

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 937 136**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2019 PCT/EP2019/082196**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2020 WO20104640**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2019 E 19809048 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022 EP 3883603**

(54) Título: **Vacuna de antígeno de proteasa IgM para proteger contra Streptococcus suis**

(30) Prioridad:

23.11.2018 EP 18208081

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

24.03.2023

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**VAN KASTEREN - WESTERNENG, THEODORA,
JOHANNA y
JACOBS, ANTONIUS, ARNOLDUS, CHRISTIAAN**

(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 2 937 136 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 de antígeno de proteasa IgM para proteger contra *Streptococcus suis*

5 Campo general de la invención

La invención se refiere a la protección de lechones jóvenes contra una infección patógena con *Streptococcus suis*.

10 Antecedentes de la invención

15 *Streptococcus suis* es un patógeno comensal y oportunista de los cerdos. En particular bajo estrés, la bacteria puede provocar una infección patógena e inducir la enfermedad. En las condiciones modernas de producción porcina, el mayor estrés se induce, por ejemplo, por el destete de lechones y el transporte de lechones jóvenes. Esto ha hecho que *Streptococcus suis* se vuelva un importante patógeno porcino. También es un agente zoonótico emergente de la meningitis humana y el síndrome similar al choque tóxico estreptocócico. *Streptococcus suis* es un patógeno bien encapsulado y se han descrito múltiples serotipos basados en la diversidad antigenica del polisacárido capsular. *Streptococcus suis* utiliza un arsenal de factores de virulencia para evadir el sistema inmunitario del huésped. En conjunto, estas características han desafiado el desarrollo de vacunas efectivas para combatir este importante patógeno. Recientemente, se ha publicado un artículo general sobre las vacunas contra *Streptococcus suis* (Mariela Segura: "Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress", en *Expert Review of Vaccines*, Volumen 14, 2015, Artículo 12, páginas 1587-1608). En esta revisión, se ha compilado y comparado información de campo clínico y datos experimentales para dar una visión general del estado actual del desarrollo de vacunas contra *Streptococcus suis* como se describe aquí a continuación.

25 Las vacunas usadas actualmente son principalmente bacterinas de células enteras. Sin embargo, los informes de campo describen la dificultad en el control y la gestión de la enfermedad y, especialmente, los "fallos de vacunas" son comunes. Los cerdos portadores son la principal fuente de infección y tanto la transmisión vertical como la horizontal están implicadas en la propagación de la enfermedad dentro de un rebaño. La mezcla de animales portadores con animales susceptibles en condiciones estresantes, como el destete y el transporte, generalmente da como resultado una enfermedad clínica. El destete temprano medicado y las prácticas segregadas de destete temprano no eliminan la infección por *Streptococcus suis*. Por lo tanto, las medidas de control eficaces para prevenir enfermedades dependerán de los procedimientos profilácticos/metafilácticos (cuando estén permitidos) y de la vacunación. Actualmente, los esfuerzos de inmunización de campo se han centrado en el uso de bacterinas comerciales o autógenas. Estas estrategias de vacunación se han aplicado a lechones o cerdas. A partir del destete los lechones son más susceptibles a infecciones por *Streptococcus suis* debidas al estrés asociado al destete y también, el transporte posterior común. Por lo tanto, la inmunización preparto en cerdas se usa a menudo para tratar de transmitir inmunidad pasiva a los lechones y brindar protección contra *Streptococcus suis* bajo estas circunstancias estresantes temprano en la vida. Por otra parte, la vacunación de cerdas es menos costosa y laboriosa, representando de esta manera una alternativa económica a la vacunación de lechones. No obstante, los resultados disponibles parecen indicar que la vacunación de las cerdas con bacterinas también es motivo de controversia. En muchos casos cerdas vacunadas, incluso cuando se vacunaron dos veces antes del parto, responden mal o nada a la vacunación, lo que resulta en una baja inmunidad materna transferida a las camadas. E incluso si la inmunidad materna se transfiere a un nivel suficiente, en muchos casos, los anticuerpos maternos son demasiado bajos para brindar protección en el período más crítico de 4 a 7 semanas de edad.

