durante los días 13-20 después de la exposición), las puntuaciones del íleon (3 semanas después de la exposición; la puntuación es proporcional a la presencia de lesiones en el íleon debido a la presencia de una infección por *Lawsonia*) y la incidencia de EPP se indica en la Tabla 4. Valores estadísticamente diferentes (pruebas de dos colas, $p < 0,05$; prueba ANCOVA para ADWG, el modelo logit acumulativo para la puntuación del íleon y la prueba exacta de Fischer para la incidencia de EPP) se indican con un asterisco. Durante la prueba en cada grupo 1, el animal tuvo que ser sacrificado debido a problemas específicos no relacionados con la vacuna.

Tabla 4

Vacuna	ADWG en kg	Puntuación del íleon	Incidencia de EPP
Vacuna 2	1,001*	129*	11/24*
Ninguna	-0,053	241	22/24

Los resultados muestran que la vacunación intradérmica de un animal con una vacuna combinada que comprende la proteína ORF2 del PCV2 y la bacteria *Lawsonia intracellularis* muerta proporciona protección contra una infección por *Lawsonia intracellularis* patogénica. Además, la liofilización del antígeno de *Lawsonia* antes de la formulación parece no tener un efecto negativo sobre la eficacia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende en combinación células enteras muertas de bacterias *Lawsonia intracellularis* y la proteína ORF2 del circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) para su uso en la protección de un cerdo contra una infección con *Lawsonia intracellularis* y PCV2 mediante una administración intradérmica de la vacuna, en donde la vacuna comprende entre 2,5 % (v/v) y 12,5 % (v/v) de un adyuvante de aceite de hidrocarburo saturado.
- 10 2. Una vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el uso es para la protección del cerdo después de una sola administración.
3. Una vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna comprende además antígenos inactivados de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo).
- 15 4. Una vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** los antígenos inactivados de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprenden la bacterina Mhyo.
5. Una vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna comprende por dosis 1×10^9 bacterias *Lawsonia intracellularis* muertas.
- 20 6. Una vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las bacterias *Lawsonia* son liofilizadas antes de añadir las bacterias a una composición para constituir la vacuna.

