



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 580**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02735755 .7**
96 Fecha de presentación : **07.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1474067**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Vacunación en dosis única con *Mycoplasma hyopneumoniae*.**

30 Prioridad: **02.07.2001 US 302636 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Pfizer Products Inc.**
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US

72 Inventor/es: **Keich, Robin Lee y**
Sabbadini, Lisa Grace

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 312 580 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

Vacunación en dosis única con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causada por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) mediante la administración al animal de aproximadamente tres (3) a diez (10) días de edad, de una dosis única de una cantidad efectiva de una vacuna de *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* es una preparación de células vivas inactivadas o modificadas de células parciales o totales. La vacuna de *M. hyo* administrada de acuerdo con la presente invención puede producirse sintéticamente o por recombinación.

15 **Antecedentes de la invención**

El *M. hyo* es un patógeno bacteriano que provoca neumonía enzoótica en puercos. La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica que da lugar a una pobre conversión de los alimentos, crecimiento atrofiado y predisposición a infecciones pulmonares secundarias. El *M. hyo* se transmite fácilmente a través de las secreciones del tracto respiratorio y por transmisión cerda a lechón, y es altamente frecuente en las granjas de cerdos. Aproximadamente un 99% de las piaras de Estados Unidos están infectadas, lo que cuesta a la industria porcina aproximadamente 300 millones de dólares al año.

La mayoría de las vacunas conocidas contra el *M. hyo* se han basado en preparaciones de células totales inactivadas adyuvadas de *M. hyo*. Además, las vacunas basadas en proteínas o polipéptidos inmunogénicos se pueden sintetizar o preparar por clonación y expresión recombinante de genes de *M. hyo*. También se pueden emplear como vacunas los genes de *M. hyo* capaces de expresar los mencionados polipéptidos o proteínas *in vivo*.

Los ejemplos de vacunas de *M. hyo* inactivadas de células totales incluyen RESPISURE y STELLAMUNE, comercialmente disponibles por parte de Pfizer Inc., Estados Unidos.

Además, se han descrito varios polipéptidos y proteínas inmunogénicos de *M. hyo* producidos por recombinación que pueden ser útiles como vacunas de subunidades. La publicación de patente internacional WO 96/28472 describe seis especies de antígeno proteico de *M. hyo* de pesos moleculares de 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 y 110-114 kilodaltons, y describe secuencias de proteína parciales de los antígenos de 52-54, 60-64 y 72-75 kilodaltons y las secuencias de aminoácido y nucleótido de longitud completa del antígeno de 46-48 kilodalton.

Futo y col. (1995; J. Bacteriol 177:1915 - 1917) describieron también la clonación del gen que codifica la proteína P46 de *M. hyo*, es decir la p46. El mismo grupo mostró que el producto de gen expresado *in vitro* era útil en el diagnóstico de respuestas de anticuerpos a infecciones de *M. hyo* sin reactividad cruzada a otras especies de *Mycoplasma* (Futo y col., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683). Las secuencias y los usos de diagnóstico del gen de la p46 descritos por Futo y col. se describen además en la publicación de patente europea nº 0 475 185 A1.

Wise y Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) describen que hay cuatro especies de proteína de membrana integral en *M. hyo*, denominadas p70, p65 (P65, supra), p50 y p44, y que las tres últimas están modificadas por uniones covalentes de lípidos e inducen una respuesta inmune humoral fuerte. No se investigaron los efectos protectores de la respuesta inmune. Se ha clonado el gen que codifica la proteína P65, y se describen sus secuencias y usos en vacunas y diagnósticos en la patente de Estados Unidos Nº 5.788.962.

La publicación de patente internacional WO 91/15593 describe cinco proteínas de *M. hyo* de pesos moleculares aparentes de 105, 90, 85, 70 y 43 kilodaltons. Se proporciona una secuencia de longitud completa del gen que codifica la proteína de 85 kilodaltons (proteína C), ya que fueron secuencias de nucleótidos parciales las que codificaban las otras cuatro proteínas.

La patente de Estados Unidos Nº 5.252.328 de Faulds describe secuencias con terminación en amino de proteínas de *M. hyo* inmunoreactivas, los pesos moleculares de las mismas son 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 y 121 kilodaltons. Otras proteínas identificadas se basan en movilidades electroforéticas pero para estas no se ha descrito secuencias proteicas que tuviesen pesos moleculares aparentes de 22,5, 34 y 52 kilodaltons. Aunque la patente de Estados Unidos nº 5.252.328 propuso el uso de estas proteínas en formulaciones de vacuna no se han reseñado los resultados de los ensayos de las vacunas.

La publicación de patente internacional WO 95/09870 describe procedimientos bioquímicos para la purificación de adhesinas de *M. hyo*, las proteínas de membrana integrales micoplasmiales responsables de la adhesión al cilio del epitelio respiratorio superior del huésped. El documento WO 95/09870 también propone ensayos y usos para estas proteínas, por ejemplo en vacunas y diagnósticos.

