

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 988**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2003 E 03813041 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1506006**

54 Título: **Vacuna combinada mejorada contra Mycoplasma hyopneumoniae y virus porcinos**

30 Prioridad:

17.05.2002 US 150597

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

29.11.2013

73 Titular/es:

**ZOETIS W LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**CHU, HSIEN-JUE;
LI, WUMIN y
XU, ZHICHANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 431 988 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna combinada mejorada contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus porcinos

Esta divulgación se refiere a procedimientos mejorados para inducir inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, específicamente empleando una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada en una cantidad eficaz para inmunizar un animal receptor contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en una dosis única.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico de la neumonía micoplásmica porcina. Esta enfermedad es una causa importante de pérdida económica en la industria porcina debido al reducido aumento de peso y escasa eficiencia del pienso. La enfermedad produce una tos crónica, capa de pelo sin brillo, crecimiento retardado y mal aspecto que dura varias semanas. En animales infectados se observan lesiones características de áreas púrpuras a grises de consolidación, particularmente en los lóbulos apicales y cardíacos ventrales. Aunque la enfermedad produce poca mortalidad, los cerdos afectados son frecuentemente propensos a infecciones secundarias por patógenos oportunistas, produciendo muerte o estrés. Las pérdidas económicas solas se han estimado entre 200 y 250 millones de dólares anualmente.

Mycoplasma hyopneumoniae es una bacteria de cultivo exigente de crecimiento lento que carece de pared celular. Es frecuentemente difícil de aislar de las vías respiratorias debido a *Mycoplasma hyorhinis*, un agente secundario común también localizado en las vías respiratorias. La enfermedad se propaga por aerosol, producido por la tos, y por contacto directo de un cerdo portador afectado o convaleciente. La mezcla de animales infectados y animales no infectados produce reinfección temprana y frecuente. La infección empieza frecuentemente con infección de los cochinitos por cerdas portadoras al parir. Debido a las técnicas de gestión de las pjaras, la infección puede no ser evidente hasta después en la vida. La infección adicional normalmente se observa después del destete cuando los cerdos se reúnen. Normalmente se observa enfermedad manifiesta en cerdos a las seis semanas de edad o después. Las tasas de crecimiento y las tasas de conversión del pienso son marcadamente reducidas en animales afectados. Los tratamientos usando antibióticos son caros y requieren uso prolongado. La reinfección también es un problema. Las vacunas son actualmente el procedimiento más eficaz para evitar infecciones y sus consecuencias.

Fort Dodge Animal Health (FDAH) comercializa bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* bajo el nombre Suvaxyn® Respifend® MH para su uso como una vacuna para proteger cerdos sanos contra signos clínicos producidos por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La vacuna contiene Carbopol como adyuvante y se recomienda como vacuna de dos dosis para cerdos de al menos una semana de edad, con la segunda dosis dos a tres semanas después de la primera vacunación. Sin embargo, una vacuna de dos dosis tiene la desventaja obvia de requerir una segunda manipulación de los animales con el fin de proporcionar la protección completa contra la enfermedad.

Es, por tanto, un objetivo de esta divulgación proporcionar una vacuna eficaz contra *Mycoplasma hyopneumoniae* que provoque inmunidad protectora y prevenga la enfermedad producida por este organismo con una administración de una dosis única de vacuna.

Es otro objetivo de esta divulgación proporcionar una composición de vacuna adecuada para su uso en cerdos contra infección y enfermedad producidas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, y que pueda usarse en combinación con otras bacterinas y/o toxoides.

Es un objetivo todavía adicional de la presente divulgación prevenir o mejorar la enfermedad en la que el organismo causante es *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando una formulación de adyuvante que potencia la inmunogenicidad de la bacterina de manera que provoque inmunidad protectora después de una dosis única de la vacuna.

Otros objetivos y características de la presente invención serán evidentes de la descripción detallada expuesta en el presente documento.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición de vacuna para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus de la gripe porcina (VGP) que comprende una cantidad inmunizante de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*; una cantidad inmunizante del virus de la gripe porcina (VGP), una mezcla de adyuvantes que comprende un polímero de ácido acrílico y una mezcla de un aceite metabolizable y un copolímero de bloques de polioxi-etileno-polioxi-propileno; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición de vacuna que, después de una única administración, provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que comprende una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada combinada con la mezcla de adyuvantes anterior y un estabilizador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El adyuvante está normalmente presente en esta composición de vacuna a una concentración final de aproximadamente el

1-25% (v/v), y preferentemente aproximadamente el 5-12% (v/v). La composición también puede incluir otros componentes de vacuna, que incluyen bacterinas inactivadas o toxoides purificados de uno o más patógenos (incluyendo una o más cepas, tipos, serotipos o similares de tales patógenos), tal como *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* y antígenos víricos tales como el virus de la gripe porcina (VGP), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) y circovirus porcino (CVP), y puede administrarse por vías intramuscular, subcutánea, oral, aerosol o intranasal. En otras realizaciones de la divulgación, los otros componentes de vacuna incluirán uno o más antígenos seleccionados de VGP; *Haemophilus parasuis*; el grupo constituido por VSRRP y CVP; el grupo constituido por VGP y *Erysipelothrix rhusiopathiae*; el grupo constituido por *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. En otra realización de la invención, el VGP está seleccionado de la cepa VGP-H1N1, VGP-H1N2 y la cepa VGP-H3N2.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición de vacuna según la reivindicación 1 para proteger un animal contra enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* 02 VGP administrando una dosis única de la anterior vacuna.

En un aspecto todavía adicional, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica o vacuna para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que comprende una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada combinada con un adyuvante o mezcla de adyuvantes, individual o en mezcla, proporcionando una respuesta inmunitaria mediada por células y local (IgA secretora) a la composición o vacuna; comprendiendo otros componentes de vacuna al menos un antígeno bacteriano y/o vírico adicional; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición de vacuna que, después de una única administración, provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. En esta composición o vacuna, los otros componentes de vacuna pueden incluir bacterinas inactivadas, toxoides purificados, de uno o más patógenos (incluyendo una o más cepas, tipos, serotipos o similares de tales patógenos), tales como *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* y antígenos víricos (incluyendo una o más cepas, tipos, serotipos o similares de tales antígenos víricos) tales como virus de la gripe porcina (VGP), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) y circovirus porcino (CVP), y puede administrarse por vías intramuscular, subcutánea, oral, aerosol o intranasal.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición de vacuna para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* y un patógeno viral, composición de vacuna que comprende una cantidad inmunizante de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*; una cantidad inmunizante de al menos un antígeno vírico seleccionado del grupo constituido por virus de la gripe porcina (VGP), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) y circovirus porcino (CVP); y un sistema de adyuvantes que comprende un polímero de ácido acrílico, un aceite metabolizable y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno en forma de una emulsión de aceite en agua; composición de vacuna que después de una única administración provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En un aspecto todavía adicional, la presente divulgación proporciona composiciones de vacuna y usos para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* y al menos un patógeno viral, y opcionalmente patógenos víricos y/o bacterianos adicionales, composición (composiciones) de vacuna y procedimiento(s) que después de una única administración provocan inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se usa en el presente documento, una "bacterina" es una cosecha de bacterias que ha sido inactivada y que, en combinación con ciertos adyuvantes, puede provocar inmunidad protectora para proteger contra enfermedad o infección cuando se administra a animales.

"Adyuvante" significa una composición que comprende una o más sustancias que potencian la inmunogenicidad y eficacia de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una composición de vacuna.

Como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones, el término MHDCE designa equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La "cantidad inmunizante" es la cantidad de bacterina que proporcionará inmunidad frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*. La "cantidad inmunizante" dependerá de la especie, variedad, edad, tamaño, estado de salud y si al animal se le ha administrado previamente o no una vacuna contra el mismo organismo.

La presente invención proporciona una vacuna contra *Mycoplasma pneumoniae* que es adecuada para inmunización de dosis única. La vacuna de la presente invención incluye una mezcla de adyuvantes que potencia la inmunogenicidad de la bacterina y así proporciona una única administración para provocar inmunidad protectora.

La vacuna puede prepararse a partir de cultivos recientemente recogidos mediante procedimientos que son

convencionales en la materia (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.338.543 o la patente de EE.UU. 5.565.205, además del Ejemplo 2 más adelante). Es decir, el organismo puede propagarse en un medio de cultivo tal como medio completo PPLO (organismo similar a Pleuropneumonia) [laboratorios Difco]. El crecimiento del organismo se sigue por técnicas convencionales tales como determinar las unidades de cambio de color (UCC) y se recoge cuando se ha alcanzado un título suficientemente alto. Las disoluciones madre pueden concentrarse o liofilizarse adicionalmente mediante procedimientos convencionales antes de la inclusión en la vacuna para la formulación. Pueden emplearse otros procedimientos, tales como aquellos descritos en Thomas y col., Agri-Practice, vol. 7 nº 5, pág. 26-30.