45 En lechones, las bacterinas autógenas se usan con frecuencia en el campo, especialmente en Europa. Se preparan a partir de la cepa virulenta aislada en la finca con problemas clínicos y se aplican en la misma finca. Una de las desventajas de las bacterinas autógenas es que faltan datos de seguridad de la vacuna y pueden producirse reacciones adversas graves. Los errores de muestreo (debido al uso de solo uno o dos cerdos o muestras) pueden dar como resultado la imposibilidad de identificar una cepa o serotipo asociado a un brote reciente. Este fallo puede ser especialmente problemático en rebaños endémicos. Finalmente, el dilema más importante de las bacterinas autógenas es que su efectividad real ha sido poco estudiada. Como la aplicación de vacunas autógenas es empírica, no sorprende que los resultados obtenidos con estas vacunas sean inconsistentes.

55 En la técnica también se describen otras vacunas experimentales. Kai-Jen Hsueh et al. show ("Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets", en: *BMC Veterinary Research, BMC series - open, inclusive and trusted*, 13:15, 7 de enero de 2017) que una subunidad plus de bacterina podría ser la base para la vacunación exitosa de cerdas para conferir inmunidad protectora a sus lechones.

60 También se han contemplado en la técnica vacunas vivas atenuadas. Se ha demostrado que los mutantes isogénicos no encapsulados de *Streptococcus suis* serotipo 2 son claramente avirulentos. No obstante, una formulación de vacuna viva basada en un mutante del serotipo 2 no encapsulado indujo solo una protección parcial contra la mortalidad y no logró prevenir el desarrollo de signos clínicos en cerdos expuestos con la cepa de tipo silvestre (Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, et al. "Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2." en: *Vet Microbiol.* 2002, 84:155-168.)

En los últimos años, se ha informado una extensa lista de moléculas de *Streptococcus suis* antigenicas o inmunogénicas y la mayoría de estas se ha descubierto a través de inmunoproteómica usando sueros convalecientes de cerdos infectados o humanos y/o sueros inmunitarios producidos en laboratorio. El documento WO2015/181356 (IDT Biologika GmbH) ha demostrado que una proteasa IgM de longitud completa puede provocar una muy buena respuesta inmunitaria protectora en lechones en un esquema de vacunación de administración de dos dosis del antígeno de la proteasa IgM solo o en combinación con una vacuna primaria que contiene un bacterina. Despues de esto, una subunidad que comprende el dominio Mac-1 altamente conservado (que representa solo aproximadamente el 35 % de la proteína de longitud completa) es capaz de inducir una respuesta inmunitaria que es tan eficaz (o incluso mejor) que la proteína de longitud completa en un ensayo bactericida, lo que sugiere que esta subunidad también inducirá una respuesta inmune protectora *in vivo*. Se observa que el documento WO2017/005913 (Intervacc AB) también describe el uso de un antígeno de proteasa IgM (en particular, un polipéptido de proteasa IgM fusionado con una nucleotidasa) pero solo se ha demostrado la propiedad de poder provocar una serorrespuesta. En esta solicitud de patente internacional no se muestra un efecto protector para un antígeno de proteasa IgM.

15 **Objetivo de la invención**

Es un objetivo de la invención proporcionar una vacuna mejorada que sea capaz de inducir en un cerdo una respuesta inmunitaria que conduzca a una mejor protección contra *Streptococcus suis* en comparación con las vacunas de la técnica anterior, en particular las vacunas como se conocen a partir del documento WO2015/181356, es decir, la vacuna que comprende una proteasa IgM de longitud completa o una subunidad de la misma que comprende el dominio MAC.