Figura 1

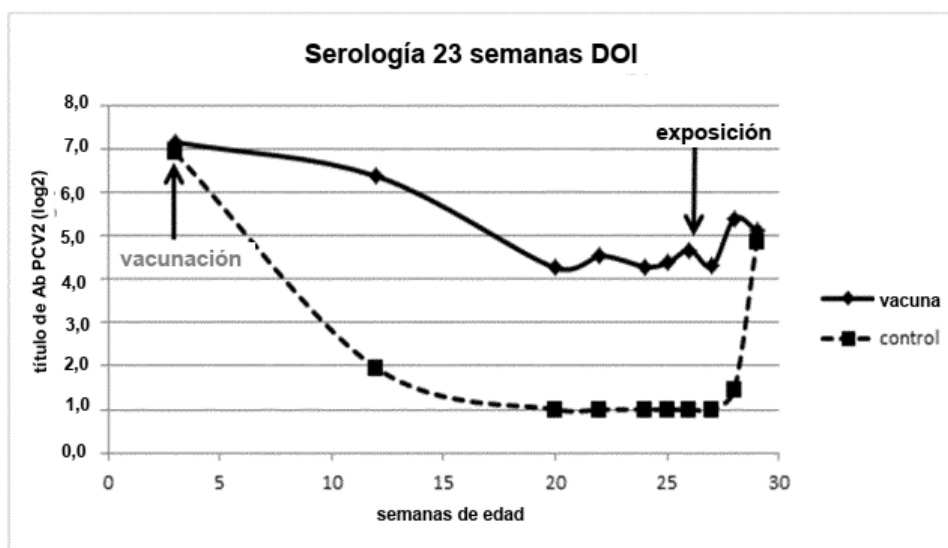


Figura 2

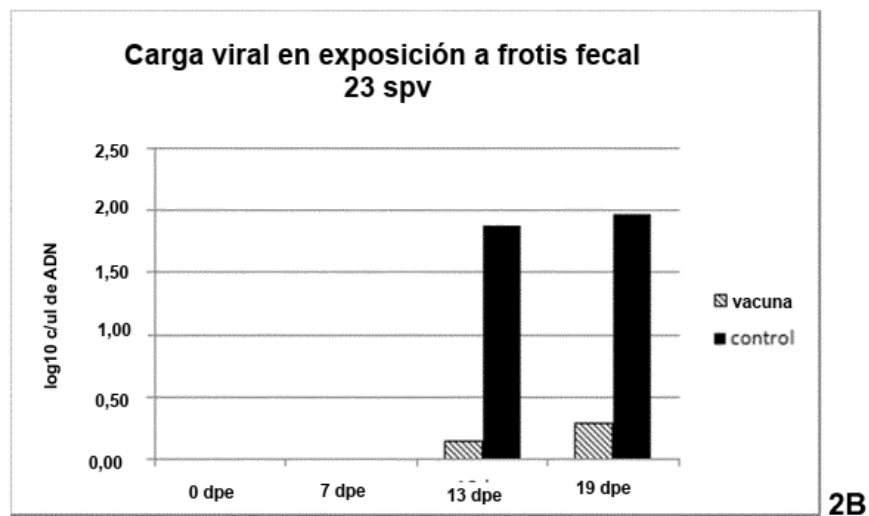
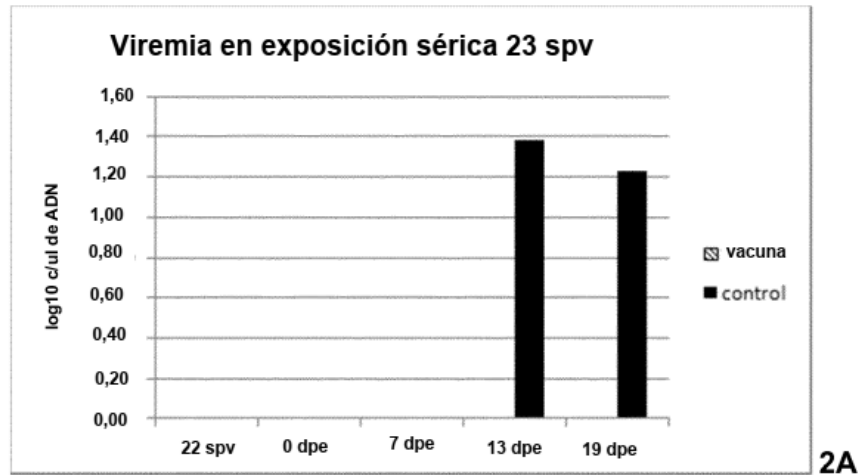