Un trabajo de investigación de King y col. (1997; Vacuna 15:25-35) describe la Mhp1, una adhesina de 124 kilodaltons que es una variante de la cepa de la P97.

Wilton y col. (1988, Microbiology 144:1931-1943) identificaron una variante de la P97 de 94 kilodalton. De forma adicional se mostró que el gen p97 era parte de un operon que también codificaba una segunda proteína, denominada P102, de un peso molecular estimado de aproximadamente 102 kilodaltons (Hsu y col., 1998, gen 214:13-23). Minion y Hsu sugirieron el uso de P102 en vacunas en la publicación de patente internacional WO 99/26664 pero no reseñaron ensayos de vacunas.

Loyd L. C. *et al* (1989; Australian Veterinary Journal, vol. 66, nº 1, páginas 9 - 12) describe un procedimiento para el tratamiento o prevención de una enfermedad en cerdos provocada por la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*. La edad media de los animales tratados es 75,6 días.

Ninguna de las vacunas de *M. hyo* conocidas se ha descrito como efectiva en un tratamiento en dosis única de puercos de aproximadamente 3 a 10 días de edad. Tal vacuna eliminaría la necesidad de dosificación múltiple y por tanto disminuiría de forma significativa los costes y el trabajo asociado con la vacunación masiva de pjaras en todo el mundo. Por lo tanto, hay una necesidad de una vacuna efectiva de *M. hyo* que se pueda administrar a puercos en una vacunación en dosis única a aproximadamente 3 a 10 días de edad para la protección y prevención de enfermedades o trastornos causados por *M. hyo*.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causada por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende la administración al animal de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 días de edad de una cantidad efectiva de una dosis única de una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El uso de la presente invención elimina la necesidad de dosis adicionales con el fin de generar y/o mantener la inmunidad contra *M. hyo*. El presente procedimiento de vacunación en dosis (una) única proporciona protección a cerdos tanto seronegativos como seropositivos contra desafío con *M. hyo* virulento. El uso de la presente invención es efectivo en el tratamiento o prevención de los síntomas causados por infección por *M. hyo*, incluyendo, por ejemplo, la prevención y la reducción de lesiones pulmonares en puercos.

La vacuna de *M. hyo* administrada de acuerdo con la presente invención puede incluir componentes adicionales, tales como un adyuvante. Los diferentes adyuvantes que se pueden emplear incluyen aquellos descritos en el presente documento y los conocidos en la técnica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende el uso de una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causada por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende la administración al animal de aproximadamente 3 a 10 días de edad de una cantidad efectiva de una dosis única de una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La vacunación en dosis única de la presente invención elimina la necesidad de administrar dosis adicionales a puercos con el fin de generar y/o mantener la inmunidad contra *M. hyo*.

Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

En determinadas realizaciones, las vacunas empleadas en el uso de presente invención comprenden una preparación (bacterina) inactivada de células parciales o totales de *M. hyo* o una vacuna de células vivas modificadas y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o una preparación (bacterina) inactivada de células parciales o totales de *M. hyo* o una vacuna de células vivas modificadas y un adyuvante.

Definiciones y abreviaturas

El término “tratar o prevenir” respecto a una infección por *M. hyopneumoniae* tal como se usa en el presente documento significa inhibir la replicación de las bacterias *M. hyopneumoniae* para inhibir la transmisión de *M. hyopneumoniae* o evitar que *M. hyopneumoniae* se establezca por sí mismo en su huésped, y aliviar los síntomas de la enfermedad o trastorno provocado por infección de *M. hyopneumoniae*. Se considera que el tratamiento es terapéutico si hay una reducción en la carga bacteriana, disminución de las infecciones pulmonares y/o aumento en la captación de alimentos y/o crecimiento. El procedimiento de la presente invención es, por ejemplo, efectivo en la prevención o reducción de lesiones pulmonares.

El término “vacuna de *M. hyo*” tal como se usa en el presente documento se refiere a una vacuna útil en el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad causada por infección por *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* puede incluir cualquier vacuna efectiva en el tratamiento o prevención de una infección en puercos por *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* que se puede emplear en la presente invención puede incluir, por ejemplo, una preparación de células *M. hyo* totales o parciales, vacunas de células vivas inactivadas o modificadas, una vacuna de subunidades que presenta uno o más polipéptidos o proteínas derivadas de *M. hyo*, o fragmentos inmunogénicos de las mencioandas proteínas

ES 2 312 580 T3

o polipéptidos, o uno o más genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* que codifican para una o más proteína o polipéptidos derivados de *M. hyo* o fragmentos inmunogénicos de los mismos y cuyos genes o ácidos nucleicos son capaces de ser expresados *in vivo* en puercos. Los polipéptidos, proteínas, fragmentos inmunogénicos de *M. hyo* de los mencionados polipéptidos y proteínas, o genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* se pueden producir sintéticamente o de forma recombinante empleando técnicas conocidas en la técnica. Preferiblemente, la vacuna de *M. hyo* empleada en el procedimiento de la presente invención es una bacterina.