25 **Sumario de la invención**

Para cumplir con el objetivo de la invención, se ha diseñado una vacuna que comprende un antígeno de proteasa IgM de *Streptococcus suis*, para su uso en un método para proteger a un cerdo contra *Streptococcus suis*, en donde el antígeno de proteasa IgM es una proteína de acuerdo con SEQ ID NO:1.

Sorprendentemente, se ha descubierto que con este antígeno, puede obtenerse una protección incluso mejor que con los antígenos conocidos a partir del documento WO2015/181356. La nueva proteína difiere de los antígenos conocidos de la solicitud de patente '356 como sigue: con respecto a las proteínas de longitud completa como se describe en la patente '356, la primera parte de la secuencia de las proteínas conocidas no está presente, representando una secuencia que comprende un péptido señal (AA 1-34 de SEQ ID NO: 1 de la patente '356), o una secuencia que comprende una etiqueta His (AA 1-22 de SEQ ID NO: 2 de la patente '356). Con respecto al dominio MAC, la nueva proteína es mucho más completa y representa aproximadamente el 97 % de la proteína de longitud completa en lugar de aproximadamente el 35 %. La razón de la protección mejorada no está clara. Puede ser que la presencia de un péptido al comienzo de la secuencia interfiera con la inducción de una respuesta inmunitaria, en particular ya que en una bacteria, es muy probable que esta parte de la proteína esté expuesta al entorno hidrófilo de toda la bacteria, ya que en el otro extremo hay una cola hidrófoba. La protección mejorada con respecto al dominio MAC podría estar relacionada con una mejor propiedad inmunogénica de la proteína actual dada su longitud.

La invención también se refiere al uso de un antígeno de proteasa IgM de *Streptococcus suis* para la fabricación de una vacuna para proteger a los cerdos contra *Streptococcus suis* y a un método para proporcionar protección. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Cabe señalar que, en una vacuna, el antígeno generalmente se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, un medio biocompatible, a saber, un medio que después de la administración no induce reacciones adversas significativas en el animal sujeto, capaz de presentar el antígeno al sistema inmunitario del animal hospedador después de la administración de la vacuna. Un vehículo farmacéuticamente aceptable tal puede ser, por ejemplo, un líquido que contenga agua y/o cualquier otro solvente biocompatible o un vehículo sólido como el que se usa comúnmente para obtener vacunas liofilizadas (basadas en azúcares y/o proteínas), que comprende opcionalmente agentes inmunoestimulantes (adyuvantes). Opcionalmente otras sustancias tales como estabilizantes, modificadores de viscosidad u otros componentes se añaden dependiendo del uso previsto o las propiedades requeridas de la vacuna.

60 **Definiciones**

Una *vacuna* es una composición farmacéutica que es segura para administrar a un sujeto animal y es capaz de inducir inmunidad protectora en ese animal contra un microorganismo patógeno, es decir, de inducir una protección exitosa contra el microorganismo.

Un *antígeno de proteasa IgM de Streptococcus suis* es una enzima que degrada específicamente la IgM porcina (y no la IgG porcina o la IgA porcina); Seele et al, in *Journal of Bacteriology*, 2013, 195 930-940; y en *Vaccine* 33:2207-2212;

5 de mayo de 2015), una proteína denominada IdeSsuis, o una parte inmunogénica de la misma (que normalmente tiene una longitud de al menos aproximadamente el 30-35 % de la enzima de longitud completa).

5 La protección contra un microorganismo ayuda en la prevención, la mejora o la cura de una infección patógena con ese microorganismo o un trastorno derivado de esa infección, por ejemplo, para prevenir o reducir uno o más signos clínicos resultantes de la infección con el patógeno.

Realizaciones de la invención

10 En una realización, la vacuna es para proteger al cerdo contra la viremia por *Streptococcus suis*. Se descubrió que la presente vacuna puede proporcionar una protección significativamente mejorada contra la viremia, es decir, infección de la sangre con *Streptococcus suis*.