La vacuna de la presente invención comprende la bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada combinada con la mezcla de adyuvantes y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Vehículos adecuados para su uso incluyen medios acuosos, por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, medio esencial mínimo (MEM), o tampón MEM con HEPES.

La mezcla de adyuvantes para su uso en las composiciones de vacuna de la presente invención potencia la respuesta inmunitaria y comprende una mezcla de un polímero de ácido acrílico con una mezcla de aceite metabolizable, por ejemplo, un hidrocarburo terpénico insaturado o un producto de hidrogenación del mismo, preferentemente escualano (2,3,10,15,19,23-hexametilтетраcosano) o escualeno, y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno. Un polímero de ácido acrílico tal puede ser un homopolímero o un copolímero. El polímero de ácido acrílico es preferentemente un carbómero. Los carbómeros están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial Carbopol. Los polímeros de ácido acrílico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 2.909.462 y 3.790.665, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Los copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno son tensioactivos, preferentemente tensioactivos líquidos, que ayudan en la suspensión de componentes sólidos y líquidos. Los tensioactivos están comercialmente disponibles como polímeros bajo el nombre comercial Pluronic®. El tensioactivo preferido es poloxámero 401, que está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Pluronic® L121.

La mezcla de adyuvantes inmunogénicamente estimulante está normalmente presente en la composición de vacuna de la invención en cantidades en v/v de aproximadamente el 1% al 25%, preferentemente de aproximadamente el 2% al 15%, más preferentemente de aproximadamente el 5% al 12% v/v. La cantidad de uso de mezcla de adyuvantes y la relación de los dos componentes del adyuvante puede variar dependiendo de la adición de otras bacterinas o toxoides purificados. La mezcla de adyuvantes generalmente comprende un aceite metabolizable, un polímero de ácido acrílico y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno formulado como una emulsión en un medio acuoso.

En esta mezcla de adyuvantes, el aceite metabolizable y el polímero de ácido acrílico pueden estar presentes en cantidades que oscilan de aproximadamente 10 a 150 ml/l y aproximadamente 0,5 a 10 g/l, respectivamente. En una realización preferida de la mezcla de adyuvantes, la mezcla del aceite metabolizable y el componente de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno es una mezcla de escualano y Pluronic® L121 (poloxámero 401) que puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 50 a 100 ml/l y el polímero de carboximetileno es Carbopol 934P (Carbómero 934P) que puede estar presente en cantidad de aproximadamente 2 ml/l. Normalmente, la mezcla de adyuvantes contiene aproximadamente una relación de 1:25 a 1:50 de polímero de ácido acrílico con respecto a mezcla de aceite metabolizable/ copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno.

Los polímeros de ácido acrílico preferidos son aquellos comercializados por B. F Goodrich como Carbopol 934 P NF y 941 NF que son polímeros de ácido acrílico reticulado con polialilsacarosa y que tienen la fórmula química $(CH_2CHOOH)_n$. Estos polímeros forman geles acuosos que se formulan adecuadamente con vehículos acuosos. Los copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno preferidos son los tensioactivos no iónicos comercializados por BASF como Pluronic® L121, L61, L81 o L101.

En la composición de vacuna de la presente divulgación referida a la combinación de una cantidad inmunizante de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada; otros componentes de vacuna seleccionados de antígenos bacterianos y/o víricos; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición de vacuna que, después de una única administración, provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, la composición de vacuna comprende además un adyuvante o mezcla de adyuvantes que, individual o en combinación, proporciona inmunidad mediada por células y local (IgA secretora). Estos adyuvantes pueden seleccionarse adicionalmente de adyuvantes tales como una saponina, tal como QUIL® A; citocinas tales como IL-12 y IL-18 e inmunidad local (IgA secretora); hidróxido de aluminio, un aceite metabolizable, un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y un polímero de ácido acrílico en forma de una emulsión de aceite en agua, copolímero de etileno-ácido maleico; polímero de ácido acrílico con otro adyuvante, DEAE dextrano, adyuvante derivado de la pared celular de micobacterias; y similares. Los otros componentes de vacuna en esta composición de la invención pueden incluir antígenos bacterianos, que incluyen bacterinas inactivadas o toxoides purificados, de uno o más patógenos (incluyendo una o más cepas, tipos, serotipos o similares de tales patógenos), tales como *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* y antígenos víricos (incluyendo una o más cepas, tipos, serotipos o similares de tales patógenos), tales como virus de la

gripe porcina (VGP), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) y circovirus porcino (CVP). En otras realizaciones de la divulgación, los otros componentes de vacuna incluirán uno o más antígenos seleccionados de VGP; *Haemophilus parasuis*; el grupo constituido por VSRRP y CVP; el grupo constituido por VGP y *Erysipelothrix rhusiopathiae*; el grupo constituido por *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. En otra realización de la divulgación, los otros componentes de vacuna de la invención, cuando se seleccionan de VGP, incluirán la selección de la cepa VGP-H1N1, H1N2 y la cepa VGP-H3N2.

La vacuna de la presente invención puede administrarse por vías intramuscular, subcutánea, intranasal, intraperitoneal u oral, preferentemente por vías intramuscular o subcutánea.

La vacuna de la invención generalmente comprende *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, un aceite metabolizable, un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y un polímero de ácido acrílico en forma de un emulsión de aceite en agua. La vacuna contiene preferentemente el polímero de ácido acrílico en una concentración dentro del intervalo de 0,5 a 10 g/l. La vacuna contiene preferentemente el aceite metabolizable en una concentración dentro del intervalo de 2 a 6 ml/l. La vacuna contiene preferentemente el copolímero de bloques de polioxietileno-propileno en una concentración dentro del intervalo de 1 a 3 ml/l.

Para administración de dosis unitaria, la vacuna debe contener preferentemente una cantidad de bacterina de *Mycoplasma pneumoniae* correspondiente a aproximadamente 1×10^8 a 3×10^{11} MHDCE/ml, preferentemente aproximadamente 1×10^8 a 3×10^9 MHDCE/ml. Aproximadamente uno a cinco ml, preferentemente 2 ml, pueden administrarse por animal, intramuscularmente, subcutáneamente o intraperitonealmente. Uno a diez ml, preferentemente 2 a 5 ml, pueden administrarse por vía oral o intranasalmente.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la invención sin limitar su alcance.

EJEMPLO 1

BACTERINA DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE VACUNA

DESCRIPCIÓN DE CEPAS VÍRICAS. Puede obtenerse *Mycoplasma hyopneumoniae* de muchísimas fuentes fácilmente disponibles. En una realización puede usarse la cepa P-5722-3 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. El cultivo se obtuvo de C. Armstrong, Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana. Tras la recepción del cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, se pasó siete veces en caldo de *Mycoplasma hyopneumoniae* para establecer la siembra maestra.

CULTIVO CELULAR. Se cultivó *Mycoplasma hyopneumoniae* en un medio que comprendía polvo Bacto PPLO, extracto de levadura, glucosa, clorhidrato de L-cisteína, ampicilina, acetato de talio, rojo de fenol, antiespumante, suero porcino estéril normal y agua durante periodos que oscilan de 18-144 horas. Para la inactivación se añade etilenimina binaria (BEI) dirigida al cultivo de producción dentro del recipiente de fermentación. El pH se ajusta a 7,4, y luego se recoge según procedimientos convencionales para proporcionar bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE VACUNA

Composición de conservantes y proporciones usadas. La bacterina recogida se conserva mediante la adición de timerosal y sal tetrasódica de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) a no más del 0,01% y 0,07%, respectivamente. Ampicilina U.S.P. está presente en el medio de crecimiento a 0,250 gramos/litro. La concentración de ampicilina residual variará en el producto final dependiendo del volumen de fluidos recogidos, no superando la concentración de ampicilina residual en el producto completado 30 ug/ml.

NORMALIZACIÓN DEL PRODUCTO. El concentrado de *Mycoplasma* es cuantifica por un ensayo fluorimétrico de ADN.