El término “animal” tal como se usa en el presente documento se refiere a todo animal no humano incluyendo mamíferos.

El término “cerdo” tal como se usa en el presente documento se refiere a lechones, puercos, cerdos, ganado porcino, cerdas, cerdas jóvenes, cerdos castrados, jabalís y miembros de la familia Suidae.

Preferiblemente el procedimiento de la presente invención se aplica a un animal que es un mamífero no humano; lo más preferiblemente, un cerdo.

El término “bacterina” tal como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de células de *M. hyo* parciales o totales inactivadas adecuada para su uso como una vacuna.

El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de vacuna *M. hyo* suficiente para dar lugar a una respuesta inmune en el sujeto al que se administra. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de innato, inmunidad celular y/o humoral.

Vacunas de células vivas inactivadas (células parciales o totales) y modificadas

En la técnica se conocen los procedimientos para la preparación de vacunas de células vivas inactivadas o modificadas para usar en el procedimiento de la presente invención.

Las bacterinas de *M. hyo* que se pueden emplear en el presente procedimiento de vacunación en dosis única se pueden obtener a partir de varias fuentes públicamente disponibles. Por ejemplo, las bacterinas de *M. hyo* se pueden preparar a partir de aislados de *M. hyo*. Los especialistas en la técnica conocen numerosos aislados de *M. hyo* y están disponibles en, por ejemplo, el American Type Culture Collection, University Boulevard 10801, Manassas, VA 20110-2209. Estos incluyen por ejemplo: los ATTC números 25095, 25617, 25934, 27714 y 27715.

Los aislados de *M. hyo* se pueden obtener también directamente a partir de lesiones pulmonares porcinas infectadas de forma natural o experimental empleando técnicas conocidas.

Los aislados de *M. hyo* se pueden inactivar empleando una variedad de procedimientos conocidos, por ejemplo, tratamiento del aislado bacteriano con etilénimina binaria (BEI) tal como se describe en la patente de Estados Unidos nº 5.565.205 o inactivación con, por ejemplo, formalina, calor, BPL, irradiación o glutaraldehído.

Las bacterinas de *M. hyo* adecuadas para su uso en el procedimiento de la presente invención se pueden obtener también a partir de varias fuentes comerciales. Las mencionadas fuentes incluyen pero sin limitarse a estas: RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Merial Ltd), M + PAC (Schering Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.) y STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Una fuente preferida de bacterina de *M. hyo* para el uso en el procedimiento de la presente invención es RESPISURE y STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Una fuente particularmente preferida de bacterina de *M. hyo* para su uso en el procedimiento de la presente invención es el RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), que contiene la cepa P-5722-3 (NL 1042), adquirida a Purdue University, Estados Unidos.

Preferiblemente la cepa P-5722-3 se inactiva con BEI y se adyuva con un adyuvante comercialmente disponible, preferiblemente AMPHIGEN (Hydronics, Estados Unidos). Una dosis preferida es de aproximadamente 2,0 ml. Los conservantes que se emplean convencionalmente incluyen mertiolato/EDTA (ácido etilendiaminotetracético). Se puede añadir un vehículo, preferiblemente PBS. Se conoce en la técnica la preparación de vacunas de células vivas modificadas tal como por medio de atenuación de cepas virulentas por pase en cultivo.

Formulaciones de vacuna

Las preparaciones adecuadas de vacunas empleadas en la presente invención incluyen preparaciones inyectables, bien en soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido previo a inyección. La preparación también se puede emulsionar. Los ingredientes inmunogénicos activos se mezclan frecuentemente con adyuvantes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo.

ES 2 312 580 T3

Los polipéptidos se pueden formular en vacunas en formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupo amino libres del polipéptido) y las formadas con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, maleico y similares. Las sales formadas con los grupo carboxilo libres pueden derivarse también de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo hidróxidos de potasio, sodio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino, etanol, histidina, procaína y similares.

Las formulaciones de vacuna empleadas en la presente invención comprenden una cantidad inmunizante del inmunógeno de *M. hyo* y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones de vacuna comprenden una cantidad de inmunización eficaz de uno o más antígenos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen pero sin limitarse a estos, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril y combinaciones de los mismos. Un ejemplo de tal vehículo aceptable es un medio de cultivo equilibrado fisiológicamente que contenga uno o más agentes de estabilización tales como proteínas hidrolizadas estabilizadas, lactosa etc. El vehículo es preferiblemente estéril. La formulación se adecuaría al modo de administración.

