

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 780**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2018** **PCT/EP2018/070955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19025519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2018** **E 18755730 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3661548**

54 Título: **Una vacuna que comprende una proteína ORF2 del PCV2 de genotipo 2B**

30 Prioridad:

03.08.2017 EP 17184630

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

31.10.2024

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SNO, MELANIE;

COX, ERIK y

SEGERS, RUUD, PHILIP, ANTOON, MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 780 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

Una vacuna que comprende una proteína ORF2 del PCV2 de genotipo 2B

5 **Campo general de la invención**

La presente invención se refiere en general a vacunas para proteger a los cerdos contra una infección por el circovirus porcino tipo 2.

10 **Antecedentes de la invención**

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un patógeno porcino de importancia económica y, aunque pequeño, tiene la tasa de evolución más alta entre los virus de ADN. Desde el descubrimiento del PCV2 a finales de los años 90, este virus minimalista con un genoma de ADN monocatenario de 1,7 kb y dos genes indispensables (ORF1 y ORF2) se ha convertido en uno de los patógenos porcinos más importantes y actualmente está sujeto al mayor volumen de intervención profiláctica en forma de vacunas en la producción de cerdos a nivel mundial. El gen ORF2 del PCV codifica la proteína de la cápside del virus, que en toda su longitud es una proteína de aproximadamente 233 aminoácidos. El gen ORF2 de todos los aislados de PCV2 comparte 91-100 % de identidad en la secuencia de nucleótidos y 90-100 % de identidad deducida en la secuencia de aminoácidos. Actualmente, el PCV2 se puede dividir en cinco genotipos diferentes, PCV2a a PCV2e (Karupppannan y Opriessnig en *Viruses* 2017, 9, 99). Está bien documentado que el PCV2 continúa evolucionando, lo cual se refleja en cambios en la prevalencia de los genotipos. Durante 2006, se introdujeron vacunas comerciales contra el PCV2 a gran escala en una población de cerdos principalmente infectados con el PCV2b. Desde el año 2012, el genotipo PCV2d esencialmente ha reemplazado al genotipo PCV2b previamente predominante en América del Norte y también se documentan tendencias similares en otras regiones geográficas como China y Corea del Sur. Este es el segundo cambio importante en el genotipo del PCV2 desde el descubrimiento del virus. El posible aumento de la virulencia del genotipo emergente del PCV2 y la eficacia de las vacunas actuales derivadas del genotipo PCV2a contra los virus del genotipo PCV2d han recibido una atención considerable.

Las vacunas para proteger contra la infección por el virus PCV2, sin excepción, se basan en el gen ORF2 del PCV2, que comprende material de ADN o ARN para proporcionar una proteína correspondiente después de la administración al animal en cuestión, que comprende una proteína codificada por el gen ORF2 (por ejemplo, la proteína de longitud completa, una o más versiones truncadas o una mezcla de las mismas), o que comprende el virus completo y, por lo tanto, inherentemente, la proteína de la cápside. En la técnica están disponibles comercialmente varias vacunas contra el PCV2. Porcilis® PCV (disponible en MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos) es una vacuna para la protección de los cerdos contra el circovirus porcino tipo 2, para usar en cerdos a partir de tres semanas de edad. Cuando se administra como vacuna de dos inyecciones (dos dosis), la duración de la inmunidad (DOI) es de 22 semanas, cubriendo casi por completo el periodo de engorde de los cerdos. Ingelvac CircoFlex® (disponible en Boehringer Ingelheim, Ingelheim) es una vacuna para la protección de cerdos contra el circovirus porcino tipo 2, para usar en cerdos a partir de dos semanas de edad. Está registrada como vacuna de una sola inyección (una dosis). Circovac® (disponible en Merial, Lyon, Francia) es una vacuna para la protección de los cerdos contra el circovirus porcino tipo 2, para usar en cerdos de tres semanas o más. Suvaxyn® PCV (disponible en Zoetis, Capelle aid IJssel, Países Bajos) es una vacuna para la protección de los cerdos contra el circovirus porcino tipo 2, para usar en cerdos a partir de tres semanas de edad. Otras vacunas contra al PCV2 se describen, por ejemplo, en los documentos WO2007/028823, WO 2007/094893 y WO2008/076915.