Figura 2 continuación

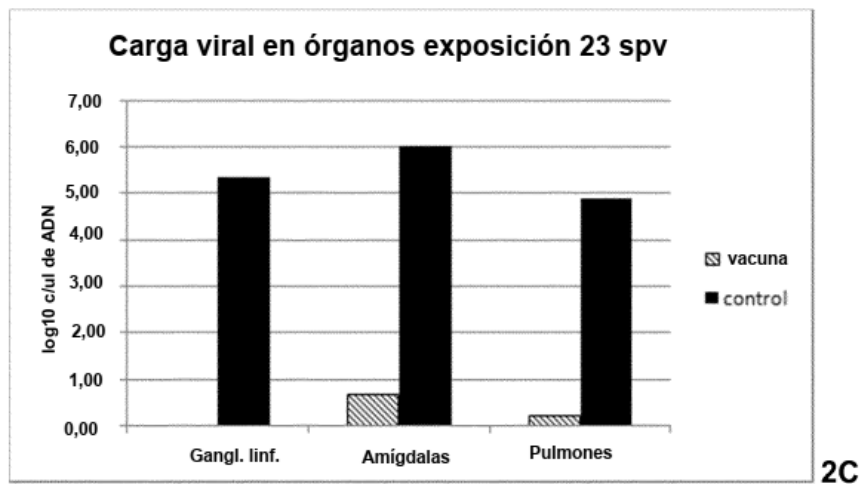


Figura 3

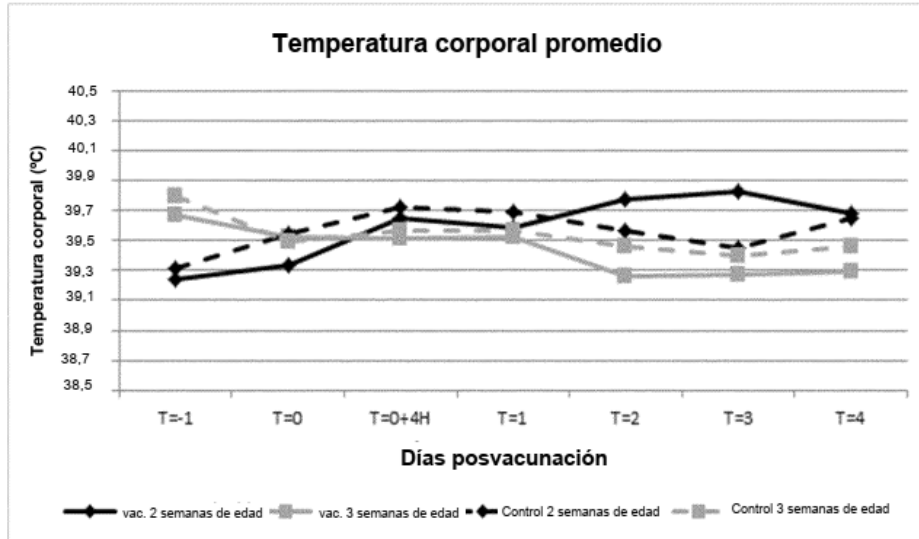


Figura 4

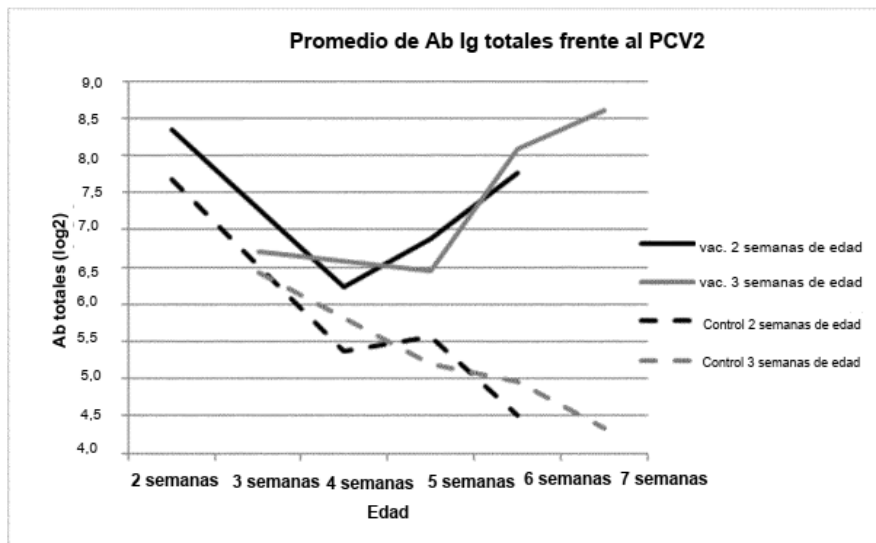