El uso de antígenos purificados como preparaciones de vacuna se puede llevar a cabo por procedimientos convencionales. Por ejemplo, la(s) proteína(s) purificada(s) debería(n) ajustarse a una concentración adecuada, formulada con cualquier adyuvante de vacuna adecuado y embalado para el uso. Los adyuvantes adecuados pueden incluir, pero sin limitarse a estos: geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina; glicósidos, por ejemplo derivados de saponina tales como Quil A o GPI-0100; tensioactivos catiónicos, por ejemplo, DDA (halogenuros de amonio de hidrocarburos cuaternarios, polioles plurónicos; polianiones; polímeros de bloque no iónicos, por ejemplo Pluronic F-127 (B.A.S.F., Estados Unidos); Avidina y Rantidina; péptidos; toxinas mutantes hábiles recombinantes, por ejemplo leucotoxina (mlT) o toxina de cólera (CT); transportadores moleculares unidos químicamente o de proximidad estrecha; aceites minerales, por ejemplo, Montanide ISA-50 (Seppic, París, Francia), carbopol, Amphigen (Hydronics, Estados Unidos, Omaha, NE estados Unidos, Alhydrogel (Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca), emulsiones de aceite, por ejemplo una emulsión de aceite mineral tal como BayolF/Arlacel A y agua o una emulsión de aceite vegetal, agua y un agente emulsificante tal como lecitina; alumbre, MDP, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isogluramina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina; citoquinas de coloesterol y combinaciones de adyuvantes. Iones policatiónicos también pueden funcionar como una suspensión monodispersa después de un período más prolongado de sedimentación. Las combinaciones de adyuvantes pueden estar presentes en formas encapsuladas (de liberación controlada o retrasada) o microencapsuladas.

El inmunógeno también puede incorporarse en liposomas o conjugarse con polisacáridos y/o otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna. En casos en los que el antígeno recombinante es un hapteno, es decir, una molécula que es antigénica de forma que pueda reaccionar de forma selectiva con anticuerpos afines, pero no inmunogénicos de forma que no puedan dar lugar a una respuesta inmune, el hapteno pueden unirse de forma covalente a un vehículo o molécula inmunogénica; por ejemplo, una proteína grande tal como albúmina del suero que conferirá inmunogenicidad al hapteno acoplado con ella. El vehículo-hapteno se puede formular para su uso como una vacuna.

Vacunas de genes y ácidos nucleicos

El procedimiento de la presente invención puede llevarse a la práctica empleando genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* que codifican proteínas, polipéptidos inmunogénicos y fragmentos inmunogénicos de las mencionadas proteínas y polipéptidos. Los mencionados genes y ácidos nucleicos se pueden expresar *in vivo* y se pueden preparar empleando técnicas conocidas en la técnica.

En una realización específica la vacuna empleada en la presente invención comprende al menos un gen o ácido nucleico que codifica para una proteína de *M. hyo* tal como, pero sin limitarse a estas, P46, P65, P97, P102, P70, P50, y P44.

En una realización específica adicional los genes o ácidos nucleicos empleados en el procedimiento de la presente invención codifican para los fragmentos inmunogénicos de las proteínas o polipéptidos de *M. hyo* que presentan una secuencia que comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos contiguos de las proteínas y polipéptidos inmunogénicos empleados en el procedimiento de la presente invención, incluyendo pero sin limitarse a estos, P46, P65, P97, P102, P70, P50, y P44.

En otras realizaciones del procedimiento de la presente invención, el gen o ácidos nucleicos empleados se administran por procedimientos conocidos, tales como, por ejemplo, mediante el uso de una pistola génica.

Aún en otras realizaciones del procedimiento de la presente invención, el gen o ácidos nucleicos empleados son vacunas de ADN. Además, el ácido nucleico o genes pueden estar presentes asociados a liposomas u otros agentes que favorezcan la transfección, tal como se conoce en la técnica.

Los procedimientos para la preparación y liberación de vacunas de ADN son conocidos en la técnica, Véase por ejemplo, Krishnan, B. R., "Current status of DNA vaccines in veterinary medicine", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier Science (2000).

Sistemas de expresión

Se puede utilizar una variedad de sistemas vector de expresión en el huésped para expresar las secuencias de proteína antigénica de la presente invención. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos por lo cuales se pueden producir las secuencias que codifican de interés y consiguientemente purificarse, pero también representa células que pueden, cuando se transforman o transfectan con los nucleótidos adecuados que codifican secuencias, mostrar los productos de gen de *M. hyo* empleados en el procedimiento de la presente invención *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitarse a estos, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias que codifican *mhp3*; levadura (por ejemplo *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican el producto génico de *M. hyo*; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo baculovirus) que contienen las secuencias que codifican *M. hyo*; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican *M. hyo*; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que engloban construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo el promotor último del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). En una realización preferida, el sistema de expresión es un sistema bacteriano.

Los polipéptidos y proteínas de *Mycoplasma hyopneumoniae* y sus fragmentos inmunogénicos también se pueden expresar y administrar usando los vectores virales y bacterianos recombinantes vivos tales como adenovirus o *Salmonella*. Los vectores reales también se conocen y están fácilmente disponibles en la técnica o se pueden construir por los expertos en la técnica usando la metodología bien conocida.