El artículo de revisión reciente mencionado aquí anteriormente (*Viruses* 2017) resume el conocimiento actual sobre la biología del PCV2, los estudios experimentales sobre la variabilidad antigénica, el análisis epidemiológico molecular de la evolución de los genotipos del PCV2 y de las vacunas contra el PCV2. En referencia a esto último, se afirma que la protección homóloga puede ser mejor que la protección heteróloga. En cuanto a la protección cruzada, se concluye (página 5, líneas 29-32) que "los estudios experimentales controlados y los ensayos de campo muestran que las vacunas basadas en el PCV2 [como Porcilis PCV y CircoFLEX] y una vacuna basada en el PCV2b confieren una protección cruzada adecuada contra la enfermedad clínica tras la exposición a los virus de genotipo PCV2a, PCV2b y PCV2d y mejoran el aumento de peso diario promedio". Por eso se entiende comúnmente que la protección cruzada es adecuada para cada genotipo.

Huang Liping et al en *Appl Microbiol Biotechnol* (2016) 100:5923-5943 divulgan una vacuna que comprende proteínas de la cápside del genotipo PCV2a.

El documento US2015/0056248 divulga una proteína ORF2 del subtipo 2b del PCV para protección heteróloga.

Objeto de la invención

Un objeto es proporcionar una vacuna mejorada para la protección contra una infección con el PCV2.

Sumario de la invención

Para cumplir el objeto de la invención, se ha ideado una vacuna que comprende una proteína codificada por ORF2 del circovirus porcino 2 (PCV2) de genotipo 2b y un vehículo farmacéuticamente aceptable, siendo la vacuna para usar en un método para proteger a un cerdo contra una infección con circovirus porcino tipo 2 de genotipo 2d mediante la administración de la vacuna al cerdo, en donde la vacuna comprende menos de 20 µg por dosis de la proteína codificada por ORF2 (por ejemplo, la proteína de longitud completa, una o más versiones truncadas o una mezcla de las mismas), siendo la proteína de un circovirus porcino de genotipo 2b en donde la vacuna proporciona protección contra el PCV2 de genotipo 2d a un nivel correspondiente a la protección conferida si el cerdo hubiera sido vacunado con una proteína codificada por ORF2 del PCV2d. Las cantidades pueden tener cualquier valor de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 µg por dosis.

Sorprendentemente, contra el conocimiento actual como se refleja en Viruses 2017, se descubrió que por debajo de una dosis de 20 µg de proteína codificada por ORF2 (en adelante también llamada "proteína ORF2"), la proteína derivada del genotipo 2b del PCV2 proporciona una protección cruzada notablemente mejor que la proteína ORF2 del genotipo 2a que está presente en la mayoría de las vacunas comerciales, incluidas las vacunas que dominan el mercado (es decir, Porcilis PCV de MSD Animal Health y CircoFLEX de Boehringer Ingelheim). Por encima de 20 µg no se observa diferencia en la protección cruzada. Dado que Porcilis PCV y CircoFLEX contienen niveles muy superiores a 20 µg por dosis, esto explica por qué ambas vacunas tienen éxito en la protección contra la exposición heteróloga. Sin embargo, el uso de la proteína ORF2 del PCV2b brinda la oportunidad de reducir la cantidad de antígeno en la vacuna y aun así lograr una protección cruzada adecuada. Esto no sólo es útil desde el punto de vista económico, sino que puede llegar a ser muy relevante para evitar la interferencia entre antígenos en vacunas combinadas listas para usar, o para estrategias de vacunación que utilizan menos volumen de vacuna, como la vacunación intradérmica.

La cantidad mínima de proteína codificada por ORF2 por dosis es la cantidad con la que todavía se puede obtener inmunidad protectora contra una infección por PCV2. Esto puede establecerse mediante experimentación rutinaria y depende, entre otros, del nivel de protección requerido. Para la vacuna actual, basado en los datos actuales y la técnica anterior con respecto a la cantidad protectora mínima de una proteína ORF2 en una vacuna (véase, entre otros, WO2006/072065) se cree que una cantidad mínima es 0,2 µg del antígeno por dosis, pero puede ser cualquier dosis mayor tal como 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0 µg por dosis.