Una mezcla de un aceite metabolizable que comprende uno o más hidrocarburos terpénicos y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, por ejemplo, una mezcla de escualano/Pluronic L121, se prepara disolviendo 10 g de cloruro sódico, 0,25 g de cloruro de potasio, 2,72 fosfato de sodio dibásico, 0,25 fosfato de potasio monobásico, 20 ml de Pluronic L121 (BASF Corporation), 40 ml de escualano (Kodak), 3,2 ml de Tween 80 en 900 ml de agua purificada, c.s.p. hasta 1000 ml. Después de mezclar, los componentes pueden esterilizarse en autoclave. La mezcla se homogeneiza entonces hasta que se forma una emulsión estable. Puede añadirse formalina hasta una concentración final del 0,2% o puede añadirse timerosal a una concentración final de 1:10.000.

ENSAMBLAJE DE UNIDADES PARA PREPARAR UNA SERIE Concentrados de *Mycoplasma hyopneumoniae* satisfactorios se combinan asépticamente con los adyuvantes, conservante y diluyente en un recipiente estéril equipado con un agitador y se mezclan durante no menos de 30 minutos.

Cantidades para 1.000.000 dosis (2 ml cada una): % en vol/vol

Concentrado de <i>Mycoplasma</i> (>1,0 x10 ¹⁰ MHDCE/ml)	400.000 ml	20,0
Mezcla de escualano/Pluronic L121	100.000 ml	5,0
Carbopol (2% en peso/volumen en agua)	200.000 ml	10,0
Disolución de timerosal al 1% peso/volumen en agua y EDTA (sal tetrasódica) al 7% en peso/volumen	18.000 ml	0,9
Solución salina estéril	1.282.000 ml	64,1

El pH de la serie se ajusta a 7,0 ± 0,2.

MHDCE = Equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*

PROCEDIMIENTO Y TÉCNICA DE ENVASADO Y CIERRE DE LOS RECIPIENTES FINALES

5 El producto puede filtrarse de forma gruesa a través de un elemento de filtro estéril de 200-500 micrómetros y envasarse en condiciones especificadas en 9 CFR 114.6 en recipientes finales estériles en una habitación designada para operaciones de envasado. Los recipientes de vidrio o de plástico se cierran con un tapón de goma y se cierran por encapsulado con cápsulas de aluminio. Cada dosis de 2,0 ml contendrá no menos de 2 x 10⁹ equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

10 **PRUEBA DE POTENCIA.** Las muestras a granel o en el recipiente final del producto completado pueden probarse para ver su potencia del siguiente modo:

Procedimiento de ensayo para la prueba de potencia: se usan ratones hembra ICR, seis a siete semanas de edad, de un envío, de Harlan Sprague Dawley u otros proveedores aceptables. Se requiere un mínimo de 20 ratones para inmunización con cada bacterina desconocida y de referencia. Se guarda un mínimo de cinco ratones como controles no inoculados. Las bacterinas de prueba y de referencia se mezclan individualmente minuciosamente. Se usan jeringuillas desechables estériles acopladas a agujas de 25 de calibre por 5/8 de pulgada para inocular los ratones subcutáneamente en la región inguinal con 1/10 de una dosis de un animal huésped (0,2 ml). Cada grupo de ratones se aloja como unidad individual y se permite el acceso libre a comida y agua durante 14 días. Entonces se anestesia cada ratón. El ratón anestesiado se coloca sobre su lomo. Usando una mano, la cabeza se sostuvo hacia abajo y se extendió una pata delantera hacia fuera del cuerpo. Usando un escalpelo se hace una incisión en la piel de aproximadamente ½ pulgada de longitud entre la pata delantera extendida y el tórax, cortando la arteria braquial. Usando una jeringuilla de 3,0 ml, sin aguja, se recoge la sangre que se reúne en la incisión. La sangre se descarga en un tubo de ensayo marcado y se deja coagular. Los tubos coagulados se centrifugan a 1.000 x g para separar el suero del coágulo. Los sueros individuales se guardan a -20 °C o más fríos hasta que se prueban.

25 **PRUEBA SEROLÓGICA:** Se usa un procedimiento de ELISA para medir la respuesta de anticuerpos de ratones a las bacterinas de referencia y/o desconocidas. El procedimiento de ELISA se realiza usando placas de microtitulación de fondo plano desechables Immulon II de Dynatech o equivalentes y un lector de placas de ELISA.

REACTIVOS DE PRUEBA:

Solución salina tamponada con fosfato-Tween (PBST) (pH ajustado a 7,2 a 7,4 con NaOH 5 N o HCl 5 N).

Cantidad por litro	
<u>Componentes</u>	<u>Litro</u>
NaCl	8,50 gramos
NaH ₂ PO ₄	0,22 gramos
Na ₂ HPO ₄	1,19 gramos

30

(continuación)

Tween-20	0,50 ml
----------	---------

ES 2 431 988 T3

Agua desionizada c.s.p.	1.000,00 ml
-------------------------	-------------

Solución salina tamponada con glicina (GBS) (pH ajustado a 9,5 a 9,7 con NaOH 5 N o HCl 5 N).

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Glicina	0,75 gramos
NaCl	8,50 gramos
Agua desionizada c.s.p.	1.000,00 ml

5 Suero de control positivo: El suero de control positivo es un conjunto de sueros de ratones vacunados con bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Conjugado y sustrato:

Se obtiene conjugado marcado con peroxidasa de anti-IgG de ratón, purificado por afinidad, de Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc. (Nº de catálogo 074-1802). El procedimiento para determinar la dilución óptima de conjugado se detalla más adelante. Las disoluciones de sustrato de peroxidasa (ABTS) se obtienen de Kirkegaard y Perry, Inc.

10 Valoración del conjugado: Una placa de fondo plano Immulon II se recubre con 100 μ l por pocillo de 20 μ g por ml de antígeno de células completas de *Mycoplasma hyopneumoniae* diluido en GBS 10 mM. La placa se incuba durante no menos de una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se transfiere a $2-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante no menos de 18 horas y no más de una semana. Antes de usar la placa se lava tres veces con PBST, con un tiempo de remojo de un minuto entre cada lavado, y se drena para secarla. Se prepara una dilución 1:40 en PBST del suero de control positivo, y el suero positivo diluido (100 μ l/pocillo) se
15 añade a la mitad de los pocillos en la placa. Se añade PBST a la otra mitad de los pocillos. La placa se incuba durante una hora a temperatura ambiente, después de lo cual la placa se lava tres veces. El suero conjugado se diluye en serie con PBST dos veces, empezando con una dilución de 1:100 y terminando con una dilución de 1:10.240. Se añaden 100 μ l de cada dilución de conjugado a cuatro pocillos del suero positivo y cuatro pocillos de PBST, y se deja reaccionar durante media hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan cuatro veces, y se añaden 100 μ l de la disolución de sustrato de peroxidasa (abts) por pocillo. La placa se lee a un parámetro de longitud de onda dual de $T\lambda = 450$. Se elige una dilución
20 de conjugado que da una lectura de 0,850 a 1,050 para el suero de control positivo cuando el valor del control de PBST se resta del valor del suero de control positivo.

Antígeno de prueba:

25 El antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una preparación de células completas, y se suministra por Fort Dodge Animal Health.

El ELISA se realiza del siguiente modo: se usan placas de microtitulación de fondo plano Immulon II de Dynatech. Un vial de antígeno de células completas de *Mycoplasma hyopneumoniae* liofilizado se reconstituye a diez ml con solución salina tamponada con glicina (GBS). La concentración de la proteína de *Mycoplasma* reconstituida es 20 μ g/ml. Entonces se añaden 100 μ l (2 μ g) de antígeno diluido a todos los pocillos de una placa. La placa se incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante no
30 menos de una hora y luego se transfiere a $2-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 18 horas y un máximo de una semana. Las placas se lavan tres veces con PBST, dejando en remojo un minuto entre cada lavado, y luego se secan por drenado. Los sueros se diluyen 1:40 en PBST. El suero de control positivo se incluirá por cuadruplicado en cada placa. El volumen de muestra por pocillo es 100 μ l. Las muestras de suero de prueba en serie y las muestras de suero de referencia se probarán por duplicado en la misma placa. Las placas se incuban durante una hora a temperatura ambiente y se lavan
35 tres veces con PBST. Se añaden 100 μ l de conjugado marcado con peroxidasa de anti-IgG de ratón (Kirkegaard and Perry), diluido en PBST, a todos los pocillos, y los pocillos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavan cuatro veces con PBST. Se añaden 100 μ l de una disolución de sustrato de peroxidasa (ABTS) a todos los pocillos y las placas se incuban hasta que el control de suero positivo alcance una DO_{405} (450) de 0,850 a 1,050 cuando la máquina se referencia contra los pocillos de control de PBST. Las placas se leen, y se referencian contra los
40 pocillos de PBST. Para ser una prueba válida, los sueros de ratones inoculados con la bacterina de referencia deben producir un valor promedio mínimo de 0,500, y los sueros de los ratones de control no vacunados deben no superar el valor promedio máximo de 0,100. O, la diferencia entre el valor promedio de los sueros de ratones inoculados con la bacteriana de referencia y los sueros de los ratones de control no vacunados debe ser superior a o igual a 0,400.

