

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 MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2002 PCT/IB2002/02121**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2003 WO03003941**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2002 E 02735755 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.08.2017 EP 1474067**

54 Título: **Vacunación en dosis única con *Mycoplasma hyopneumoniae* /I**

30 Prioridad:

02.07.2001 US 302636 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
11.12.2017

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**KEICH, ROBIN LEE y
SABBADINI, LISA GRACE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Vacunación en dosis única con *Mycoplasma hyopneumoniae* /I

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención, en cerdos serológicamente negativos para la *Mycoplasma hyopneumoniae*, de una enfermedad o trastorno causado por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) mediante la administración a cerdos de tres (3) a diez (10) días de edad, de una dosis única de una cantidad eficaz de una vacuna de *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* es una preparación viva de células completas o parciales inactivada o modificada. La vacuna de *M. hyo* administrada según la presente invención puede producirse sintéticamente o por
10 recombinación.

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 insatisfactoria conversión de los alimentos, crecimiento atrofiado y predisposición a infecciones pulmonares secundarias. El *M. hyo* se transmite fácilmente a través de las secreciones
15 del tracto respiratorio y por transmisión cerda a lechón, y es altamente frecuente en las granjas de cerdos. Aproximadamente el 99 % de las piaras de puercos 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 completas inactivada adyuvada de *M. hyo*. Además, las vacunas basadas en proteínas o polipéptidos inmunogénicos se
20 pueden sintetizar o preparar por clonación y expresión recombinante de genes de *M. hyo*. También se pueden usar como vacunas los genes de *M. hyo* capaces de expresar tales polipéptidos o proteínas *in vivo*.

Los ejemplos de vacunas de *M. hyo* inactivadas de células completas incluyen RESPISURE y STELLAMUNE, disponibles en el mercado a través de Pfizer Inc., Estados Unidos.

Además, se han descrito varios polipéptidos y proteínas inmunogénicos de *M. hyo* producidos por recombinación
25 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 desvela 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 kilodaltons.

Futo y col. (1995; J. Bacteriol 177:1915-1917) describieron también la clonación del gen que codifica la proteína P46
30 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 desvelan además en la publicación de patente europea n.º 0 475 185 A1.

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

La publicación de patente internacional WO 91/15593 describe cinco proteínas de *M. hyo* de pesos moleculares
40 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 estadounidense n.º 5.252.328 de Faulds desvela secuencias con terminación en amino de proteínas de
45 *M. hyo* inmunorreactivas, 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 desvelado secuencias proteicas que tuviesen pesos moleculares aparentes de 22,5, 34 y 52 kilodaltons. Aunque la patente estadounidense n.º 5.252.328 propuso el uso de estas proteínas en formulaciones de vacuna, no se indicaron los resultados de las pruebas de las vacunas.

La publicación de patente internacional WO 95/09870 desvela procedimientos bioquímicos para la purificación de adhesinas de *M. hyo*, las proteínas de membranas integrales micoplasmiales responsables de la adhesión a cilios 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.

- 5 Un trabajo de investigación de King y col. (1997; Vaccine 15:25-35) desveló 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 kilodaltons. De manera adicional, se mostró que el gen de p97 era parte de un operón que también codificaba una segunda proteína, denominada P102, de un peso molecular estimado de aproximadamente 102 kilodaltons (Hsu y col., 1998, Gene 214:13-23). Minion y Hsu sugirieron el uso de P102 en vacunas en la publicación de patente internacional WO 99/26664 pero no indicaron pruebas de vacunas.

Loyd L. C. y col. (1989; Australian Veterinary Journal, vol. 66, n.º 1, páginas 9-12) desvelaron 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 era de 75,6 días.