Cabe señalar que la invención también describe la vacuna como tal y un método para proteger a un cerdo contra una infección por circovirus porcino tipo 2, administrando esta vacuna al cerdo.

Definiciones

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

Un *vehículo farmacéuticamente aceptable* es 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. Dicho vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un líquido que contiene agua y/o cualquier otro disolvente biocompatible o un vehículo sólido tal como los comúnmente utilizados para obtener vacunas liofilizadas (a base de azúcares y/o proteínas), que comprende opcionalmente agentes inmunoestimulantes (adyuvantes). Opcionalmente otras sustancias tales como estabilizantes, modificadores de la viscosidad u otros componentes se añaden dependiendo del uso previsto o las propiedades requeridas de la vacuna.

Protección contra una infección con un microorganismo es ayudar a prevenir, mejorar o curar una infección con ese microorganismo o un trastorno que surja de esa infección, por ejemplo, para prevenir o reducir uno o más signos clínicos asociados con la infección con el patógeno.

Una vacuna que *proporciona protección después de una única administración* significa que la inmunidad protectora se confiere después de una única inyección de la vacuna y, por lo tanto, que no es necesaria una vacunación de refuerzo para alcanzar dicha inmunidad protectora. En un régimen de dos dosis, la primera vacunación (sensibilización) generalmente se refuerza dentro de las 6 semanas posteriores a la primera administración, comúnmente dentro de 3 o incluso 2 semanas desde la primera administración, y se entiende que solo después de la segunda administración (refuerzo) se obtiene una inmunidad protectora, es decir, una protección exitosa como se ha definido aquí anteriormente.

Realizaciones de la invención

En una primera realización, la vacuna contiene menos de 5 µg por dosis. Se ha demostrado que incluso con una dosis de 1/16 de la dosis completa de una vacuna que contiene 80 µg de proteína ORF2 se puede obtener una protección cruzada adecuada con una proteína ORF2 del genotipo PCV2b.

- En una segunda realización, la vacuna se utiliza en cerdos que tienen anticuerpos anti-PCV2. Fue muy sorprendente establecer que se podía obtener inmunidad protectora contra el PCV2 con una dosis de la proteína ORF2 del genotipo 2b inferior a 20 µg. A partir de la técnica anterior, por ejemplo, el documento EP 1926496, se sabe que se necesita una dosis superior a 20 µg para lograr una protección adecuada en lechones seropositivos con una proteína ORF2 de genotipo 2a. En efecto, las vacunas contra el PCV2 comerciales exitosas, como Porcilis PCV y CircoFLEX, se administran en dosis muy por encima de 20 µg. Por lo tanto, la presente invención proporciona la opción de utilizar menos de 20 µg de la proteína ORF2 por dosis, incluso cuando los anticuerpos anti-PCV2 sean de origen materno.
- En otra realización, la vacuna es para usar en cerdos que tienen una edad de 4 semanas o menos. Para lograr una protección adecuada en el período más crítico de 5 a 10 semanas de edad, la vacunación antes de las 4 semanas de edad ha resultado adecuada, aunque podría haber interferencia de los anticuerpos maternos a esta temprana edad.
- En otra realización más, la vacuna proporciona protección después de una única administración de la vacuna. Sorprendentemente se estableció que incluso una dosis única de la vacuna que contenía la proteína ORF2 del genotipo PCV2b era capaz de proporcionar una protección cruzada adecuada a un nivel muy bajo de 5 µg por dosis, mientras que la proteína ORF2 del genotipo PCV2a fue menos capaz de proporcionar protección contra la exposición heteróloga al virus PCV2.
- La invención se explicará ahora adicionalmente usando los siguientes ejemplos no limitativos.
- El Ejemplo 1 describe métodos para determinar la cantidad de proteína ORF2 en una muestra. El Ejemplo 2 describe el establecimiento de protección cruzada de la proteína ORF2 del PCV2a, 2b y 2d.
- La Figura 1 muestra esquemáticamente la puntuación IHC después de la exposición al PCV2b.
La Figura 2 muestra esquemáticamente la puntuación IHC después de la exposición al PCV2d.