45 Los valores medios para los vacunados en serie, los vacunados de referencia y los controles se calculan y se evalúan del siguiente modo: Para considerarse satisfactoria, la bacterina de prueba debe demostrar un valor de densidad óptica media

promedio igual a, o superior a, la referencia. O, usando una prueba de la t de Student unilateral, la bacterina de prueba no debe ser significativamente (nivel de confianza $p \leq 0,05$) inferior a la bacterina de referencia. Cualquier valor de t calculado igual a, o superior a, 1,686 indicará una diferencia significativa entre la bacterina de referencia y de prueba, y hará que sea rechazada la bacterina de prueba. Cualquier valor de t calculado inferior a 1,686 indicará una serie satisfactoria. Cualquier bacterina de prueba determinada por la prueba que es poco satisfactoria por cualquier motivo no relacionado con la eficacia del producto se vuelve a probar, y la prueba inicial se considera no válida.

EJEMPLO 2

VACUNA DE PRUEBA:

La vacuna a probar se preparó según los procedimientos detallados en el Ejemplo 1 usando 5% de una mezcla de un aceite metabolizable que comprende uno o más hidrocarburos terpénicos y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxiopropileno (mezcla de escualano/Pluronic L121) y 0,2% de polímero de ácido acrílico (Carbopol) como adyuvante, y 2×10^9 equivalentes celulares de ADN de *M. hyopneumoniae* (MHDCE) por dosis.

EJEMPLO 3

Este estudio se diseñó para demostrar la duración de inmunidad (DOI) de cuatro meses en cerdos inducidos por vacunación de una dosis de la vacuna del Ejemplo 2 a una edad de tres semanas.

Se llevaron a cabo dos ensayos con animales separados para este estudio. Todos los cerdos en ambos ensayos fueron seronegativos (título de anticuerpos < 10) en el momento de la vacunación, lo que indica que los animales eran sensibles a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Todos los cerdos en los grupos de control permanecieron seronegativos antes de la provocación. Esto indica que la respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados era debida a la vacuna y no a cualquier exposición medioambiental.

En el primer ensayo, una vacuna del Ejemplo 2 se evaluó junto con un producto comercialmente disponible, Ingelvac M. hyo® fabricado por Boehringer Ingelheim (BI), mediante un alto nivel de provocación virulenta con *M. hyopneumoniae* (4×10^6 organismos). Se vacunaron veintidós (22) cerdos a la edad de 18-21 días con la vacuna del Ejemplo 2 intramuscularmente (IM) y ocho (8) cerdos con Ingelvac M. hyo® [serie 271 032]. Veintidós (22) cerdos sirvieron de controles de la provocación y 10 cerdos de controles de no provocación. Los cerdos de los grupos de control vacunados y de provocación se provocaron con *M. hyopneumoniae* virulenta cuatro meses después de la vacunación. Los cerdos vacunados con la vacuna del Ejemplo 2 tuvieron lesiones pulmonares promedio del 15,9% y los cerdos de control provocados tuvieron lesiones pulmonares promedio del 19,6%. Las lesiones pulmonares promedio en el grupo vacunado con la vacuna del Ejemplo 2 fueron inferiores a las de los controles aún cuando los cerdos se hubieran provocado con una dosis mayor a la recomendada por la Universidad del Estado de Iowa (ISU), sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p=0,19$). Asimismo, cuando el producto comercial, Ingelvac M. hyo® se evaluó en el mismo grupo de animales con la misma dosis de provocación, también se observó un nivel similar de lesiones pulmonares (14,6%). Tampoco hubo diferencia significativa entre el grupo vacunado con Ingelvac M. hyo® y el grupo de control ($p=0,27$) y entre el grupo vacunado con Ingelvac M. hyo® y el grupo vacunado con la vacuna del Ejemplo 2.

En el segundo ensayo, una vacuna del Ejemplo 2 se evaluó por provocación con *M. hyopneumoniae* virulenta al nivel sugerido por la ISU ($1,0 \times 10^6$ organismos) cuatro meses después de la vacunación. Se vacunaron veintitrés (23) cerdos con una dosis de la vacuna a la edad de 21 días, 25 cerdos sirvieron de controles de la provocación y 7 cerdos de controles de no provocación. Los cerdos en los grupos de control vacunados y de provocación se provocaron con *M. hyopneumoniae* virulenta cuatro meses después de la vacunación. El grupo de control tuvo lesiones pulmonares promedio del 10,4% y el grupo vacunado tuvo lesión pulmonar promedio del 5,5%. Hubo una diferencia significativa entre el grupo vacunado y el grupo de control ($p=0,031$). Esto indica que la vacuna del Ejemplo 2 es eficaz en estimular la inmunidad protectora, que puede durar al menos cuatro meses después de una vacunación de dosis única en cerdos a la edad de tres semanas.

Cuando los datos relacionados con la vacuna del Ejemplo 2 en los dos ensayos se combinaron y analizaron, las lesiones pulmonares promedio del grupo vacunado fueron significativamente menores que las del grupo de control.

En conclusión, la vacuna del Ejemplo 2 induce inmunidad protectora contra la provocación con *M. hyopneumoniae* virulenta cuatro meses después de la vacunación de una dosis en cerdos a la edad de tres semanas.

DATOS EXPERIMENTALES

Se realizaron dos ensayos separados en este estudio. En el ensayo uno, sesenta y siete (67) cerdos se asignaron a cuatro grupos usando el programa de aleatorización Microsoft Excel. Se vacunaron veinticuatro (24) cerdos con una dosis de una vacuna preparada según el Ejemplo 2 intramuscularmente (IM) a la edad de 18-21 días. Veinticuatro (24) cerdos sirvieron de controles de la provocación y 10 cerdos de controles de no provocación. Nueve cerdos se vacunaron IM con el producto comercial, Ingelvac M. hyo® [serie 271 032, fabricado por Boehringer Ingelheim (BI)], según instrucción de la etiqueta. Cinco cerdos (dos cerdos vacunados con la vacuna del Ejemplo 2, uno con la vacuna de BI y dos controles) murieron durante el periodo de retención de la vacunación debido a motivos no relacionados con la vacunación. Los cerdos restantes en los grupos vacunados y el grupo de control de la provocación se provocaron con 14 ml de *M. hyopneumoniae* virulenta ($1,4 \times 10^6$ organismos) cuatro meses después de la vacunación. Los cerdos en los cuatro grupos se sacrificaron 30 días después de la provocación y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo en el ensayo.

En un segundo ensayo, veinticinco (25) cerdos se vacunaron IM con una dosis de una vacuna preparada según el Ejemplo 2 a la edad de 21 días. Veinticinco (25) cerdos sirvieron de controles de la provocación y 10 cerdos de controles de no provocación. Dos cerdos murieron debido a motivos no relacionados con la vacunación y un cerdo se vendió erróneamente durante el periodo de retención de la vacunación. Los cerdos restantes en los grupos de control vacunados y de provocación se expusieron a 10 ml de *M. hyopneumoniae* virulenta ($1,0 \times 10^6$ organismos) cuatro meses después de la vacunación. Dos cerdos murieron durante el periodo de observación después de la provocación debido a motivos no relacionados con la vacunación/provocación. Los cerdos restantes en los tres grupos se sacrificaron 30 días después de la provocación y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo en el ensayo.

Vacunación:

A cada cerdo en los grupos de vacunación se le administró una dosis de 2 ml de las vacunas de prueba IM en el costado del cuello.

Provocación y autopsia:

La disolución madre de provocación de *M. hyopneumoniae* virulenta, un homogeneizado de pulmón congelado (-70 °C), se preparó por la Dra. Eileen Thacker de la Universidad del Estado de Iowa (ISU). Se confirmó que la disolución madre de provocación era pura y que contenía aproximadamente 10^7 organismos de *M. hyopneumoniae* por ml. La dosis de provocación recomendada es 10 ml de un lote diluido 1:100 (es decir, $1,0 \times 10^6$ organismos).

Los cerdos en los grupos de control vacunados y de provocación en el primer ensayo se provocaron con 14 ml de disolución madre diluida 1:100 (es decir, $1,4 \times 10^6$ organismos). Los cerdos en el segundo ensayo se provocaron con 10 ml de disolución madre diluida 1:100 (es decir, $1,0 \times 10^6$ organismos) como se recomienda.