15 A continuación, aunque en la patente '356 se usa una dosis de al menos 250 µg de antígeno, se ha descubierto que una dosis por debajo de 120 µg puede ser suficiente para llegar a la protección contra *Streptococcus suis*. La cantidad mínima es la cantidad en la que todavía se puede obtener inmunidad protectora. Esto puede establecerse mediante experimentación de rutina y depende, entre otros, del nivel de protección requerido. Para la vacuna actual, se cree que una cantidad mínima es de 1 µg del antígeno por dosis, pero puede ser cualquier dosis mayor como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 20 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o cualquier número entero superior en el intervalo de 61-119 hasta 120 µg por dosis.

25 En una realización de la presente invención el método consiste en administrar entre 10 y 100 µg de la proteína por dosis, por ejemplo, aproximadamente 50 µg por dosis. En otra realización 3 de la vacuna para uso de acuerdo con la invención, la vacuna se administra dos veces.

La invención se explicará ahora adicionalmente basándose en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo

30 *Objetivo*

El objetivo de este experimento fue probar la efectividad de diferentes construcciones de proteasa IgM en cerdos frente a la exposición con *Streptococcus suis* serotipo 2. Una construcción consistía en una proteína con etiqueta his (correspondiente a SEQ ID NO: 2 en la patente '356), indicada como "356 de longitud completa". Otra construcción consistía en proteína indicada como SEQ ID NO: 1 en la patente '356, pero diferenciándose en que esta proteína no tiene los primeros 34 aminoácidos (o etiqueta his), denotado como "fragmento". Esta es la proteína de acuerdo con SEQ ID NO: 1 de la memoria descriptiva actual. Una tercera construcción consistió en el dominio MAC1 inalterado conservado con su etiqueta, correspondiente a la subunidad indicada como SEQ ID NO: 5 en la patente '356, denotado "MAC1". Para evaluar si la variación de la secuencia tendría algún efecto, la última construcción consistió en el dominio conservado con MAC1 con un 15 % de aminoácidos alterados artificialmente, teniendo una etiqueta his, denotado como "MAC1 85 %".

Diseño del estudio

45

Se usaron cincuenta lechones SPF seronegativos de 5 semanas de edad. Los lechones se distribuyeron en cinco grupos (distribuidos uniformemente entre las diferentes camadas) de 10 lechones cada uno. Los grupos 1 a 4 se vacunaron dos veces por vía intramuscular a las 5 y 7 semanas de edad con cada una de las diferentes vacunas: 356 de longitud completa (grupo 1), fragmento (Grupo 2), MAC1 (grupo 3) y MAC1 85 % (grupo 4). Cada cerdo recibió una dosis de 50 µg por 2 ml de volumen inyectado. El grupo 5 se dejó como control de exposición sin vacunar. A las 9 semanas de edad, los cerdos fueron expuestos intratraquealmente con un cultivo virulento de *S. suis* serotipo 2. Después de la exposición, los cerdos se observaron diariamente para detectar signos clínicos de infección por *S. suis* tales como depresión, problemas de locomoción y/o signos neurológicos durante 11 días usando un sistema de puntuación regular que va de 0 (sin signos) a 3 para casos graves. Los animales que alcanzaron el criterio de valoración humanitario después de haber mostrado signos clínicos específicos (es decir, signos locomotores o neurológicos) se sacrificaron sin necesidad de necropsia. Los animales que alcanzaron el criterio de valoración humanitario sin haber mostrado signos clínicos específicos fueron sacrificados y se les realizó la necropsia incluyendo un examen bacteriológico para confirmar la infección por *S. suis*. Justo antes de la vacunación y la exposición, se recogió sangre sérica para la determinación de anticuerpos. A intervalos regulares, antes y después de la exposición, se recogió sangre con heparina de animales vivos para volver a aislar la cepa de exposición. Si se encuentra un animal muerto antes de que se pueda recolectar sangre, la sangre no se examinó para la presencia de *S. suis*.