Dosificación y modos de administración

De acuerdo con la presente invención una única dosis de una cantidad efectiva de una vacuna de *M. hyo* administrada a puercos de aproximadamente 3 a 10 días de edad proporciona inmunidad efectiva contra un desafío posterior de *M. hyo*. Preferiblemente la vacuna de *M. hyo* se administra a aproximadamente seis a aproximadamente ocho días de edad. Lo más preferible es que la vacuna de *M. hyo* se administre a aproximadamente siete días de edad.

La cantidad de una vacuna de bacterina de *M. hyo* efectiva en la administración de una dosis contiene aproximadamente de 1×10^6 a aproximadamente 5×10^{10} unidades de cambio de color (CCU) por dosis. Preferiblemente una vacuna de bacterina de *M. hyo* que proporciona inmunidad efectiva en una única dosis contiene de aproximadamente 1×10^8 a 5×10^{10} CCU/dosis y más preferiblemente de aproximadamente 5×10^8 a 5×10^{10} CCU/dosis.

De acuerdo con la presente invención cuando se administra el producto de bacterina preferido RESPISURE-1, la cantidad de RESPISURE-1 para una administración de una dosis es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 ml, preferiblemente de aproximadamente 1,5 ml a aproximadamente 2,5 ml y más preferiblemente de aproximadamente 2 ml.

La cantidad de una vacuna de *M. hyo* que constituye una vacuna de subunidades que comprende una o más proteínas o polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de las mencionadas proteínas o polipéptidos efectiva en el procedimiento de la presente invención es de aproximadamente 0,01 μg a aproximadamente 200 μg .

La cantidad de una vacuna de *M. hyo* que constituye una vacuna que comprende uno o más genes o ácidos nucleicos (preferiblemente de ADN) de *M. hyo* que codifican para proteínas o polipéptidos inmunogénicos o fragmentos inmunogénicos de las mencionadas proteínas o polipéptidos efectiva en el procedimiento de la presente invención es de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 200 mg.

De acuerdo con la presente invención se puede lograr la administración por vías conocidas, incluyendo oral, intranasal, tópica, transdérmica y parenteral (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). Una vía de administración también se puede lograr usando dispositivos de administración sin aguja. La administración se puede lograr usando una combinación de vías, por ejemplo, primero la administración usando una vía parenteral y posteriormente la administración usando una vía mucosal. Una vía preferida de administración es la administración intramuscular.

Las dosis efectivas (cantidades de inmunización) de vacunas de la presente invención se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo modelo.

Los presentes procedimientos de vacunación proporcionan inmunidad protectora tanto a lechones seropositivos como a lechones seronegativos en *M. hyo*. Los lechones seronegativos se refieren a aquellos lechones que presentan en el suero anticuerpos contra *M. hyo*. Los lechones seronegativos se refieren a aquellos lechones que no presentan en el suero cantidades detectables de anticuerpos contra *M. hyo*.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitación, mediante los siguientes ejemplos.

ES 2 312 580 T3

Ejemplo 1

*Preparación de una bacterina de *M. hyo**

5 Se emplea etilenimina binaria (BEI) para la inactivación de la cepa NL1042 de *M. hyo*.

Al final del período de crecimiento el pH del cultivo aumentó hasta $7,8 \pm 0,2$, y se mantuvo el pH dentro de este intervalo durante al menos una hora. En ese momento se añade una solución acuosa de bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEA) esterilizada con filtro hasta una concentración final de aproximadamente 4,0 mM. En presencia del pH
10 elevado, el BEA se transforma químicamente en BEI. Se incuba el cultivo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación constante durante al menos 24 horas.

Tras la incubación de 24 horas se añade una solución acuosa esterilizada con filtro de tiosulfato de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 4 mM para neutralizar el exceso de BEI. El cultivo se incuba a
15 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación constante durante 24 horas más.

Tras la inactivación, pero antes de la neutralización con tiosulfato de sodio, se toma una muestra representativa y se comprueba si se ha completado la inactivación. Se inocula medio fresco que contenga un 0,0026% de rojo de fenol con un 5 a un 20% de inóculo y se incuba a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos una semana antes del examen del cambio de color, el cual es indicativo del fallo en la inactividad. Se ensaya la esterilidad de las muestras a granel en medio fluido de tioglicolato a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y medio fluido de soja tripticosa a temperatura ambiente. El cultivo inactivado se puede transferir a recipientes de almacenamiento estéril y se almacena a $2-8^\circ\text{C}$ hasta que se haya ensamblado.

Se determina la potencia mediante un ensayo serológico *in vitro* para cuantificar el antígeno en el envase final. La potencia de las vacunas empleadas en el estudio de eficacia determina la potencia mínima que debe estar presente en la vacuna en la fecha de caducidad.

Se ensayó el *M. hyo* de las muestras a granel o en envase final del producto acabado de cada serie o primera subserie como sigue.

30 La bacterina se almacena a -50°C en viales de 100 ml. Los viales se descongelaron y se almacenaron en subalícuotas de 15 ml a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Para comprobar la potencia de una serie ensamblada se compara una muestra de la serie con una referencia, y se determinan unidades de RP (potencia relativa) para la serie. Una serie o subserie debería contener preferiblemente al menos 6,33 RP al comienzo del fechado y al menos 5,06 RP a lo largo del fechado.