El día de la provocación, el homogeneizado se descongeló rápidamente bajo agua caliente y se diluyó según recomendaciones de la ISU usando medio de crecimiento de *M. hyopneumoniae* estéril. Los cerdos se sedaron con una mezcla de Xilazine-Ketamine-Telazol™ constituida por 50 mg/ml de xilazina, 50 mg/ml de ketamina y 100 mg/ml de Telazol. La mezcla anestésica se administró IM a 0,01 - 0,02 ml/lb de peso corporal. A cada cerdo se administró una dosis única de 14 ml (primer ensayo) o 10 ml (segundo ensayo) del material de provocación, intratraquealmente. Para garantizar que la colocación de la aguja fuera correcta, se aspiró aire en la jeringuilla antes de la administración de la dosis de provocación. Los cerdos de control no expuestos no vacunados se mantuvieron en habitaciones separadas y no se expusieron.

30 días después de la provocación (DDP), todos los cerdos se sacrificaron. Los pulmones se extrajeron y las lesiones pulmonares macroscópicas se puntuaron por un individuo sin conocimiento de los grupos de prueba.

Recogida de muestras y prueba:

Se recogieron muestras de sangre de todos los cerdos en el día de la vacunación (0 DDV), un mes después de la vacunación (1 MPV), 4 MPV/0 DDP y 30 DDP para anticuerpos del suero contra *M. hyopneumoniae* como se detectó mediante un kit de ELISA competitivo (preparado por DAKO Co.). Las muestras de suero se guardaron a -20 °C antes de probarse.

Análisis de datos:

Las puntuaciones de las lesiones pulmonares se compararon entre grupos vacunados y no vacunados por análisis de la varianza (ANOVA). Las puntuaciones de pulmón se transformaron por arc sen para mejorar la distribución de los errores residuales.

50

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serología: Todos los cerdos en ambos ensayos se probaron para anticuerpos del suero contra *M. hyopneumoniae* por un kit de ELISA competitivo comercial usando una dilución del suero 1:10 para todas las pruebas. Todos los cerdos fueron seronegativos (título de anticuerpos < 10) en el momento de la vacunación, que indica que los animales eran susceptibles a *M. hyopneumoniae*. Todos los cerdos en los grupos de control permanecieron seronegativos antes de la provocación. Esto indica que la respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados fue debida a la vacuna y no a cualquier provocación medioambiental. Todos los cerdos en los grupos vacunados y la mayoría de los cerdos en los grupos de control de la provocación (18 de los 22 cerdos en el ensayo uno y 15 de los 25 en el ensayo dos) se seroconvirtieron a *M. hyopneumoniae* después de la provocación, mientras que todos los animales no provocados siguieron siendo seronegativos. Esto implica que la provocación fue específica para *M. hyopneumoniae*. El estado serológico de los animales de prueba se resume en la Tabla 1.

Prueba de inmunogenicidad en el primer ensayo:

El primer ensayo se realizó para determinar si la vacuna del Ejemplo 2 podría estimular la fuerte inmunidad que podría proteger contra un mayor nivel de provocación que la recomendada por la ISU cuatro meses después de la vacunación. Este ensayo también comparó una vacuna del Ejemplo 2 con la comercialmente disponible, Ingelvac M. hyo®, en lo relativo a su capacidad para estimular inmunidad protectora cuatro meses después de la vacunación.

Veintidós cerdos vacunados con FDAH Suvaxyn MH-One y ocho cerdos con un producto patentado, Ingelvac M. hyo® serie 271.032, se provocaron con $1,4 \times 10^6$ organismos por cerdo del material de provocación (se recomendaron $1,0 \times 10^6$ organismos por cerdo por la ISU, véase la Sección 5.5). Veintidós cerdos sirvieron de controles de la provocación y 10 cerdos de controles de no provocación. Los porcentajes de las lesiones pulmonares se resumen en la Tabla 2. Los cerdos vacunados con la vacuna del Ejemplo 2 tuvieron lesiones pulmonares promedio del 15,9% y los cerdos de control provocados tuvieron lesiones pulmonares promedio del 19,6%. Las lesiones pulmonares en el grupo vacunado con la vacuna del Ejemplo 2 fueron inferiores a las de control incluso cuando los cerdos se provocaron con una mayor dosis de *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p=0,19$). Asimismo, cuando un producto comercialmente disponible, Ingelvac M. hyo®, se evaluó en el mismo grupo de animales con la misma dosis de provocación, también se obtuvo un nivel similar de las lesiones pulmonares (14,6%). No hubo diferencia significativa entre el grupo vacunado con Ingelvac M. hyo® y el grupo de control ($p=0,27$) y entre el grupo vacunado con Ingelvac M. hyo® y el grupo vacunado con la vacuna del Ejemplo 2 ($p=0,88$).

Aunque se registró una reducción numérica no significativa en las lesiones en el grupo que recibió la vacuna del Ejemplo 2, los datos obtenidos en este ensayo sugieren que la mayor dosis de provocación ($1,4 \times 10^6$ organismos) usada en este ensayo fue probablemente arrolladora, incluso para la inmunidad de los cerdos estimulados por el producto comercial Ingelvac. Este nivel de provocación es probablemente no apropiado para la evaluación del estudio de vacunación/provocación usando tamaños de grupos de 20-25 animales, aunque con tamaños de grupos mayores es posible que la significancia pudiera demostrarse.

Prueba de inmunogenicidad en el segundo ensayo:

Los cerdos en los grupos de control vacunados y de provocación en el ensayo dos se evaluaron con la dosis de provocación ($1,0 \times 10^6$ organismos) como se recomienda por la ISU cuatro meses después de la vacunación para demostrar DOI de cuatro meses. Los porcentajes de lesión pulmonar se resumen en la Tabla 3. El grupo de control tuvo una lesión pulmonar promedio del 10,4%. El grupo vacunado tuvo la lesión pulmonar promedio del 5,5%. Hay una diferencia significativa entre los grupos vacunados y de control ($p=0,031$). Esto indica que la vacuna del Ejemplo 2 es eficaz en estimular inmunidad protectora, que puede durar al menos cuatro meses después de una vacunación de dosis única en cerdos a la edad de tres semanas.

Evaluación de los resultados combinados de ambos ensayos:

Aunque los dos ensayos fueron significativamente diferentes, el efecto del ensayo sobre el grupo no fue significativo. La magnitud del efecto del grupo fue similar entre los dos ensayos. Así, el efecto del grupo podría evaluarse sin considerar el ensayo. Como el análisis del modelo completo mostró que la interacción entre grupo y ensayo no era significativa, esto respalda la noción de que el efecto del grupo era el mismo en ambos ensayos y justifica la combinación de los datos de los dos ensayos en un único análisis. Como tal, cuando los datos relacionados con la vacuna del Ejemplo 2 de los dos ensayos se combinaron y la variable transformada con el arc sen para la lesión pulmonar se analizó con grupo y ensayo como variables independientes (modelo reducido), el grupo es estadísticamente significativo ($p=0,013$).

TABLA 1: Resumen del estado serológico para *M. hyopneumoniae* en cerdos de control y vacunados

<u>Ensayo uno</u>				
<u>Positivo/negativo (1:10) en</u>				
<u>Grupo</u>	<u>Número de cerdos</u>	<u>0 DDV</u>	<u>-1DDP</u>	<u>30DDP</u>
Vacuna de FDAH	22	0/22	0/22	22/22
Vacuna de BI	8	0/8	4/8	8/8
Control de la provocación	22	0/22	0/22	18/22
Control de no provocación	10	0/10	0/10	0/10
<u>Ensayo dos</u>				
<u>Positivo/negativo (1:10) en</u>				
<u>Grupo</u>	<u>Número de cerdos</u>	<u>0 DDV</u>	<u>-3DDP</u>	<u>30DDP</u>
Vacuna de FDAH	23	0/23	6/23	23/23
Control	25	0/25	0/25	14/25
Control de no provocación	7	0/7	0/7	0/7

TABLA 2: Resumen de los porcentajes de lesión pulmonar en el ensayo uno (sobredosis)*

Grupo	Número de cerdos	Porcentajes promedio de lesión pulmonar	Valor de p
Vacuna de FDAH	22	15,90%	0,19**
Vacuna de BI	8	14,60%	0,27***
Control	22	19,60%	
Control de no provocación	10	0%	0,88****

* Los cerdos se provocaron con $1,4 \times 10^6$ organismos por cerdo (dosis recomendada por la ISU $1,0 \times 10^6$ organismos por cerdo)

** comparación entre el grupo de vacuna de FDAH y el grupo de control

*** comparación entre el grupo de vacuna de BI y el grupo de control

**** comparación entre el grupo de vacuna de BI y el grupo de vacuna de FDAH

5

TABLA 3: Resumen de porcentajes de lesión pulmonar en el ensayo dos (dosis recomendada)

Grupo	Número de cerdos	Porcentajes promedio de lesión pulmonar	Valor de p
Vacuna de FDAH	23	5,50%	0,031**
Control	25	10,40%	
Control de no provocación	7	0,77%	

* Los cerdos se provocaron con la dosis recomendada por ISU ($1,0 \times 10^6$ organismos por cerdo)

** comparación entre el grupo de vacuna de FDAH y el grupo de control

Ejemplo 4**Evaluación de la inmunidad a largo plazo inducida por una composición de vacuna de la invención contra una provocación virulenta seis meses después de una administración de dosis única**

5 Se preparó la vacuna de prueba A usando esencialmente los mismos procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2 y empleando las cantidades mostradas a continuación.

