

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 502**

51 Int. Cl.:

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09732113 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2291195**

54 Título: **Vacuna para la protección contra Lawsonia intracellularis, Mycoplasma hyopneumoniae y circovirus porcino**

30 Prioridad:

18.04.2008 EP 08154765

18.04.2008 US 46188 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2015

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
P.O. Box 31 Wim De Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN;
VERMEIJ, PAUL;
SEGBERS, RUUD PHILIP ANTOON MARIA y
SCHRIER, CARLA CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 502 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 para la protección contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino

5 La presente invención se refiere a una vacuna para la protección contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino. La protección en este sentido significa que la vacuna al menos proporciona una disminución en una influencia negativa causada por *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino, siendo tal influencia negativa, por ej. daño tisular y/o signos clínicos tales como disminución del aumento de peso, diarrea, tos, estornudos, etc. La presente invención también se refiere a un kit que comprende un
10 primer envase que tiene contenido en el mismo antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, uno o más otros envases que tienen contenidos en los mismos antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de circovirus porcino e instrucciones para la mezcla de los antígenos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino para formular una vacuna de combinación adecuada para la vacunación sistémica.

15 La enteropatía proliferativa (EP o EPP, también llamada enteritis o ileítis) en muchos animales, en especial los cerdos, presenta un signo clínico y un síndrome patológico con hiperplasia de la mucosa de las células epiteliales de las criptas inmaduras, principalmente en el íleon terminal. Otros sitios del intestino que pueden verse afectados incluyen el yeyuno, el ciego y el colon. Los cerdos destetados y los adultos jóvenes se ven afectados principalmente con la manifestación clínica típica de la pérdida rápida de peso y la deshidratación. La enfermedad clínica natural en
20 los cerdos se produce en todo el mundo. La enfermedad se asocia sistemáticamente con la presencia de bacterias intracelulares curvadas, actualmente conocidas como *Lawsonia intracellularis*.

La neumonía por micoplasma porcina causada por el patógeno bacteriano *Mycoplasma hyopneumoniae* es una enfermedad respiratoria crónica generalizada en cerdos. Especialmente los lechones jóvenes son vulnerables a esta
25 enfermedad no mortal. La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica que tiene como resultado una deficiente conversión del alimento y retraso del crecimiento. La enfermedad es muy contagiosa y la transmisión es por lo general a través del contacto directo con las secreciones de las vías respiratorias infectadas, por ejemplo, en forma de gotitas infectadas después de toser/estornudar. La consecuencia más problemática de esta enfermedad es que predispone a todo tipo de infecciones secundarias del sistema respiratorio. Se estima que, por ejemplo, en los
30 EE.UU., el 99 % de todas las granjas de cerdos están infectadas.

El circovirus porcino se cree que está relacionado con el síndrome multisistémico de emaciación post destete (PMWS, por sus siglas en inglés) observado en los cerdos jóvenes. Esta enfermedad se detectó por primera vez en Canadá en 1991. Los signos clínicos y la patología fueron publicados en 1997 e incluyen emaciación progresiva,
35 disnea, taquipnea y ocasionalmente ictericia. El circovirus porcino es un virus pequeño (17 nm) icosaédrico sin envoltura que contiene un genoma de ADN monocatenario circular. El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS, por sus siglas en inglés) es otro problema importante para los criadores de cerdos que apareció aproximadamente al mismo tiempo que el PMWS y que también está relacionado con el circovirus porcino. Los signos característicos del PDNS son lesiones circulares de la piel de color rojo/marrón con hemorragias, por lo
40 general, en las orejas, los flancos, las patas y los jamones.

Con respecto a la EP, la vacunación oral contra *Lawsonia intracellularis* ha demostrado ser una medida económicamente eficiente para controlar la ileítis y permitir un mejor aprovechamiento del potencial genético de crecimiento del cerdo (Enteropatía proliferativa – Manual técnico 3.0, julio de 2006; disponible de Boehringer
45 Ingelheim). Además, la vacunación oral en lugar de la vacunación parenteral reducirá la transmisión de infecciones transmisibles por la sangre como la PRRS a través del multiuso de agujas y la reducción de las reacciones en el lugar de inyección y las agujas retenidas en las carcasas. Reducirá el estrés en animales y seres humanos, los costes laborales y el esfuerzo en comparación con la vacunación individual (McOrist: "Ileitis - One Pathogen, Several Diseases" en el Simposio sobre ileítis de la IPVS celebrado en Hamburgo el 28 de junio 2004).