RP se refiere a potencia relativa. Las RPs se pueden determinar mediante una cuantificación de antígenos relativa comparada con una vacuna de referencia. En este caso la referencia presenta una RP por definición = 1,0. El producto de dosis única de la presente invención presenta preferiblemente una RP de 6,33 que es 6,33 veces el valor de la referencia.

Se añade mertiolato como conservante a una concentración final que no exceda de un 0,01% (en relación peso/volumen).

45 Se añade solución de ácido etilendiaminotetracético al 10% (EDTA, sal disódica o tetrasódica) como conservante hasta una concentración final de aproximadamente un 0,07% (en relación peso/volumen).

50 Ejemplo 2

Animales

55 Se seleccionaron cerdos de aproximadamente una semana de edad para la vacunación. Se ensaya el estado serológico en *M. hyo* en un ensayo ELISA. Los cerdos con un valor ELISA menor o igual a 0,50 se consideraron negativos en *M. hyo*. Los cerdos con un valor ELISA superior a 0,50 se consideraron serológicamente positivos en *M. hyo*.

Vacunas

60 Se emplea bacterina *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) para vacunar los cerdos. Se determina la potencia de la vacuna antes del uso mediante cuantificación de antígenos relativa en comparación con una bacterina *M. hyo* de referencia. La vacuna de referencia (RP = 1,0) contenía aproximadamente 8000 unidades de antígeno (aproximadamente de 1 a 2×10^8 CCU de células viables recolectadas antes de la inactivación) por dosis, determinado mediante un ensayo inmune en fase sólida que medía la cantidad de antígeno de *M. hyo* en la vacuna.

65 Se emplea el mismo adyuvante líquido (AMPHIGEN) empleado en la formulación de RESPISURE - 1 como el placebo (es decir, sin células bacterianas).

ES 2 312 580 T3

Inóculo de desafío

El inóculo de desafío estaba constituido por alícuotas de 10 ml de homogenato de pulmón, congelado a -70°C , y se identificó como un derivado de la cepa 11 (L1 36) de *M. hyo*. Se descongela el inóculo y luego se diluye en caldo Friis Mycoplasma para alcanzar una dilución 1:25 y se mantiene en hielo hasta que se administra. Cada cerdo recibe una dosis intranasal de 5 ml (2,5 ml por orificio nasal) de la suspensión 1:25 en los días especificados en cada uno de los siguientes ejemplos. En cada día de desafío se cultiva una alícuota del inóculo de pulmón para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se valora nuevamente una segunda alícuota en cada uno de los tres días, los resultados indican que el inóculo contenía aproximadamente de 10^6 a 10^7 unidades de cambio de color (CCU)/ml de *M. hyo*.

Procedimiento experimental

Se identificaron los cerdos con etiquetas de oreja mientras estaban todavía con la madre [día (-1)]. Se distribuyeron los cerdos en jaulas y en grupos de tratamiento de acuerdo con un diseño en bloques aleatorio generalizado. Los cerdos se agruparon en camadas y corrales después del destete.

Los cerdos se vacunaron en el día 0 bien con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) o con una dosis intramuscular de 2 ml de placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de desafío en los días especificados en cada uno de los siguientes ejemplos. Se controla y comprueba diariamente en todos los cerdos signos clínicos de enfermedad.

En el momento especificado después del primer día de desafío se sacrifican todos los cerdos y se les somete a necropsia. Se extraen los pulmones y se evalúan. El examen postmortem incluyó una estimación de la extensión de la patología asociada con la enfermedad respiratoria micoplasmal. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejan las lesiones para estimar el porcentaje afectado de cada lóbulo. Se registra el grado de lesiones macroscópicas presentes.

Análisis de datos

Se evalúa la eficacia en base al porcentaje de las lesiones en el pulmón típicas de una infección por *M. hyo*. Se determinan los cerdos del grupo de tratamiento (vacunados) que presentan un porcentaje de pulmón total con lesiones que fuera significativamente (P menor o igual a 0,05) inferior que el de los cerdos en el grupo de placebo.

Porcentaje de pulmón total con lesiones

Se pondera la implicación macroscópica en porcentaje por cada lóbulo pulmonar empleando las siguientes proporciones de lóbulos pulmonares individuales a masa de pulmón total: craneal izquierdo 10%, medio izquierdo 10%, caudal izquierdo 25%, craneal derecho 10%, medio derecho 10%, caudal derecho 25% y accesorio 10%. Los valores de lóbulo pulmonar ponderados se sumaron luego a lo largo de los lóbulos para dar el porcentaje de pulmón total con lesiones (Pointon y col., 1992).

Ejemplo 3

Se evalúa la protección contra el desafío con *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente positivos en *M. hyo* empleando una dosis única de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), administrada a cerdos en los días 3 a 8 de edad.