Ejemplos

Ejemplo 1: Métodos para determinar la cantidad de proteína ORF2 en una muestra

La cantidad de proteína codificada por ORF2 se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. El documento EP 1926496, en el ejemplo 4, describe un método común basado en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y coloración con Coomassie Azul brillante. Este tipo de método para determinar el contenido de proteínas de una muestra se conoce comúnmente y se describe, por ejemplo, en The Protein Protocols Handbook, 2.^a edición, septiembre de 2002, editado por J.M. Walker, Humana Press Inc., Totowa, NJ Capítulo 29, págs. 237-242. La proteína de longitud completa tiene una longitud de aproximadamente 26-27 kDa. Las versiones truncadas comunes tienen una longitud típicamente de 2 a 4 kDa menos. Si se considera necesario (por ejemplo, cuando en la muestra también están presentes otras proteínas de longitud comparable), las bandas correctas con las proteínas ORF2 se pueden identificar utilizando anticuerpos anti-ORF2 que se pueden visualizar utilizando anticuerpos marcados.

En un método alternativo, la cantidad de proteína codificada por ORF2 (también capaz de detectar proteínas de longitud completa así como versiones truncadas de las mismas), se establece mediante espectrometría de masas con monitorización de reacciones múltiples (MRM) utilizando la proteína ORF2 purificada como patrón. Para esto, primero se digiere la proteína, por ejemplo, usando tripsina. A continuación se separan los péptidos, por ejemplo, usando cromatografía líquida, y luego los péptidos se someten a espectrometría de masas usando un péptido señal (en este caso "VEFWPCSPITQGDR") para normalizar las variaciones en la señal. El péptido señal observado es exclusivo de la ORF2 del PCV2 digerido con tripsina. Una descripción detallada del método se da en una declaración de Merill Schaeffer, Ph. D, enviado a la Oficina Europea de Patentes como documento "D60" el 23 de agosto de 2016 por Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, representado por Hoffmann Eitle, en su oposición al documento EP 1926496.

La aplicación de estos métodos a Porcilis PCV y CircoFLEX revela que en cada caso la cantidad de proteína codificada por ORF2 está muy por encima de 20 µg por dosis.

Ejemplo 2: establecimiento de protección cruzada de la proteína ORF2 del PCV2a, 2b y 2d

Como se conoce en la técnica, a un nivel del 100 % de las vacunas existentes, la proteína ORF2 del PCV2a y otros genotipos proporciona una protección cruzada adecuada, todo a niveles comparables. En el siguiente experimento, se utilizaron vacunas correspondientes a Porcilis PCV, diluidas ya sea 4 veces (versión 25 %) o 16 veces (versión 6,25 %) en comparación con la vacuna en su dosis completa ("100 %"). La vacuna se fabricó de acuerdo con las enseñanzas del documento EP1926496, teniendo una dosis completa de aproximadamente 80 µg de proteína codificada por ORF2.

El estudio se realizó para evaluar la eficacia de las vacunas veterinarias con diferentes cepas del PCV2 (PCV2a, PCV2b y PCV2d) contra la exposición al PCV2b y PCV2d para investigar si en alguna dosis baja existe preferencia

por una proteína ORF2 de un genotipo concreto, en particular cuando se evalúan las propiedades de protección cruzada.

Para este estudio se realizaron 2 experimentos separados, cada experimento involucró a 70 animales. Los 140 animales procedían de 14 cerdas y se asignaron a 14 grupos de tratamiento de 10 animales cada uno. Los lechones tenían niveles detectables de anticuerpos anti-ORF2 que iban de bajos a muy altos, siendo sustancialmente el mismo valor medio para todos los animales en ambos experimentos (aproximadamente 5,8 en el momento de la vacunación). Los lechones fueron vacunados por vía intramuscular con 2 ml cuando tenían aproximadamente tres semanas de edad. En cada experimento de 70 animales, los grupos 1 a 6 fueron vacunados con una vacuna contra el PCV2 con diferentes concentraciones de PCV2 codificado por ORF2 y cepas de diferentes genotipos de PCV2, como sigue:

Experimento 1

Los lechones del grupo 1 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2a (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 2 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2a (aproximadamente 5 µg); Los lechones del grupo 3 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2b (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 4 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2b (aproximadamente 5 µg); Los lechones del grupo 5 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2d (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 6 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2d (aproximadamente 5 µg). Los lechones del grupo de control 7 no fueron vacunados.