- 15 Ninguna de las vacunas de *M. hyo* conocidas se ha descrito como eficaz 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 manera significativa los costes y el trabajo asociados con la vacunación masiva de piaras de puercos en todo el mundo. Por lo tanto, existe la necesidad de una vacuna eficaz de *M. hyo* que se pueda administrar a puercos en una vacunación en dosis única de 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 bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención, en cerdos serológicamente negativos para *Mycoplasma Hyopneumoniae*, de una enfermedad o trastorno causado por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende la administración a los cerdos de 3 a 10 días de edad de una cantidad eficaz 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 uso de vacunación de dosis única (una) proporciona protección a cerdos seronegativos contra el estímulo con *M. hyo* virulento. El uso de la presente invención es eficaz 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 según la presente invención puede incluir componentes adicionales, tales como un adyuvante. Los diferentes adyuvantes que se pueden usar incluyen aquellos descritos en el presente documento y los conocidos en la técnica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca el uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención, en cerdos serológicamente negativos para *Mycoplasma hyopneumoniae*, de una enfermedad o trastorno causado por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende la administración a los cerdos de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 días de edad de una cantidad eficaz de una dosis única de una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La vacunación de 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 divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran determinadas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

En determinadas realizaciones, las vacunas usadas en el uso de presente invención comprenden una preparación (vacuna bacteriana) inactivada de células parciales o completas de *M. hyo* o una vacuna de células vivas modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o una preparación (vacuna bacteriana) inactivada de células parciales o

completas de *M. hyo* o una vacuna de células vivas modificada y un adyuvante.

Definiciones y abreviaturas

5 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 la *M. hyopneumoniae* se establezca por sí misma en su huésped, y aliviar los síntomas de la enfermedad o trastorno provocado por la infección por *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 ingesta de alimentos y/o crecimiento. El procedimiento de la presente invención es, por ejemplo, eficaz en la prevención o reducción de lesiones pulmonares.

10 La expresión "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 provocada por la infección por *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* puede incluir cualquier vacuna eficaz en el tratamiento o prevención de una infección en puercos por *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo*, que se puede usar en la presente invención, puede incluir, por ejemplo, una preparación de células de *M. hyo* completas o parciales, vacunas de células vivas inactivadas o modificadas, una vacuna de subunidades que presenta uno o más polipéptidos o proteínas derivados de *M. hyo*, o fragmentos inmunogénicos de tales proteínas o polipéptidos, o uno o más genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* que codifican una o más proteínas o polipéptidos derivados de *M. hyo* o fragmentos inmunogénicos de los mismos y cuyos genes o ácidos nucleicos son capaces de expresarse *in vivo* en puercos. Los polipéptidos, proteínas, fragmentos inmunogénicos de *M. hyo* de tales polipéptidos y proteínas, o genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* se pueden producir sintéticamente o de manera recombinante usando las técnicas conocidas en la técnica. Preferentemente, la vacuna de *M. hyo* usada en el procedimiento de la presente invención es una vacuna bacteriana.

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

25 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*.

El término "vacuna bacteriana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de células de *M. hyo* parciales o completas inactivada adecuada para su uso como una vacuna.

30 El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de vacuna *M. hyo* suficiente para dar lugar a una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad innata, celular y/o humoral.

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

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

35 Las vacunas bacterianas de que se pueden usar en el presente procedimiento de vacunación en dosis única se pueden obtener a partir de varias fuentes públicamente disponibles. Por ejemplo, las vacunas bacterianas de *M. hyo* se pueden preparar a partir de aislados de *M. hyo*. Los expertos en la materia conocen una gran cantidad de aislados de *M. hyo* y están disponibles a través de, por ejemplo, el American Type Culture Collection, University Boulevard 10801, Manassas, VA 20110-2209. Estos incluyen, por ejemplo: los números ATTC 25095, 25617, 25934, 27714 y 27715.

40 Los aislados de *M. hyo* se pueden obtener también directamente a partir de lesiones pulmonares porcinas infectadas de manera natural o experimental usando las técnicas conocidas.

Los aislados de *M. hyo* se pueden inactivar empleando una diversidad de procedimientos conocidos, por ejemplo, el tratamiento del aislado bacteriano con etilenimina binaria (BEI), tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.565.205 o la inactivación con, por ejemplo, formalina, calor, BPL, irradiación o glutaraldehído.