Vacuna de prueba A

Cantidades para 1.000.000 dosis (2 ml cada una):	% en vol/vol	
Concentrado de <i>Mycoplasma</i> (>1,0 x 10 ¹⁰ MHDCE/ml)	1200.000 ml	60,0
Mezcla de escualano/Pluronic L121	200.000 ml	10,0
Carbopol (2% en peso/volumen en agua)	200.000 ml	10,0
Disolución de timerosal al 1% en peso/volumen en agua y EDTA (sal tetrasódica) al 7% en peso/volumen	18.000 ml	0,9
Solución salina estéril	382.000 ml	19,1

El pH de la serie se ajusta a 7,0 ± 0,2.

MHDCE = Equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*

10 RESUMEN

En esta evaluación se enrolaron treinta y tres cerdos de 21 días. Veinte cerdos se vacunaron con una dosis de vacuna A intramuscularmente (IM) a la edad de tres semanas. Diez cerdos sirvieron de controles no vacunados y tres cerdos de controles medioambientales de no provocación.

15 Todos los cerdos fueron seronegativos (título de anticuerpos <10) en el momento de la vacunación, lo que indica que los animales eran sensibles a *M. hyopneumoniae*. Todos los cerdos en los grupos de control siguieron siendo seronegativos antes de la provocación. Esto indica que la respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados fue debida a la vacuna y no a cualquier exposición medioambiental.

20 Seis meses tras la vacunación, 20 cerdos vacunados y 10 cerdos de control no vacunados se provocaron con *M. hyopneumoniae* virulenta (1,0 x10⁶ organismos por cerdo). Tres cerdos sirvieron de controles no expuestos. Los cerdos vacunados tuvieron una puntuación de lesión pulmonar promedio del 3,6% y los cerdos de control expuestos tuvieron una puntuación de lesión pulmonar promedio del 14,6%. Las lesiones pulmonares en el grupo vacunado fueron significativamente inferiores a las de los controles (p=0,0215).

Los datos obtenidos en esta evaluación demuestran que la vacuna de prueba A indujo inmunidad protectora a largo plazo contra la provocación con *M. hyopneumoniae* virulenta seis meses después de una vacunación de dosis única.

25 Diseño experimental

30 Treinta y tres cerdos de 21 días se asignaron aleatoriamente a tres grupos (grupo vacunado, grupo de control de la provocación y grupo de control medioambiental de no provocación) usando el programa de aleatorización Microsoft Excel por camada. Veinte cerdos se vacunaron con una dosis de vacuna de prueba A intramuscularmente a la edad de tres semanas. Diez cerdos sirvieron de controles de la provocación y tres cerdos de controles medioambientales de no provocación. Los cerdos en el grupo vacunado y los controles de la provocación se provocaron con 10 ml de un cultivo de *M. hyopneumoniae* (1,0 x10⁶ organismos) virulenta por cerdo seis meses después de la vacunación. Tres cerdos no vacunados se usaron como controles de no provocación. Los cerdos provocados y los controles de no provocación se sacrificaron 26 días después de la provocación y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo.

35 Cada cerdo en los grupos de vacunación se administró con una dosis de 2 ml de la vacuna de prueba IM en el costado del cuello.

Provocación y autopsia

La disolución madre de provocación de *M. hyopneumoniae* virulenta, un homogeneizado de pulmón congelado (≤-70 °C), se preparó por la Dra. Eileen Thacker de la Universidad del Estado de Iowa (ISU). Se confirmó que la disolución madre de

provocación era pura y que contenía aproximadamente 10^7 organismos de *M. hyopneumoniae* por ml.

Los cerdos se provocaron con 10 ml de una dilución 1:100 de la disolución madre (es decir, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ organismos).

5 El día de la provocación, el homogeneizado se descongeló rápidamente bajo agua caliente y se diluyó según recomendaciones de la ISU usando medio de crecimiento de *M. hyopneumoniae* estéril. Los cerdos se sedaron con una mezcla de Xilazine-Ketamine-Telazol™ constituida por 50 mg/ml de xilazina, 50 mg/ml de ketamina y 100 mg/ml de Telazol. La mezcla anestésica se administró IM a 0,01 - 0,02 ml/lb de peso corporal. A cada cerdo se administró una dosis única de 10 ml del material de provocación ($1,0 \times 10^6$ organismos), intratraquealmente. Para garantizar que la colocación de la aguja fuera correcta, se aspiró aire en la jeringuilla antes de la administración de la dosis de provocación. Los cerdos de control no expuestos no vacunados se mantuvieron en habitaciones separadas y no se provocaron.

26 días después de la provocación (DDP), todos los cerdos se sacrificaron. Los pulmones se extrajeron y las lesiones pulmonares macroscópicas se puntuaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Recogida de muestras y prueba

15 Se recogieron muestras de sangre de todos los cerdos en el día de la vacunación (0 DDV), 35 DDV, -1 DDP y 26 DDP para la determinación de anticuerpos del suero contra *M. hyopneumoniae* como se detectó mediante un kit de ELISA competitivo (preparado por DAKO Co.). Las muestras de suero se guardaron a ≤ -20 °C antes de probarse.

Análisis de datos

20 Las puntuaciones de las lesiones pulmonares se compararon entre vacunados y controles por ANOVA unilateral. Las puntuaciones de lesión pulmonar se transformaron por arc sen para mejorar la distribución de los errores residuales. Como la suposición de normalidad para las puntuaciones de lesión pulmonar fue cuestionable, tanto las puntuaciones de lesión pulmonar como las puntuaciones de lesión pulmonar transformadas por arc sen se analizaron por la prueba del orden de Wilcoxon. El nivel de significancia se fijó a $p < 0,05$. Los resultados de la prueba del orden de Wilcoxon no paramétrica se usaron para fines informativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serología

25 Todos los cerdos se probaron para anticuerpos del suero contra *M. hyopneumoniae* por un kit de ELISA competitivo comercial usando una dilución del suero 1:10 para todas las pruebas. Las muestras con resultado de prueba sospechoso por instrucciones del kit se trataron como positivas en el análisis de datos. Todos los cerdos eran seronegativos (título de anticuerpos < 10) en el momento de la vacunación, lo que indica que los animales eran sensibles a *M. hyopneumoniae*.
30 Todos los cerdos en los grupos de control permanecieron seronegativos antes de la provocación. Después de la vacunación, quince de veinte vacunados (15/20) se convirtieron en seropositivos a *M. hyopneumoniae* al menos una vez (muestras recogidas 35 DDV y -1 DDP). Esto indica que la respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados fue debida a la vacuna y no a cualquier exposición medioambiental. Todos los cerdos vacunados y cuatro de diez cerdos en el grupo de control de la provocación se convirtieron en seropositivos a *M. hyopneumoniae* después de la provocación, mientras que todos los animales no provocados siguieron siendo seronegativos. El estado serológico de los animales de prueba se resume en la Tabla 4.

Puntuaciones de la lesión pulmonar

40 Veinte cerdos vacunados con la vacuna de prueba A y diez cerdos de control no vacunados se provocaron con *M. hyopneumoniae* virulenta ($1,0 \times 10^6$ organismos por cerdo) seis meses después de la vacunación. Tres cerdos sirvieron de controles no provocados. Ocho de los veinte vacunados (40%) no desarrollaron lesiones pulmonares después de la provocación, mientras que en el grupo de control solo uno de los 10 cerdos (10%) no tuvo lesión pulmonar. Los porcentajes de las lesiones pulmonares se resumen en la Tabla 5. Los cerdos vacunados tuvieron una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 3,6% y los cerdos de control provocados tuvieron una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 14,6%. Las lesiones pulmonares en el grupo vacunado fueron significativamente inferiores a los controles ($p = 0,0215$).