Se llevan a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para RESPISURE-1 en o en torno al momento de vacunación. Se determina la potencia relativa (RP) mediante la cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presenta una $RP = 1,0$, contenía aproximadamente 8000 unidades de antígeno de *M. hyo*. Las RPs de estos cinco ensayos fueron 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 y 4,36 respectivamente.

En el día 0 se vacunaron los cerdos en el grupo de tratamiento T02 (véase Tabla 1 a continuación) con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Se vacunaron los cerdos en el grupo T01 intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de desafío en los días 178, 179 y 180. En cada uno de los tres días se cultivó una alícuota del material de desafío en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se valoró nuevamente una segunda alícuota para confirmar que el lote de desafío contenía aproximadamente 10^7 CCU/ml de *M. Hyo*. Se controló y comprobó diariamente en todos los cerdos la presencia de signos de enfermedad clínica.

Treinta días después del primer día de desafío se sacrifican todos los cerdos y se les somete a necropsia. Se extraen y evalúan los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación de la extensión de la patología asociada con la enfermedad respiratoria micoplasmal. Se examina cada lóbulo pulmonar y se bosquejan las lesiones para estimar el porcentaje afectado en cada lóbulo. Se registra el grado de lesiones totales presente.

ES 2 312 580 T3

TABLA 1

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el día 0	Desafío el día 178 ¹	Desafío el día 179 ¹	Desafío el día 180 ¹
T01	Placebo	26	26	26	26	26
T02	Vacuna	26	26	24 ^a	22 ^a	22 ^a

¹ Inóculo de *M. hyo* virulento

² Los cerdos 71 y 73 se retiraron del estudio antes del desafío ya que ambos animales perdieron las etiquetas de las orejas y por tanto no se podía determinar la identidad de cada animal.

³ El cerdo 36 falleció en el día 178 debido a complicaciones anestésicas. El cerdo 31 falleció el día 179 debido a complicaciones anestésicas.

Los resultados de lesión pulmonar se resumen en la Tabla 2. Los resultados indican que los cerdos vacunados (T02) presentaban un porcentaje medio obtenido por mínimos cuadrados significativamente ($P = 0,0385$) inferior de lesiones pulmonares neumónicas que los cerdos del placebo (T01) (2,0 frente a un 4,5%).

TABLA 2

Sumario de porcentaje de lesiones pulmonares totales

Tratamiento	Compuesto	Número de cerdos	Media LS	Intervalo
T01	Placebo	26	4,5 ^a	0 a 36,75
T02	Vacuna	22	2,0 ^b	0 a 13,75

^{a, b} Valores con un superíndice diferente son estadísticamente significativos ($P = 0,0385$)

Los resultados indican que la vacunación única de cerdos de aproximadamente una semana de edad con bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 inducía la protección contra un desafío consiguiente con *M. hyo* virulento.

Ejemplo 4

Se evalúa la protección contra el desafío con *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente negativos en *M. hyo* empleando una dosis única de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 administrada a cerdos de 3 a 8 días de edad.

Se llevan a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para la vacuna en o en torno al momento de vacunación. Se determina la RP mediante una cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presenta un RP = 1,0, contenía aproximadamente 8000 unidades de antígeno de *M. hyo*. Las RP de estos cinco ensayos fueron 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 y 4,36 respectivamente.

En el día 0 se vacunaron los cerdos en el grupo de tratamiento T02 con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1. Se vacunaron los cerdos en el grupo T01 intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de desafío en los días 173, 174 y 175. En cada uno de los tres días se cultivó una alícuota del material de desafío en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se valoró nuevamente una segunda alícuota para confirmar que el lote de desafío contenía aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Se controlaron todos los cerdos y se comprobó diariamente la presencia de signos de enfermedad clínica.

Veintinueve días después del primer día de desafío se sacrifican todos los cerdos y se les somete a necropsia. Se extraen y evalúan los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación de la extensión de la patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejan las lesiones para estimar la consolidación en porcentaje en cada lóbulo. Se registra el grado de lesiones macroscópicas presente.

ES 2 312 580 T3

La Tabla 3 resume el diseño experimental.

TABLA 3

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el día 0	Desafío el día 173 ¹	Desafío el día 174 ¹	Desafío el día 175 ¹
T01	Placebo	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	Vacuna	26	26	23 ³	20 ⁵	20

¹ *M. hyo* virulento

² El cerdo 123 se sacrificó el día 19 debido a una poliartritis séptica crónica.

³ El cerdo 222 falleció en el día 40. La necropsia reveló una gran cantidad de fluido pericardial y hemorragia en el pericardio. El cerdo 102 se sacrificó el día 95 debido a un prolapso rectal. El cerdo 204 falleció el día 145. No se llevó a cabo necropsia alguna debido a la descomposición avanzada de la canal.

⁴ El cerdo 244 falleció el día 174 tras el primer día de desafío debido a complicaciones anestésicas.

⁵ NEEA para incluir los tres cerdos.