Resultados

65

Solo se usaron cerdos sanos en el estudio. Ninguna de las vacunas indujo ningún sitio inaceptable o reacciones sistémicas y, por lo tanto, podría considerarse segura. Los datos posteriores al desafío para el período anterior al día

programado de la necropsia (en el día 11) se indican en la Tabla 1.

Los datos se refieren al título medio de anticuerpos medido a las 7 y 9 semanas ("AT7" y "AT9") de edad (4,3 es el nivel de detección, un nivel inferior se fijó en 3,3), el número de animales en los que se encontró que la sangre era infectada con *Streptococcus suis* ("n.º PB"), la puntuación clínica media durante el período de prueba ("CS"), el tiempo medio de supervivencia de todos los animales de un grupo ("ST"), el tiempo medio hasta la muerte de los animales muertos (cuando se confirma *S. suis* positivo) o sacrificados ("TD") y, por último, el número de animales sacrificados que presentan signos clínicos específicos ("n.º E"). En el grupo 2 (el grupo "fragmento"), un animal fue encontrado muerto un día después de la exposición antes de que se pudiera extraer sangre. Se encontró que este animal era

5 positivo para *Streptococcus suis* después de la necropsia y el examen bacteriológico.
10

Los resultados indican que la nueva proteína, que carece de la primera parte de las secuencias como se conoce a partir del documento WO2015/181356, proporciona protección en cerdos al menos igual de bien, o incluso mejor, que los antígenos de proteasa IgM conocidos. El título de anticuerpos mejora de forma consistente con respecto a los

15 antígenos de proteasa IgM conocidos, y lo mismo ocurre con todos los demás parámetros indicados en la tabla 1. El efecto es particularmente significativo para la comparación con las proteínas del dominio MAC, aunque basado en los ensayos bactericidas como se describe en el documento WO2015/181356, no se esperaba encontrar una diferencia tan grande en el efecto protector *in vivo*. La diferencia con la proteína de longitud completa conocida observada para este pequeño grupo de 10 animales, en circunstancias prácticas, es decir, la vacunación de grandes grupos de cerdos en instalaciones para animales grandes, puede dar como resultado una mejora muy significativa del nivel de 20 protección. En particular, el hecho de que no se pudiera detectar viremia (infección de la sangre) en ninguno de los animales vacunados con la proteína de la invención es una clara señal de que esta proteína proporciona una protección mejorada sobre las proteínas de la técnica anterior.

25

Tabla 1: Datos después de la exposición

Grupo	AT7	AT9	N.º PB	CS	ST	TD	N.º E
356 longitud completa	5,9	10,2	3/10	23	8,4	2,3	3/10
fragmento	6,9	10,6	0/9*	21	8,7	3,3	2/10
MAC1	3,9	5,5	6/10	57	4,3	1,7	7/10
MAC1 85 %	3,5	5,3	5/10	44	6,0	1,4	6/10
Control	3,3	3,3	7/10	55	4,6	1,9	7/10

*Un animal fue encontrado muerto antes de que se pudiera recolectar sangre

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende un antígeno de proteasa IgM de *Streptococcus suis*, para su uso en un método para proteger a un cerdo contra *Streptococcus suis*, **caracterizada por que** el antígeno de proteasa IgM es una proteína de acuerdo con SEQ ID NO:1.
- 10 2. Una vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el método es para proteger al cerdo contra viremia por *Streptococcus suis*.
- 15 3. Una vacuna para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** el método comprende administrar la vacuna a razón de menos de 120 µg de la proteína por dosis.
- 20 4. Una vacuna para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** el método comprende administrar la vacuna a una dosis de entre 10 y 100 µg de la proteína.
- 25 5. Una vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** en el método, la vacuna se administra dos veces.
6. Una vacuna que comprende una proteína de acuerdo con SEQ ID NO:1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** la vacuna contiene entre 1 y 100 µg de la proteína por dosis.
8. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** la vacuna contiene entre 1 y 50 µg de la proteína por dosis.