Experimento 2

Los lechones del grupo 1 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2a (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 2 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2a (aproximadamente 5 µg); Los lechones del grupo 3 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2b (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 4 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2b (aproximadamente 5 µg); Los lechones del grupo 5 fueron vacunados con una dosis del 25 % de la cepa PCV2d (aproximadamente 20 µg); Los lechones del grupo 6 fueron vacunados con una dosis del 6,25 % de la cepa PCV2d (aproximadamente 5 µg). Los lechones del grupo de control 7 no fueron vacunados.

Dos semanas después de la vacunación, todos los animales fueron transportados a las instalaciones de exposición de Intervet International B.V. Tres semanas después de la vacunación (6 semanas de edad), todos los animales fueron expuestos usando 5.0 log₁₀ TCID₅₀/ml de cepa de virus de exposición PCV2b de tipo silvestre (Experimento 1) o una cepa de PCV2d de tipo silvestre (Experimento 2) aplicada por vía intranasal a 3 ml por fosa nasal. Tres semanas tras la exposición, a todos los animales se les realizó la necropsia y se recogieron muestras de ganglio linfático mesentérico, amígdalas y ganglios linfáticos inguinales para la detección del virus PCV2 mediante un análisis de inmunohistoquímica (IHC), utilizando una puntuación que va de 0 (sin tinción positiva específica) a 3 (más del 50 % de los folículos linfoides contienen células con tinción positiva).

Los resultados se presentan en las figuras 1 y 2. Como queda claro en la figura 1, la protección homóloga de una vacuna contra el PCV2b, como se esperaba, es mejor que la protección heteróloga. PCV2a parece proporcionar una protección cruzada ligeramente mejor frente al PCV2b que PCV2d, aunque a la dosis más baja no hay diferencia.

Sorprendentemente, como muestra la figura 2, la proteína codificada por ORF2 del PCV2b proporciona protección heteróloga en las dosis bajas probadas a un nivel que es el mismo que la protección homóloga de la proteína codificada por ORF2 del PCV2d. Esto contrasta con la protección heteróloga ofrecida por la proteína codificada por ORF2 del PCV2a, que proporciona una protección peor en las dosis bajas probadas. Entonces, en comparación con el conocimiento común de que la proteína ORF2 de los genotipos PCV2a y PCV2b proporciona el mismo nivel de protección cruzada, parece que por debajo de 20 µg, una dosis que se sabe que es necesaria para actuar eficazmente contra el PCV2 en presencia de MDA (véase el documento EP 1926496), la proteína codificada por ORF2 del PCV2b proporciona una protección cruzada significativamente mejor que la proteína codificada por ORF2 del PCV2a. Del mismo modo, a pesar de la presencia de MDA, se podría llegar a una protección adecuada en comparación con el control a estos niveles de dosis bajos, en particular cuando se utiliza la proteína codificada ORF2 del PCV2b.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una proteína codificada por ORF2 del circovirus porcino 2 (PCV2) de genotipo 2b y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en un método para proteger a un cerdo contra una infección con el circovirus porcino tipo 2 de genotipo 2d administrando la vacuna al cerdo, en donde la vacuna comprende menos de 20 µg por dosis de la proteína codificada por ORF2, siendo la proteína de un circovirus porcino de genotipo 2b y en donde la vacuna proporciona protección contra el PCV2 de genotipo 2d a un nivel correspondiente a la protección conferida si el cerdo hubiera sido vacunado con una proteína codificada por ORF2 del PCV2d.
2. Una vacuna para usar de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la vacuna comprende menos de 5 µg por dosis.
3. Una vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna se utiliza en cerdos que tienen anticuerpos anti-PCV2.
4. Una vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna se utiliza en cerdos que tienen anticuerpos anti-PCV2 de origen materno.
5. Una vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna se utiliza en cerdos de 4 semanas de edad o menos.
6. Una vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna proporciona protección después de una sola administración de la vacuna.