45 Las vacunas bacterianas de *M. hyo* adecuadas para su uso en el procedimiento de la presente invención se pueden obtener también a partir de varias fuentes comerciales. Tales 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 su uso en el procedimiento de la presente invención es RESPISURE y STELLAMUNE MYCOPLASMA.

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

10 Preferentemente, la cepa P-5722-3 se inactiva con BEI y se adyuva con un adyuvante disponible en el mercado, preferentemente AMPHIGEN (Hydronics, Estados Unidos). Una dosis preferida es de aproximadamente 2,0 ml. Los conservantes que se usan convencionalmente incluyen mertiolato/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Se puede añadir un vehículo, preferentemente 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

15 Las preparaciones adecuadas de vacunas usadas 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 principio activo.

20 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 grupos 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 grupos 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.

25 Las formulaciones de vacuna usadas 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 preferentemente estéril. La formulación se adecuaría al modo de administración.

30

35 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 empaquetada para su uso. Los adyuvantes adecuados pueden incluir, pero sin limitarse a estos: geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas, tales como lisolectina; glicósidos, por ejemplo, saponina y derivados de saponina, tales como Quil A o GPI-0100; tensioactivos catiónicos, por ejemplo, DDA (halogenuros de amonio de hidrocarburos cuaternarios, polioles plurónicos; polianiones e iones poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros de bloque no iónicos, por ejemplo, Pluronic F-127 (B.A.S.F., Estados Unidos); avridina y rantidina; péptidos; toxinas mutantes hábiles recombinantes, por ejemplo, leucotoxina (rmLT) 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 BayoF/Arlacel A y agua, o una emulsión de aceite vegetal, agua y un agente emulsionante, 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-hidroxisforiloxi)-etilamina; citocinas de coloesterol y combinaciones de adyuvantes. Los iones poliatómicos también pueden funcionar como agentes dispersantes, espesantes y antiaglomerantes que permiten que la vacuna se resuspenda como una suspensión monodispersa después de un período más prolongado de sedimentación. Las combinaciones de adyuvantes pueden estar presentes en formas acuosas, encapsuladas (de liberación controlada o retardada) o microencapsuladas.

40

45

50

El inmunógeno también puede incorporarse en liposomas o conjugarse con polisacáridos y/u otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna. En los casos en los que el antígeno recombinante es un hapteno, es decir, una molécula que es antigénica de forma que pueda reaccionar de manera selectiva con anticuerpos afines, pero no inmunogénicos de forma que no puedan dar lugar a una respuesta inmunitaria, el hapteno pueden unirse de manera covalente a un vehículo o molécula inmunogénica; por ejemplo, una proteína grande, tal como albúmina del suero, que conferirá inmunogenicidad al hapteno acoplado a ella. El vehículo de 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 tales proteínas y polipéptidos. Tales genes y ácidos nucleicos se pueden expresar *in vivo* y se pueden preparar usando las técnicas conocidas en la técnica.

En una realización específica, la vacuna usada en la presente invención comprende al menos un gen o ácido nucleico que codifica 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 usados en el procedimiento de la presente invención codifican 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 usados 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 usados se administran mediante los 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 usados 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 conocen en la técnica.

Los procedimientos para la preparación y administración de vacunas de ADN se conocen 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 diversidad de sistemas vectores de expresión en el huésped para expresar las secuencias de proteína antigénica de la presente invención. Tales sistemas de expresión en huésped representan los vehículos por los que las secuencias que codifican de interés se pueden producir y, por consiguiente, purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con los nucleótidos adecuados que codifican secuencias, presentar los productos de gen de *M. hyo* usados 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 infectadas 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, CCS, 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 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 pueden estar

construidos por los expertos en la materia usando la metodología bien conocida.

