



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 672**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02720307 .4**
(86) Fecha de presentación : **03.05.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1387693**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2004**

(54) Título: **Vacuna contra mycoplasma inactivado por saponina.**

(30) Prioridad: **03.05.2001 GB 0110851**

(73) Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(72) Inventor/es: **Nicholas, Robin Ashley John**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 inactivado por saponina.

Observaciones

El archivo contiene información técnica sometida a consideración después de que la solicitud se archiva y no se incluye en esta especificación.

Descripción

La presente invención se relaciona con una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis*, la cual es una agente causal de neumonías bovinas, que es útil como vacuna en ganado bovino, con los métodos de producción de esta y sus usos.

La presente invención particularmente se relaciona con una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis*.

Los Mycoplasmas son microorganismos desprovistos de membranas celulares y son, por consiguiente, a) pleomórfico y b) resistentes a los antibióticos del grupo beta-lactámico, tal como penicilina. Los Mycoplasmas varían considerablemente en la composición de su membrana celular y en particular en la cantidad de colesterol incorporado en esta. La membrana de *M. mycoides* SC se rodea por una capa de carbohidratos (galactana). Además, los Mycoplasmas tienen intrínsecamente altos índices de mutación y de esta manera pueden rápidamente desarrollar sistemas capaces de combinar la inactivación por ejemplo, producida por enzimas etc) como se ha visto en su respuesta a los antibióticos donde la resistencia se ha desarrollado rápidamente.

Mycoplasma bovis es una causa primaria de neumonía en terneros, artritis, mastitis, enfermedad de ojo y otras condiciones a nivel mundial y ha estimado costos en la industria del ganado bovino de millones de libras en pérdidas por mortalidad y caídas de precios anualmente. La neumonía de ternero es un síndrome complejo que involucra bacterias, virus y mycoplasmas. En Europa se considera que entre el 25-33% de neumonías en terneros involucran el *Mycoplasma bovis*.

Cepas novedosas de *Mycoplasma bovis* están mostrando un incremento en la resistencia a un rango de antibióticos (Ayling R *et al* (2000) Veterinary record 146, 745-747) y existe, por consiguiente, una necesidad de una vacuna efectiva.

Las vacunas derivadas de las cepas inactivadas de virus o bacteria son conocidas en el oficio. El microorganismo patógeno se trata con un químico, tal como formaldehído, que daña el organismo hasta tal punto que no puede causar enfermedad infecciosa en el animal al cual se le administra. Por ejemplo, la habilidad del organismo para replicarse se puede dañar irreparablemente. Sin embargo, las regiones antigénicas dominantes de los organismos se retienen, lo que estimula una respuesta inmune en el animal. Esta respuesta puede proporcionar un efecto protector si el animal luego se expone con una potente cepa del organismo.

Diferentes agentes de inactivación tienen modos de acción diferentes con el fin de lograr el efecto deseado. Algunos agentes ligados al ADN, otros destruyen o inactivan las proteínas esenciales y otra clase de agentes de inactivación puede desestabilizar la membrana celular. La eficiencia de los agentes en cualquier caso particular dependerá de la naturaleza del microorganismo. Así, los resultados alcanzados serán variables, como resultado de la variabilidad inherente de

los microorganismos.

Rurangirwa *et al.* Veterinary Record (1987) 121,397-402 y Tola *et al.*, Vaccine 17 (1999) 2764-2768 describe las vacunas experimentales basadas en las cepas inactivadas de F38 mycoplasma y *Mycoplasma agalactiae* respectivamente. WO01/34189, el cual no fue publicado en la prioridad de la fecha de la presente aplicación, y así cae bajo el Oficio 54(3) EPC, describe las vacunas para *Mycoplasma bovis*.

No es obvio que el uso de un agente de inactivación particular producirá el resultado deseado en cualquier instancia particular. Esto es especialmente el caso en diferentes especies donde la respuesta a un agente de inactivación particular puede ser un poco diferente. Esto es particularmente verdadero en el caso de organismos complejos tal como *Mycoplasma bovis*.