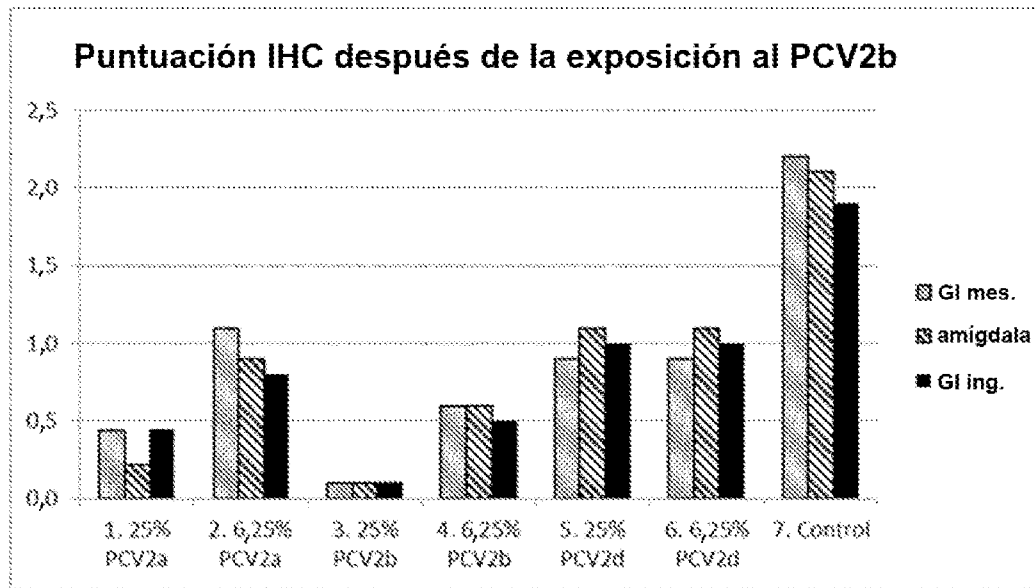


Figura 1

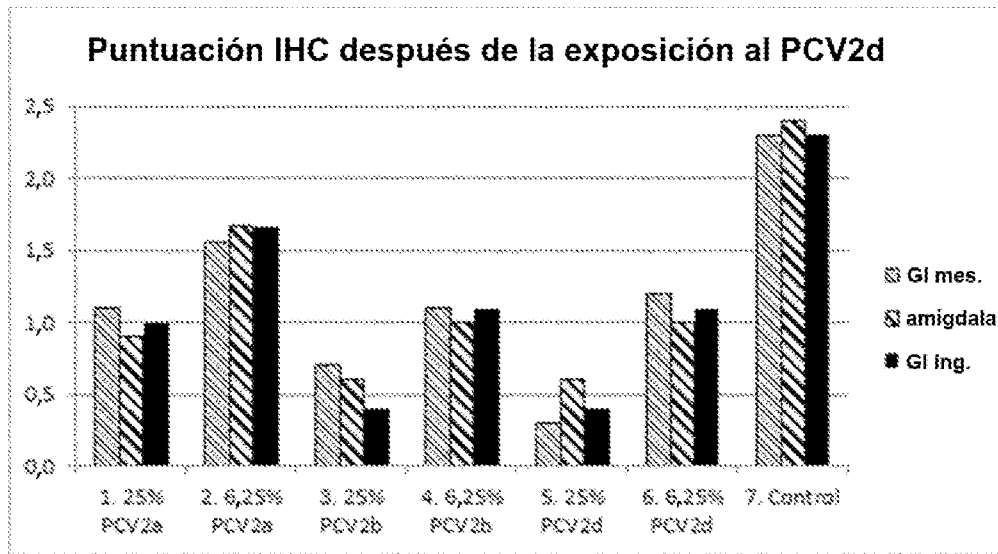


Figura 2