Dosificación y modos de administración

5 Según la presente invención, una única dosis de una cantidad eficaz de una vacuna de *M. hyo* administrada a cerdos serológicamente negativos para *Mycoplasma hyopneumoniae*, de aproximadamente 3 a 10 días de edad proporciona inmunidad eficaz contra un estímulo posterior de *M. hyo*. Preferentemente, la vacuna de *M. hyo* se administra entre aproximadamente seis y aproximadamente ocho días de edad. Lo más preferentemente, la vacuna de *M. hyo* se administra a aproximadamente siete días de edad.

10 La cantidad de una bacterina de *M. hyo* eficaz 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. Preferentemente, una bacterina de *M. hyo* que proporciona inmunidad eficaz en una única dosis contiene de aproximadamente 1×10^8 a 5×10^{10} CCU/dosis y más preferentemente de aproximadamente 5×10^8 a 5×10^{10} CCU/dosis.

15 Según 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, preferentemente de aproximadamente 1,5 ml a aproximadamente 2,5 ml y más preferentemente 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 tales proteínas o polipéptidos eficaz en el procedimiento de la presente invención es de aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 200 μ g.

20 La cantidad de una vacuna de *M. hyo* que constituye una vacuna que comprende uno o más genes o ácidos nucleicos (preferentemente de ADN) de *M. hyo* que codifican proteínas o polipéptidos inmunogénicos o fragmentos inmunogénicos de tales proteínas o polipéptidos eficaz en el procedimiento de la presente invención es de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 200 mg.

25 De acuerdo con la presente invención, se puede lograr la administración por vías conocidas, incluyendo oral, intranasal, mucosal, tópica, transdérmica y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La 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.

30 Las dosis eficaces (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 a lechones seronegativos para *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 niveles detectables de anticuerpos contra *M. hyo*.

35 **Ejemplo 1**

Preparación de una bacterina de *M. hyo*

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

40 Al final del período de crecimiento el pH del cultivo se 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 añadió 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 elevado, el BEA se transformó químicamente en BEI. Se incubó el cultivo a 37 ± 2 °C con agitación constante durante al menos 24 horas.

45 Tras la incubación de 24 horas, se añadió 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 incubó a 37 ± 2 °C con agitación constante durante 24 horas más.

Tras la inactivación, pero antes de la neutralización con tiosulfato de sodio, se tomó una muestra representativa y se

5 sometió a ensayo para la terminación de la inactivación. Se inoculó un medio fresco que contenía un 0,0026 % de rojo de fenol con un 5 a un 20 % de inóculo y se incubó a 37 ± 2 °C durante al menos una semana antes del examen del cambio de color, que es indicativo del fallo en la inactividad. Se sometió a ensayo la esterilidad de las muestras a granel en medio fluido de tioglicolato a 37 ± 2 °C y medio fluido de soja tripticasa a temperatura ambiente. El cultivo inactivado se pudo transferir a recipientes de almacenamiento estériles y se almacenó a 2-8 °C hasta que se ensambló.

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

10 Se sometió a ensayo el *M. hyo* de las muestras a granel o en recipiente final del producto acabado de cada serie o primera subserie como sigue.

La bacterina se almacenó a -50 °C en viales de 100 ml. Los viales se descongelaron y se almacenaron en subalícuotas de 15 ml a 5 ± 2 °C hasta su uso.

15 Para someter a ensayo la potencia de una serie ensamblada, se comparó una muestra de la serie con una referencia, y se determinaron las unidades de RP (potencia relativa) para la serie. Una serie o subserie debería contener preferentemente al menos 6,33 RP al comienzo del fechado y al menos 5,06 RP a lo largo del fechado.

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

Se añadió mertiolato como conservante a una concentración final que no excedía el 0,01 % (p/v).

Se añadió solución de ácido etilendiaminotetraacético al 10 % (EDTA, sal disódica o tetrasódica) como conservante a una concentración final de aproximadamente el 0,07 % (p/v).