Una vacuna quadrivalente experimental que incorpora formalina mató los antígenos de *Mycoplasma bovis* y *M. dispar* juntos con los componentes víricos y bacterianos se probaron (Howard *et al* (1987) Veterinary Record 121, 372-376. La vacuna incluyó Quil A como coadyuvante, y aunque efectiva, no tuvo el éxito suficiente para ser producida comercialmente. La formalina inactivo las vacunas que incorporan *M. bovis* y *Mannheimia haemolytica* (Urbaneck *et al* (2000) Der Praktische Tierarzt 81, 756-763) y una que incorpora dos cepas de *M. bovis* (Rosenbusch R (1998) Actas del 12th Congress of the International Organisation of Mycoplasmaology, Sydney p185) también han sido reportadas con logros diversos. Una vacuna *M. bovis* inactivadas por formalina contra la artritis del ternero que incorpora saponina como un coadyuvante fue inmonogénica y redujo la diseminación de la infección a otros empalmes en un pequeño número de terneros (Poumarat F *et al* (1999) Actas del International Symposium of Ruminant Mycoplasmas, Toulouse, June 1999 p65).

GB 1 074 920 se refiere a una vacuna para un organismo similar a pleuroneumonía (PPL0), que es apropiada para uso humano, y un crecimiento medio para *Mycoplasma pneumoniae*. En este caso el *Mycoplasma pneumoniae* se incubo en un medio estéril que incluye el extracto de cloroformo evaporado de yema de huevo de gallina hasta que la actividad que induce el anticuerpo se imparte además, inactivado por el uso de la formalina y concentrado. Sin embargo, tales vacunas inactivadas por formalina no son ven generalmente como eficaces. Además, la vacuna descrita es para un Mycoplasma humano específico y no sería suficientemente protectora contra las neumonías bovinas en animales.

Un número de intentos se han hecho para formular una vacuna para Mycoplasmas, que son los agentes causativos para neumonía bovina. Ninguno, sin embargo ha sido particularmente exitoso.

Los aspirantes sorprendentemente han encontrado, sin embargo, que mediante la inactivación con saponina de una cepa de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas, se pueden producir vacunas particularmente efectivas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una cepa de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas, que ha sido inactivado mediante el tratamiento con saponina.

Cuando la saponina se aplica, la membrana celular preferiblemente solo se desestabiliza parcialmente y no se desestabiliza totalmente. De esta manera,

las células se previenen del crecimiento a pesar de retener las regiones antigénicas dominantes de los organismos, que estimulan una respuesta inmune en el animal.

Diferente a la producción de algunas otras vacunas, que pueden incluir la etapa de liofilización, no es necesario liofilizar el *Mycoplasma* para producir la vacuna de acuerdo con la presente invención.

Según se utiliza en esta, el término "saponina" se refiere a los glucósidos de la sapogenina, que se pueden derivar de las plantas tales como corteza de Quillaga. Un rango de saponinas que contiene varias cantidades de sapogeninas está disponible de Sigma.

Estos compuestos son conocidos por tener actividad hemolisofílica y pueden ser utilizados como coadyuvantes para vacunas.

La cepa de *Mycoplasma*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas es una cepa de *Mycoplasma bovis*. En este aspecto, una cepa inactivada de *M. bovis* se utiliza en las vacunas para proteger contra las neumonías causadas por *M. bovis*. La cepas de *Mycoplasma bovis* están disponibles de una variedad de fuentes. Sin embargo, las cepas apropiadas se pueden aislar de ganado bovino, particularmente de los pulmones de ganado bovino que han sufrido de neumonía. La cepa 96B/96 de *Mycoplasma bovis* usada en la presente aplicación se aisló de los pulmones de un ternero que ha muerto de neumonía.

Las cepas de la invención se pueden usar en vacunas.

Una ventaja de la presente invención es que es sorprendentemente, una vacuna altamente eficaz. Además, como las vacunas de la presente invención se inactivan, son intrínsecamente más seguras y más estables que los productos de vacunas vivos.

Así, un aspecto adicional de la invención comprende una composición veterinaria que contiene una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas como se describe anteriormente, en combinación con un excipiente aceptable desde un punto de vista veterinario.

El excipiente puede ser sólido o líquido, dependiendo del modo previsto de la administración de la vacuna. Generalmente, sin embargo, la vacuna será pensada para la administración parenteral. Los excipientes líquidos, tal como excipientes acuosos o aceites estériles para la dosificación intravenosa, subcutánea, o intramuscular pueden, por consiguiente, ser preferidos.

Así, las composiciones veterinarias de la presente invención están convenientemente en la forma de una suspensión acuosa o aceitosa inyectable estéril, que se puede formular de acuerdo con procedimientos conocidos utilizando uno o más de los agentes apropiados de dispersión o humectación y los agentes de suspensión. Una preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente aceptable vía parenteral no-tóxica, por ejemplo una suspensión en 1,3-butanodiol.