TABLA 4: Estado serológico para *M. hyopneumoniae* de los cerdos en el estudio*

Grupo	Tratamiento	Número de cerdos	Número de positivos (1:10) /total			
			0 DDV**	35 DDV	-1 DDP***	26 DDP
1	Vacuna/provocación	20	0/20	9/20	12/20	20/20
2	Control/provocación	10	0/10	0/10	0/10	4/10
3	Control/no provocación	3	0/3	0/3	0/3	0/3

* Las muestras de suero se probaron para anticuerpos del suero para *M. hyopneumoniae* por ELISA usando un kit comercial.

Todas las muestras se probaron a dilución del suero 1:10. Los resultados se interpretaron por instrucciones del kit.

Las muestras sospechosas a 1:10 se consideraron positivas.

** DDV = día después de la vacunación

*** DDP = día después de la provocación

TABLA 5: Resumen de las puntuaciones de lesión pulmonar (%) en cerdos provocados con *M. hyopneumoniae* y en controles sin provocar

Grupo	Tratamiento	Número de cerdos	% medio de puntuaciones de lesión pulmonar	Desviación estándar	NC* del inferior media	95% para la superior media	NC del superior para la inferior media	Valor de p**
1	Vacuna/provocación	20	3,6	7,6	0,07	7,19		0,0215
2	Control/provocación	10	14,6	20,0	0,33	28,94		
3	Control/no provocación	3	1,8	1,8	-2,67	6,27		

* NC=nivel de confianza

** El valor de p fue de la comparación de los grupos 1 y 2.

5

Como puede apreciarse de los datos mostrados en las Tablas 4 y 5, la vacuna de prueba A induce inmunidad protectora contra una provocación con *M. hyopneumoniae* virulenta durante seis meses después de una administración de dosis única en cerdos vacunados a la edad de tres semanas.

Ejemplo 5

- 10 Pueden prepararse vacunas contra el virus de la gripe porcina mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Por tanto, cepas de VGP, tales como H1N1 y H3N2, también son muy conocidas en la técnica y están fácilmente disponibles, por ejemplo, de sitios, NVSL, Ames, Iowa, USDA y en cualquier parte. Estas cepas pueden normalmente propagarse, por ejemplo, en una línea celular de riñón canino Madin Darby (MDCK) usando, por ejemplo, un medio de crecimiento Opti-Mem® complementado, según sea apropiado, con uno o más de suero bovino fetal, albúmina de suero bovino,
- 15 lactoalbúmina, hidrosilato y bicarbonato sódico. En un ejemplo, para promover el crecimiento óptimo del virus, el medio de crecimiento para la propagación de la cepa H1N1 se complementará adicionalmente con cantidades apropiadas de caldo de triptosa fosfato, butirato de sodio y tripsina; y el medio de crecimiento para la propagación de la cepa H3N2 se complementará adicionalmente con cantidades apropiadas de tripsina. En la recogida, los fluidos víricos recogidos pueden inactivarse con formalina. Una composición de vacuna de VGP que contiene estas cepas de vacuna puede entonces
- 20 normalmente formularse del siguiente modo:

ES 2 431 988 T3

H1N1 del VGP (≥ 400 unidades de HA por 1 ml)	20.000 ml
H3N2 del VGP (≥ 200 unidades de HA por 1 ml)	20.000 ml
Carbopol (disolución al 2%)	5.000 ml
Tiomersol (disolución al 5%)	50 ml
MEM o solución salina equilibrada	4.950 ml
Total	50.000 ml

Una vacuna de combinación con VGP según la invención puede normalmente prepararse del siguiente modo:

Concentrado de Mycoplasma (≥ 1 x 10 ¹⁰ MHDCE/ml)		100.000 ml
H1N1 del VGP (≥ 5120 unidades de HA por 1 ml)	≥1067 unidades de HA/ml	75.000 ml
H3N2 del VGP (≥ 2560 unidades de HA por 1 ml)	≥1533 unidades de HA/ml	56.000 ml
Mezcla de escualano/Pluronic L121		200.000 ml
Carbopol (disolución al 2%)		100.000 ml
Tiomersol (disolución al 5%)		7690 ml
MEM o solución salina equilibrada		611.310 ml
Total		1.000.000 ml

Se emplearon tres estudios diferentes para demostrar la eficacia de las diversas fracciones en combinación. En cada uno de los estudios, cerdos aleatoriamente asignados de edad apropiada se asignaron a tres grupos: grupo vacunado, grupo de control de la provocación para la fracción que se prueba y grupo de control medioambiental.

Los resultados de estos estudios fueron del siguiente modo:

RESUMEN DEL ESTUDIO - fracción de *M. hyo.*

Este ensayo en animales se diseñó para demostrar la eficacia de la fracción de *M. hyopneumoniae* de la vacuna contra la gripe porcina, H1N1 y H3N2, virus muerto - Bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* según la invención y la falta de bloqueo del antígeno por las fracciones de VGP.

Todos los cerdos eran seronegativos (título de anticuerpos <10) en el momento de la vacunación, lo que indica que los animales eran sensibles a *M. hyopneumoniae*. Todos los cerdos en los grupos de control permanecieron seronegativos antes de la provocación. Esto indica que la respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados fue debida a la vacuna y no a cualquier exposición medioambiental.

Se vacunaron veintidós (22) cerdos con vacuna contra VGP (vacuna A) a la edad de una semana y se volvieron a vacunar con vacuna MH/VGP (vacuna B) tres semanas después de la primera vacunación. Veintidós (22) cerdos sirvieron de controles de la provocación a *M. hyopneumoniae* y tres cerdos de controles medioambientales. Cuatro semanas después de la segunda vacunación, los cerdos en el grupo vacunado y el grupo de control de la provocación se expusieron a *M. hyopneumoniae* virulenta. Los cerdos se sacrificaron 28 días después de la provocación y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo.

Dieciocho (18) de los 20 cerdos (90%) en el grupo de control desarrollaron puntuaciones de la lesión pulmonar superiores al 5% mientras que en el grupo vacunado solo ocho de los 21 cerdos (38%) puntuaron lesión pulmonar superior al 5%. El grupo vacunado tuvo lesiones pulmonares promedio del 10,2% y los cerdos de control provocados tuvieron lesiones pulmonares promedio del 16,9%. Hubo una diferencia significativa entre el grupo vacunado y el grupo de control (p=0,02). Esto indica que los cerdos vacunados con la vacuna contra VGP a la edad de una semana y vacunados con vacuna MH/VGP tres semanas después desarrollaron inmunidad protectora contra la provocación con *M. hyopneumoniae* virulenta. Esto también indica que no hay efecto del bloqueo del antígeno sobre la fracción de *M. hyopneumoniae* por las fracciones de VGP en la vacuna de combinación MH/VGP.

RESUMEN DEL ESTUDIO - fracción H1N1 de VGP

Este ensayo en animales se diseñó para demostrar la eficacia de la fracción H1N1 del virus de la gripe porcina (VGP) de la vacuna contra la gripe porcina, H1N1 y H3N2, virus muerto - bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la invención.

5 Todos los cerdos eran seronegativos (título de anticuerpos <10) a H1N1 del VGP en el momento de la vacunación. Todos los controles permanecieron seronegativos antes de la provocación mientras que todos los cerdos vacunados se seroconvirtieron a H1N1 de VGP. Esto indica que la respuesta inmunitaria protectora en los cerdos vacunados, como se demuestra por la provocación, fue debida a la vacunación y no a cualquier exposición medioambiental.

10 Se vacunaron veinticinco (25) cerdos con vacuna contra VGP (vacuna A) a la edad de una semana y se volvieron a vacunar con vacuna VGP-MHP (vacuna B) dos semanas después de la primera vacunación. Veinticuatro (24) cerdos sirvieron de controles de la provocación y cinco cerdos de controles medioambientales. Los cerdos se provocaron tres semanas después de la segunda vacunación. Los cerdos se observaron para ver si tenían signos clínicos y se registraron las temperaturas rectales diariamente a partir de dos días antes de la provocación hasta cinco días después de la provocación (DDP). 5 DDP se sacrificaron los cerdos y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo. El aislamiento del virus se intentó con hisopos nasales recogidos 0 DDP, 3 DDP y 5 DDP y muestras de tejido de pulmón recogidas en la autopsia.