Ejemplo 2

25 Animales

Se seleccionaron cerdos de aproximadamente una semana de edad para la vacunación. Se ensayó el estado serológico en *M. hyo* en un ensayo ELISA. Los cerdos con un valor ELISA $\leq 0,50$ se consideraron negativos en *M. hyo*. Los cerdos con un valor ELISA superior a 0,50 se consideraron serológicamente positivos en *M. hyo*.

Vacunas

30 Se usó la bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) para vacunar los cerdos. Se determinó la potencia de la vacuna antes de su uso mediante la cuantificación de antígenos relativa en comparación con una vacuna bacteriana de *M. hyo* de referencia. La vacuna de referencia (RP = 1,0) contenía aproximadamente 8.000 unidades de antígeno (aproximadamente de 1 a 2×10^8 CCU de células viables recolectadas antes de la inactivación) por dosis, determinadas mediante un ensayo inmune en fase sólida que medía la cantidad de antígeno de *M. hyo* en la vacuna.

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

Inóculo de estímulo

40 El inóculo de estímulo 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 descongeló el inóculo y después se diluyó en medio fluido *Friis Mycoplasma* para alcanzar una dilución 1:25 y se mantuvo en hielo hasta que se administró. Cada cerdo recibió 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 estímulo, se cultivó una alícuota del inóculo de pulmón para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se valoró nuevamente una segunda alícuota en cada uno de los tres días, los resultados indicaron que el inóculo contenía aproximadamente de 10^6 a 10^7 unidades de cambio de color (CCU)/ml de *M. hyo*.

45

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 según un diseño en bloques aleatorio generalizado. Los cerdos se agruparon en camadas y corrales después del destete.

- 5 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 estímulo en los días especificados en cada uno de los siguientes ejemplos. Se controló y comprobó diariamente en todos los cerdos signos clínicos de enfermedad.

- 10 En el momento especificado después del primer día de estímulo, se sacrificaron todos los cerdos y se sometieron a necropsia. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron. El examen postmortem incluyó una estimación del alcance de la patología asociada con la enfermedad respiratoria micoplasmal. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejaron las lesiones para estimar el porcentaje afectado de cada lóbulo. Se registró el grado de lesiones macroscópicas presentes.

Análisis de datos

- 15 Se evaluó la eficacia en base al porcentaje de las lesiones pulmonares típicas de una infección por *M. hyo*. Se determinaron los cerdos del grupo de tratamiento (vacunados) que presentaban un porcentaje de pulmón total con lesiones que era significativamente ($P \leq 0,05$) inferior al de los cerdos en el grupo de placebo.

Porcentaje de pulmón total con lesiones

- 20 Se ponderó la afectación macroscópica en porcentaje por cada lóbulo pulmonar usando las siguientes relaciones de lóbulos pulmonares individuales respecto 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 después a lo largo de los lóbulos para dar el porcentaje de pulmón total con lesiones (Pointon y col., 1992).

Ejemplo 3: ejemplo de referencia

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

- 30 Se llevaron a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para RESPISURE-1 en o en torno al momento de vacunación. Se determinó la potencia relativa (RP) mediante la cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presentaba una RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 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.

- 35 En el día 0 se vacunaron los cerdos del grupo de tratamiento T02 (véase la Tabla 1 a continuación) con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Se vacunaron los cerdos del grupo T01 por vía intramuscular con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de estímulo en los días 178, 179 y 180. En cada uno de los tres días se cultivó una alícuota del material de estímulo 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 estímulo 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.

- 40 Treinta días después del primer día de estímulo se sacrificaron todos los cerdos y se sometieron a necropsia. Se extrajeron y evaluaron los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación del alcance de la patología asociada con la enfermedad respiratoria micoplasmal. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejaron las lesiones para estimar el porcentaje afectado en cada lóbulo. Se registró el grado de lesiones macroscópicas presente.

45

Tabla 1

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el día 0	Estímulo el día 178 ¹	Estímulo el día 179 ¹	Estímulo el día 180 ¹
T01	Placebo	26	26	26	26	26
T02	Vacuna	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

¹Inóculo de *M. hyo* virulento.

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

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

5 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} Los 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 estímulo posterior con *M. hyo* virulento.