Ejemplos de agentes de suspensión que pueden ser utilizados en la formulación de la invención incluyen sodio carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más preservativos (tal como etil o propil p-hidroxibenzoato o anti-oxidantes (tal como ácido ascórbico).

Preferiblemente, la composición veterinaria com-

prende solo una cepa de *Mycoplasma* de acuerdo con la presente invención y saponina en una solución salina reguladora.

Las suspensiones aceitosas pueden ser formuladas por la suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal (tal como aceite de maní, aceite de oliva, aceite de ajonjolí o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida).

Los polvos y los gránulos dispersables apropiados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua generalmente contienen el ingrediente activo junto con un dispersante o un agente de humectación, agente de suspensión y uno o más preservativos.

La cantidad del ingrediente activo que se combina con uno o más excipiente para producir una forma única de dosificación variará necesariamente dependiendo del huésped tratado y la ruta de administración particular. Por ejemplo, una formulación líquida pretendida para la administración subcutánea en ganado bovino y particularmente en terneros, generalmente contendrá, por ejemplo, desde 0.1 mg a 0.5 mg/ml de una cepa de *Mycoplasma bovis* inactivado el cual es un agente causal de neumonías bovinas, combinado con una cantidad de excipientes apropiada y conveniente. Las formas de unidad de dosificación generalmente contendrán aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 2 mg, convenientemente alrededor de 0.2 mg a 1 mg de una cepa de *Mycoplasma* inactivado, el cual es un agente causal de una cepa de neumonías bovinas. En este aspecto, una cepa inactivada de *M. bovis* se utiliza en vacunas para proteger contra la neumonía en terneros encontrados en Europa.

El tamaño de la dosis para propósitos profilácticos naturalmente variará de acuerdo con la naturaleza, la edad del animal y la ruta de administración, de acuerdo con principios conocidos de medicina. Generalmente hablando sin embargo, la composición será administrada a terneros jóvenes.

La composición de la invención puede comprender otros componentes, que serían conocidos en el oficio. Pueden, por ejemplo incluir los coadyuvantes tal como compuestos de aluminio o coadyuvante de Freund incompleto. La saponina, cuando está presente en la composición como resultado de su uso como un agente de inactivación, sin embargo, también tendrá un efecto coadyuvante, y es inverosímil, por lo tanto, que otros coadyuvantes serían requeridos.

Donde este presente, la saponina estará adecuadamente presente en una composición líquida de la invención en una cantidad por lo menos de 1 mg/ml para producir un efecto coadyuvante. Preferiblemente estará presente en una cantidad alrededor de 1-10 mg/ml, y más convenientemente aproximadamente de 2 mg/ml.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas como se describe arriba, método que abarca la incubación de una cepa de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas en la presencia de saponina.

La cantidad de agente de desestabilización de la membrana celular presente durante la incubación debe ser suficiente para inactivar la cepa y ésta por consiguiente dependerá en gran parte de la concentración de la cepa dentro del cultivo, de la naturaleza exacta de la cepa, del agente particular utilizado etc. Sin

embargo, donde la saponina es el agente, debe en general estar presente en el cultivo de incubación en una cantidad alrededor de 0.5-10 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 2 mg/ml.

Una vez tratada de esta manera, la cepa inactivada se puede aislar y formular como se discute arriba. Sin embargo, el producto directo se puede usar como una formulación de vacuna, a condición de que todos los componentes sean desde un punto de vista veterinario aceptables.

Cuando este es el caso, la saponina está presente en la formulación y puede ejercer un efecto coadyuvante.

Por consiguiente, la prevención de la enfermedad en ganado bovino causada por una cepa de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas, se puede alcanzar mediante la administración al ganado bovino de una composición veterinaria como se describe arriba. Apropiadamente, la composición será administrada como una dosis única, pero dosis de refuerzo se pueden administrar si se requiere o es necesario, y estas se pueden determinar por métodos clínicos habituales. Para la administración parenteral, las unidades de dosificación como se describe arriba pueden ser utilizados.