Se resumen las lesiones pulmonares en la Tabla 4. El análisis global indicó que los cerdos vacunados (T02) presentaban un porcentaje medio obtenido por mínimos cuadrados significativamente ($P = 0,0001$) inferior de lesiones pulmonares neumónicas que los cerdos del placebo (T01) (0,3 frente a 5,9%).

TABLA 4

Sumario de porcentaje de lesiones pulmonares totales

Porcentaje de pulmón con lesión

Tratamiento	Compuesto	Número de cerdos	Media LS	Intervalo
T01	Placebo	24	5,9 ^d	0 a 36
T02	Vacuna	20	0,3 ^b	0 a 6

^{a, b} Valores con superíndices diferentes son estadísticamente significativos ($P = 0,0001$)

Los resultados de este estudio indican que la vacunación única de cerdos con bacterina de *M. hyo* RESPISURE ONE inducía la protección contra un desafío consiguiente experimental con *M. hyo* virulento.

Ejemplo 5

Se evalúa la protección contra el desafío con *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente negativos en *M. hyo* empleando una dosis única de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 administrados a cerdos de 3 a 8 días de edad.

Se llevan a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para la vacuna en o en torno al momento de vacunación. Se determina la RP mediante una cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presenta un $RP = 1,0$, contenía aproximadamente 8000 unidades de antígeno de *M. hyo*. Las RP de estos cinco ensayos fueron 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 y 4,36 respectivamente.

En el día 0 se vacunaron los cerdos en el grupo de tratamiento T02 con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina *M. hyo* RESPISURE-1. Se vacunaron los cerdos en el grupo T01 intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml (2,5 ml por orificio) de la suspensión 1:25 del inóculo de desafío en los

ES 2 312 580 T3

días 76, 77 y 78. En cada uno de los tres días se cultivó una alícuota del material de desafío en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se valoró nuevamente una segunda alícuota para confirmar que el lote de desafío contenía aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Se controlaron todos los cerdos y se comprobó diariamente la presencia de signos de enfermedad clínica.

Veintinueve días después del primer día de desafío se sacrifican todos los cerdos y se les somete a necropsia. Se extraen y evalúan los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación de la extensión de la patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se esbozan las lesiones para estimar la consolidación en porcentaje en cada lóbulo. Se registra el grado de lesiones totales presente.

La Tabla 5 resume el diseño experimental.

TABLA 5

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el día 0	Desafío el día 176 ¹	Desafío el día 177 ¹	Desafío el día 178 ¹
T01	Placebo	26	26	23 ²	23	23
T02	Vacuna	26	26	21 ³	21	21

¹ *M. hyo* virulento

² Los cerdos 237 y 239 dieron positivo el día -1 en neumonía por *M. hyo*. Estos lechones se retiraron del estudio en el día 14 y se sacrificaron. El cerdo 220 falleció en el día 3 al ser aplastado por la madre.

³ Los cerdos 238, 240 y 277 dieron positivo en el día -1 en neumonía por *M. hyo*. Estos lechones se retiraron del estudio en el día 14 y se sacrificaron. El cerdo 260 se sacrificó en el día 7 después de mostrar síntomas de anorexia e inapetencia. El cerdo 177 se sacrificó el día 40 debido al síndrome de debilitamiento crónico.

Se resumen las lesiones pulmonares en la Tabla 6. El análisis global indicó que los cerdos vacunados (T02) presentaban un porcentaje medio obtenido por mínimos cuadrados significativamente ($P = 0,0001$) inferior de lesiones pulmonares neumónicas que los cerdos del placebo (T01) (0,5 frente a 9,9%).

TABLA 6

Sumario de porcentaje de lesiones pulmonares totales

Porcentaje de pulmón con lesión

Tratamiento	Compuesto	Número de cerdos	Media LS	Intervalo
T01	Placebo	23	9,9 ^a	0 a 40,5
T02	Vacuna	21	0,5 ^b	0 a 5

^{a, b} Valores con superíndices diferentes son estadísticamente significativos ($P = 0,0001$)

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o
prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causada por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*
para la administración al animal de entre 3 y 10 días de edad, de una cantidad efectiva de una dosis única de una
vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la vacuna monodosis de *Mycoplasma hyopneumoniae*
contiene entre 1×10^6 y 5×10^{10} unidades de cambio de color (CCU) por dosis.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la cantidad de dicha vacuna administrada es entre 0,5 y 3,0
ml.

15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* contiene la cepa
P-5722-3

20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además
un antígeno viral o bacteriano distinto a *Mycoplasma hyopneumoniae*.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dichos antígenos virales o bacterianos se seleccionan entre
el virus de la gripe en puercos (SIV), virus de la enfermedad respiratoria y reproductiva porcina (PRRS o enfermedad
porcina misteriosa), diarrea después del destete (PWD) y enteritis proliferativa porcina (PPE).

25 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha preparación de *Mycoplasma hyopneumoniae* se admi-
nistra de forma intramuscular.

8. El uso de acuerdo con la preparación 1 en el que dichos puercos están protegidos hasta 25 semanas tras la
vacunación.

30 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además
un adyuvante.

35

40

45

50

55

60

65