10 Ejemplo 4

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

15 Se llevaron a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para la vacuna en o en torno al momento de vacunación. Se determinó la RP mediante una cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presentaba una RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 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.

20 En el día 0, se vacunaron los cerdos del grupo de tratamiento T02 con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1. Se vacunaron los cerdos del grupo T01 por vía intramuscular con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de estímulo en los días 173, 174 y 175. En cada uno de los tres días, se cultivó una alícuota del material de estímulo 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 estímulo 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.

25 Veintinueve días después del primer día de estímulo se sacrificaron todos los cerdos y se sometieron a necropsia. Se extrajeron y evaluaron los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación del alcance de la patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejaron las lesiones para estimar el porcentaje afectado de cada lóbulo. Se registró el grado de lesiones macroscópicas presente.

La Tabla 3 resume el diseño experimental.

30

Tabla 3

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el día 0	Estímulo el día 173 ¹	Estímulo el día 174 ¹	Estímulo 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.

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

³El cerdo 222 falleció 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 del canal.

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

⁵NEEA para incluir los tres cerdos.

5 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 ^a	0 a 36
T02	Vacuna	20	0,3 ^b	0 a 6

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

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

Ejemplo 5

15 Se evaluó la protección contra el estímulo con *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente negativos en *M. hyo* usando una dosis única de bacterina de *M. hyo* RESPISURE-1 administrada a cerdos de 3 a 8 días de edad. Se llevaron a cabo cinco ensayos de potencia repetidos para la bacterina en o en torno al momento de vacunación. Se determinó la RP mediante una cuantificación de antígeno relativa en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que presentaba un RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 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.

20 En el día 0 se vacunaron los cerdos del grupo de tratamiento T02 con una dosis intramuscular de 2 ml de vacuna bacteriana de *M. hyo* RESPISURE-1. Se vacunaron los cerdos del grupo T01 por vía intramuscular con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml (2,5 ml por orificio nasal) de la suspensión 1:25 del inóculo de estímulo en los días 76, 77 y 78. En cada uno de los tres días se cultivó una alícuota del material de estímulo 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 estímulo 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.

25 Veintinueve días después del primer día de estímulo se sacrificaron todos los cerdos y se sometieron a necropsia. Se extrajeron y evaluaron los pulmones. El examen postmortem incluyó una estimación del alcance de la patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se examinó cada lóbulo pulmonar y se bosquejaron 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	Estímulo el día 176 ¹	Estímulo el día 177 ¹	Estímulo el día 178 ¹
T01	Placebo	26	26	23 ²	23	23
T02	Vacuna	26	26	21 ³	21	21

¹*M. hyo* virulento.

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

³Los cerdos 238, 240 y 277 dieron positivo el día-1 en neumonía por *M. hyo*. Estos lechones se retiraron del estudio el día 14 y se sacrificaron. El cerdo 260 se sacrificó 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.

5 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} Los 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, en cerdos seronegativos para *Mycoplasma hyopneumoniae*, de una enfermedad o trastorno causado por infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* para la administración a los cerdos de entre 3 y 10 días de edad, de una cantidad eficaz de una dosis única de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que la dosis única de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* contiene entre 1×10^6 y 5×10^{10} unidades de cambio de color (CCU) por dosis.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicha vacuna administrada es entre 0,5 y 3,0 ml.
- 10 4. El uso según la reivindicación 1, en el que la bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* contiene la cepa P-55722-3.
5. El uso según la reivindicación 1, en el que que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además un antígeno vírico o bacteriano distinto de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 15 6. El uso según la reivindicación 5, en el que dichos antígenos víricos 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).
7. El uso según la reivindicación 1, en el que dicha preparación de *Mycoplasma hyopneumoniae* se administra por vía intramuscular.
8. El uso según la reivindicación 1, en el que dichos cerdos están protegidos hasta 25 semanas tras la vacunación.
- 20 9. El uso según la reivindicación 1, en el que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además un adyuvante.