La invención ahora particularmente será descrita a manera de ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de la Vacuna de Mycoplasma bovis

Caldo de cultivo de Eaton se prepara disolviendo la base del caldo Difco PPLO (21 g) (sin cristal de violeta) en 700 ml de agua destilada. Extracto de levadura preparada recientemente (100 ml) se adiciona junto con suero de caballo no caliente (200 ml), glucosa (10g), y penicilina (0.5 ml de 200,000 IU/ml), 0.2% rojo de fenol (12.5 ml) y 0.02% de ADN. El pH se ajustó a 7.6-7.8 y se esterilizó por filtración.

Un contenedor universal con una alícuota congelada de la preparación principal de la semilla (décimo pase de *Mycoplasma bovis* cepa 86B/96 aislado de los pulmones de un ternero que ha muerto de neumonía), mantenido en volúmenes de 10 ml a -70°C, se descongeló completamente en agua caliente.

Esta se adicionó a 90 ml de caldo de cultivo de Eaton, preparado como se describe arriba, y se incubó por 48 horas a 38.5°C. Esto se sub-cultiva en un volumen de 900 ml del medio de Eaton y se incubó a 38.5°C por 48 horas. Las células se centrifugaron

a 10,000 g por 30 minutos y se volvieron a suspender en el mismo volumen de solución salina reguladora de fosfato (PBS pH 7.2). Las células se centrifugaron como antes, se vuelven a suspender en 1/10 del volumen original en PBS y se ajusta al contenido aproximadamente 0.5 mg/ml (aproximadamente 108 colonias formadas en unidades por ml).

Las células del mycoplasma se inactivaron con saponina a 2 mg/ml durante la noche a 37°C. La suspensión se dividió en alícuotas de 20 ml volúmenes y se almacenó a 4°C.

Ejemplo 2

Experimentación Biológica

La vacuna (2 ml), se preparó como se describe en el Ejemplo 1, se inoculó vía subcutánea en cada ternero de cuatro grupos de siete u ocho terneros de aproximadamente 4 semanas de edad.

Los cuatro grupos de ganado bovino se alojaron individualmente.

- Grupo A (vacunado/retado) conteniendo 7 terneros que se inocularon con 2 ml de la vacuna vía subcutánea y se retaron 3 semanas después con la administración en aerosol de *M. bovis* virulento (cepa 5063) en los días consecutivos

- Grupo B (no vacunado/retado) conteniendo 7 terneros que se inyectaron con el placebo y luego se retaron como el Grupo A

- Grupo C (controles no vacunados/no retados) conteniendo 8 terneros que se observaron como controles no-inoculados

- Grupo D (vacunado/no retado) conteniendo 7 terneros que se inmunizaron como para el Grupo A pero no se retaron. Estos se monitorearon para efectos adversos y una respuesta de anticuerpo.

La vacuna demostró ser segura para los terneros y no causó efectos clínicos adversos en los grupos A y D. Se produjo una respuesta serológica fuerte en los grupos A y D dentro de 2-3 semanas de administración. Todos los terneros en el grupo B desarrollaron las señales clínicas de neumonía mientras que el grupo A mostró pocas señales. Hubo una significativa disminución en la ganancia del peso corporal en el grupo B comparado con el grupo A y un significativo incremento en las lesiones de pulmón y temperaturas rectales en los terneros del grupo B.

En conclusión la vacuna *M. bovis* produjo un nivel significativo de protección contra un reto virulento.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Mycoplasma bovis* el cual es un agente causal de neumonías bovinas y que ha sido inactivado por el tratamiento con saponina.

2. Una composición veterinaria que comprende una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis* como se reivindica en la reivindicación 1, en combinación con un excipiente aceptable desde un punto de vista veterinario.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, que es apropiada para la administración parenteral.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3 en donde el excipiente aceptable desde un punto de vista veterinario es un excipiente líquido.

5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que por otro lado contiene uno o más de un agente de dispersión, un agente de humectación o un agente de suspensión.

6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que adicionalmente contiene un coadyuvante.

7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el coadyuvante es saponina.

8. Un método de preparación de una cepa inactivada de *Mycoplasma bovis*, el cual es un agente causal de neumonías bovinas, método que comprende la incubación de una cepa de *Mycoplasma bovis* que es un agente causal de neumonías bovinas en la presencia de saponina.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la saponina está presente en el cultivo de incubación en una cantidad alrededor de 0.5-10 mg/ml.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la saponina está presente en una cantidad de aproximadamente 2 mg/ml.

11. El uso de una cepa de *Mycoplasma bovis* de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de animales.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 en donde el medicamento es para la profilaxis de neumonías bovinas causadas por una cepa de *Mycoplasma bovis*.