15 No se aisló virus de los hisopos nasales recogidos de los cerdos antes de la provocación (0 DDP). Se aisló virus de 10 de los 24 cerdos en el grupo de control con respecto a 1 de los 25 vacunados de hisopos nasales recogidos después de la provocación (3 DDP y 5 DDP). Hay una diferencia significativa entre el grupo vacunado y grupo de control en la eliminación de virus nasal después de la provocación ($p=0,0011$). También se aisló virus de muestras de tejido de pulmón recogidas en la autopsia de 14 de los 24 cerdos de control y 1 de los 25 cerdos vacunados. Hay una diferencia significativa entre el grupo vacunado y el grupo de control ($p<0,0001$). Conjuntamente, el virus se aisló de 19 de los 24 controles (79%) y solo 2 de los 25 vacunados (8%) después de la provocación. Además, la provocación de H1N1 de VGP también indujo respuesta febril. Aunque la respuesta febril global no fue significativa ($p=0,07$) entre los vacunados y los controles, los controles tuvieron elevación de temperatura significativamente superior 2 DDP en comparación con los vacunados ($p=0,0355$). Los signos clínicos inducidos por la provocación fueron muy leves y las tasas de incidencia de los signos individuales fueron tan bajas que no es apropiado usar estos datos para la evaluación de la provocación. El grupo vacunado tuvo una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 6,9% y el grupo de control provocado tuvo una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 9,2%.

20 En resumen, la incidencia y frecuencia de la eliminación del virus en la fosa nasal y la prevalencia del aislamiento de virus de tejido de pulmón fueron significativamente menores en el grupo vacunado en comparación con controles. Los cerdos vacunados también experimentaron menos respuesta febril después de la provocación y también tuvieron menores lesiones pulmonares en comparación con los cerdos de control. Esto indica que los cerdos vacunados se protegieron contra la provocación con H1N1 de VGP.

RESUMEN DEL ESTUDIO - fracción H3N2 de VGP

35 Este ensayo en animales se diseñó para demostrar la eficacia de la fracción H3N2 del virus de la gripe porcina (VGP) de la vacuna contra la gripe porcina, H1N1 y H3N2, virus muerto - bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* según la invención.

40 Todos los cerdos fueron o bien seronegativos (título de anticuerpos <10) o tuvieron bajo anticuerpo materno para H3N2 de VGP en el día de la primera vacunación (0 DDV1). El bajo título de anticuerpos maternos en aquellos cerdos disminuyó a seronegativo en el momento de la provocación. Todos los cerdos en los grupos de control permanecieron seronegativos antes de la provocación. Esto indica que la respuesta inmunitaria protectora en los cerdos vacunados, como se demuestra por la provocación, fue debida a la vacunación y no a cualquier exposición medioambiental.

45 Se vacunaron veintidós (22) cerdos con vacuna contra VGP (vacuna A) a la edad de una semana y se volvieron a vacunar con vacuna VGP-MHP (vacuna B) tres semanas después de la primera vacunación. Dieciocho (18) cerdos sirvieron de controles de la provocación y cinco cerdos de controles medioambientales. Los cerdos se observaron para ver si tenían signos clínicos y se registraron las temperaturas rectales tres días antes de y cinco días después de la provocación (DDP). 5 DDP se sacrificaron los cerdos y las lesiones pulmonares se puntuaron para cada cerdo. El aislamiento del virus se intentó con hisopos nasales recogidos 0 DDP, 3 DDP y 5 DDP y muestras de tejido de pulmón.

50 La provocación virulenta de H3N2 de VGP indujo una respuesta febril en los cerdos de control. Aunque el 78% de los controles tuvieron fiebre, solo el 18% de los vacunados tuvieron fiebre. Hubo una diferencia significativa de la respuesta febril entre el grupo vacunado y los controles ($p=0,0002$). Los signos clínicos inducidos por la provocación fueron leves y las tasas de incidencia de los signos individuales fueron bajas. Seis cerdos en el grupo de control provocado (33%) tuvieron tos durante uno a dos días mientras que solo dos cerdos en el grupo vacunado (9,1%) tuvieron tos. Similarmente, no hubo diferencia significativa en otros signos clínicos entre el grupo vacunado y los controles. Quince (15) de los 18 cerdos en el grupo de control (83%) desarrollaron puntuaciones de la lesión pulmonar superiores al 5% mientras, que en el grupo vacunado solo cinco de los 22 cerdos (23%) puntuaron las lesiones pulmonares superiores al 5%. El grupo

vacunado tuvo una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 4,9% y el grupo de control provocado tuvo una puntuación de la lesión pulmonar promedio del 23,2%. Hubo una diferencia significativa en las puntuaciones de la lesión pulmonar entre el grupo vacunado y el grupo de control ($p=0,0003$). No se aisló virus de los hisopos nasales recogidos de los cerdos antes de la provocación (0 DDP). De los hisopos nasales recogidos 3 DDP, el virus se aisló de 12 de los 18 cerdos en el grupo de control (67%) en comparación con 5 de los 22 vacunados (23%). El virus se aisló de hisopos nasales recogidos 5 DDP en 3 de los 18 cerdos en el grupo de control, pero no de cualquiera de los cerdos vacunados. El virus también se aisló de muestras de tejido de pulmón recogidas de autopsia (5 DDP) en 5 de los 18 cerdos en el grupo de control, pero no de cualquiera de los cerdos vacunados. Hay una diferencia significativa entre el grupo vacunado y el grupo de control en el aislamiento de virus de hisopos nasales después de la provocación ($p=0,0035$ para día individual, $p=0,0008$ para eliminación de virus 3 DDP y 5 DDP en combinación) y de tejido de pulmón ($p=0,013$).

En resumen, los cerdos vacunados experimentaron respuesta significativamente menos febril después de la provocación y también tuvieron puntuaciones de la lesión pulmonar mucho menores en comparación con los cerdos de control. Hubo una diferencia significativa entre los vacunados y controles en la eliminación de virus en las fosas nasales y recuperación de virus de muestras de tejido de pulmón. Esto indica que los cerdos vacunados con vacuna contra VGP a la edad de una semana y reforzados con vacuna VGP-MHP tres semanas después desarrollaron inmunidad protectora contra la provocación con H3N2 de VGP virulenta.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus de la gripe porcina (VGP) que comprende una cantidad inmunizante de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*;
una cantidad inmunizante del virus de la gripe porcina (VGP);
- 5 una mezcla de adyuvantes que comprende un polímero de ácido acrílico y una mezcla de un aceite metabolizable y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno; y
un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición de vacuna que después de una única administración provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 10 2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que la mezcla de adyuvantes está constituida por un polímero de ácido acrílico y una mezcla de un aceite metabolizable que comprende uno o más hidrocarburos terpénicos y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno en una relación de aproximadamente 1:25 a 1:50 de polímero de ácido acrílico con respecto a mezcla de aceite metabolizable/copolímero de bloques de polioxietileno- polioxipropileno.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que la mezcla de adyuvantes comprende aproximadamente 1-25% en v/v de la composición de vacuna.
- 15 4. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en la que el polímero de ácido acrílico está presente en una concentración final de aproximadamente el 1% en v/v y la mezcla de hidrocarburos terpénicos/copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno está presente en una concentración final de aproximadamente el 5% al 10% en v/v.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en la que la mezcla de adyuvantes comprende aproximadamente el 2% - 15% en v/v de la composición de vacuna.
- 20 6. La composición de vacuna de la reivindicación 5, en la que la mezcla de adyuvantes comprende aproximadamente el 5% -12% en v/v de la composición de vacuna.
7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el aceite metabolizable es escualano o escualeno.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que el polímero de ácido acrílico es un carbómero.
- 25 9. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además al menos una bacterina o toxoide purificado seleccionado del grupo constituido por *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacterias *Leptospira*.
- 30 10. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un antígeno bacteriano o vírico seleccionado de uno o más de los siguientes: *Haemophilus parasuis*, VSRRP, CVP, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*.
11. Una composición de vacuna para inmunizar un animal contra infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus de la gripe porcina (VGP), composición de vacuna que comprende
una cantidad inmunizante de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- 35 una cantidad inmunizante del virus de la gripe porcina (VGP); y un sistema de adyuvante que comprende un polímero de ácido acrílico, un aceite metabolizable y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno en forma de un emulsión de aceite en agua; composición de vacuna que después de una única administración provoca inmunidad protectora contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 40 12. Una composición de vacuna según la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para proteger un animal contra enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus de la gripe porcina (VGP).
13. Uso de una composición de vacuna según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para proteger un animal contra enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus de la gripe porcina (VGP).