Figura 5

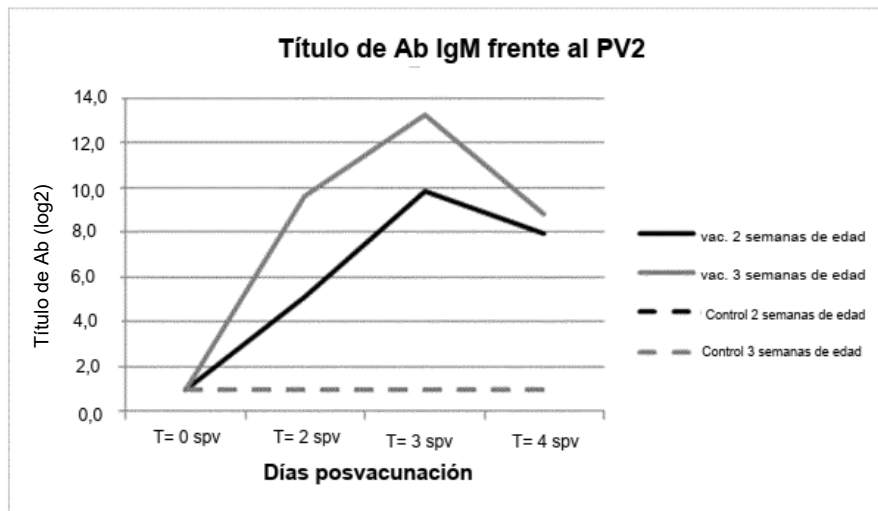


Figura 6

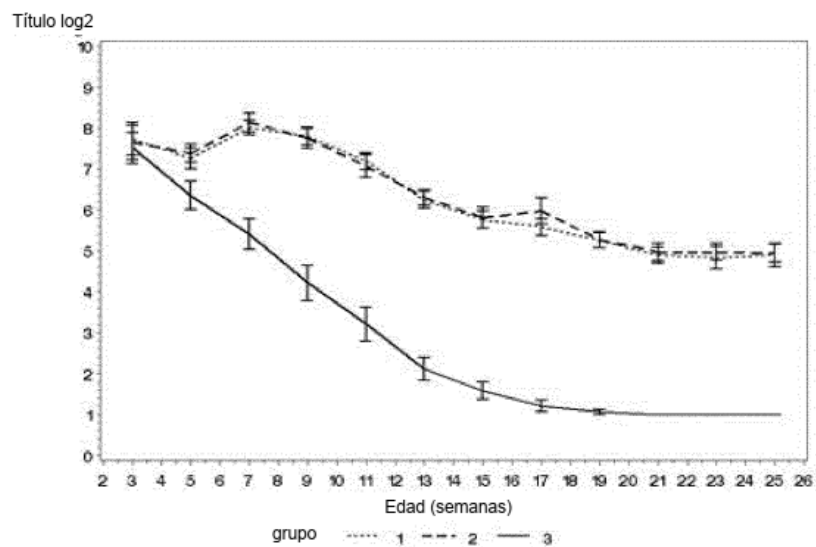


Figura 7

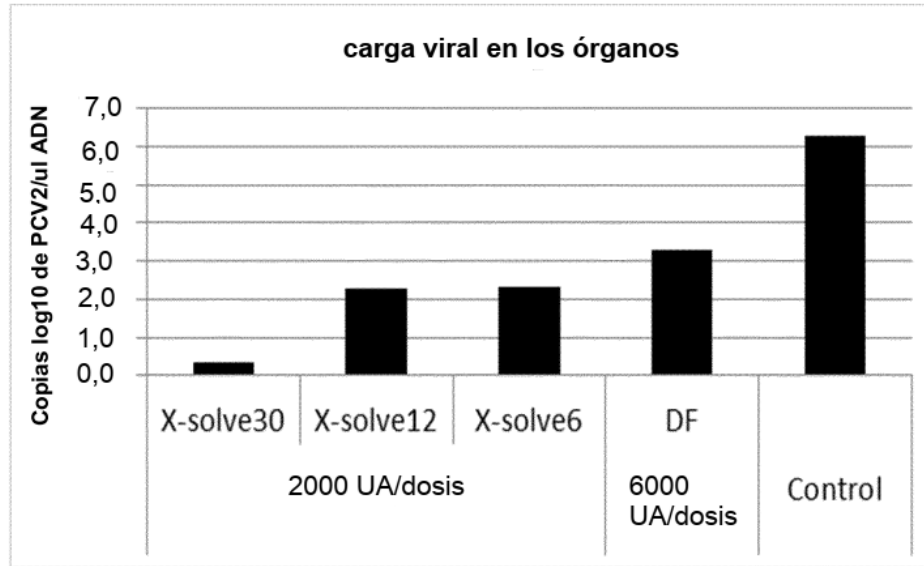


Figura 8