50 Se entiende generalmente que la ventaja del método de vacuna viva atenuada es que la eficacia de la inmunidad es por lo general relativamente buena, ya que el sistema inmunitario del huésped se expone a todas las propiedades antigénicas del organismo de una manera más "natural". Específicamente para los agentes bacterianos intracelulares como *Lawsonia intracellularis*, se cree que el método de una vacuna viva atenuada ofrece la mejor
55 protección disponible para los animales vacunados, debido a una respuesta inmunitaria basada en linfocitos T completa y adecuada. Esto está en contraste con la variable de la mala inmunidad asociada con los tipos de vacuna de subunidad o vacuna muerta para las bacterias intracelulares. Esto también es especialmente cierto para las bacterias intracelulares obligadas, tales como *Lawsonia intracellularis* o *Chlamydia* sp, que causan infecciones patógenas dentro de la mucosa. Los estudios indican que las formas atenuadas vivas de las bacterias intracelulares
60 en cuestión se administran mejor en la mucosa de destino, que se requieren como formas bacterianas vivas enteras para producir una respuesta inmunitaria de protección total en la mucosa objetivo, pero también que son inmunológicamente superiores en comparación con el uso de componentes bacterianos parciales.

Se ha convertido en un conocimiento general que una vacuna contra *Lawsonia intracellularis* necesita ser
65 administrada por vía oral (ver i.a. Manual técnico 3.0 al que se ha hecho anteriormente referencia en la presente memoria. Esto se basa en el hecho de que la base de la resistencia del cuerpo a la ileítis en la inmunidad local en el

intestino, que es el producto de la inmunidad mediada por células y la defensa local a través de anticuerpos, especialmente IgA. Según los conocimientos actuales, los anticuerpos séricos (IgG) no dan ningún tipo de protección, simplemente porque no llegan a la luz intestinal. Se ha demostrado en estudios que la vacunación oral produce inmunidad mediada por células, así como la producción local de IgA en el intestino (Murtaugh, en Agrar- und Veterinär-Akademie, Nutztierpraxis Aktuell, Ausgabe 9, Junio 2004; y Hyland et al. en Veterinary Immunology and Immunopathology 102 (2004) 329-338). Por el contrario, la administración intramuscular no condujo a la protección. Además, junto al conocimiento general de que una vacuna exitosa contra las bacterias intracelulares tiene que inducir la inmunidad mediada por células, así como la producción de anticuerpos locales, el experto en la materia sabe que sólo un porcentaje muy bajo de antígenos ingeridos por vía oral son en realidad absorbidos por los enterocitos y que la incorporación de *Lawsonia intracellularis* en la célula es un proceso activo iniciado por la bacteria. Por consiguiente, una vacuna inactivada proporcionaría a intestino antígeno inmunogénico insuficiente (Haesebrouck et al. en Veterinary Microbiology 100 (2004) 255-268). Es por ello que se cree que sólo las vacunas vivas atenuadas inducen suficiente protección mediada por células en las células intestinales (ver Manual técnico 3.0 al que se ha hecho anteriormente referencia en la presente memoria). En la actualidad hay sólo una vacuna en el mercado para proteger contra *Lawsonia intracellularis*, a saber Enterisol® Ileitis comercializada por Boehringer Ingelheim. Esta vacuna es una vacuna viva para la administración oral de hecho.

En el documento WO 97/20050 se describe una vacuna contra *L. intracellularis* matada con formalina. Parece que se han descrito efectos positivos después de la administración de la vacuna sobre la eliminación, patología macroscópica y la histopatología. Sin embargo, los resultados no son estadísticamente significativos y, por lo tanto, el documento WO97/20050 no proporciona ninguna prueba de que una vacuna matada con formalina sea eficaz en la lucha contra *Lawsonia intracellularis*.

Hasta ahora, en la técnica anterior se han sugerido las vacunas de combinación de *Lawsonia intracellularis*. Sin embargo, en realidad, no tantas de tales combinaciones se han probado en cuanto a eficacia. La razón de esto es que en general se entiende que la combinación de los antígenos con antígenos de *Lawsonia intracellularis* sólo puede conducir a una protección satisfactoria si los antígenos de *Lawsonia* se proporcionan como células vivas (atenuadas). En este sentido, nos referimos al documento WO 2005/011731, el cual también sugiere todo tipo de vacunas de combinación basadas en *Lawsonia intracellularis*. Sin embargo, con respecto a la descripción y la estructura de la reivindicación de la solicitud de patente; el cesionario (Boehringer Ingelheim) parece estar convencido de que sólo se espera que las vacunas combinadas tengan una posibilidad razonable de éxito cuando los antígenos de *Lawsonia* están presentes en forma de células vivas. Lo mismo es cierto para WO2006/099561, también concedida a Boehringer Ingelheim. De hecho, basándose en el conocimiento general común esto es un pensamiento obvio. La combinación de antígenos vivos sin embargo, no es sencilla dada la alta probabilidad de interferencia entre los antígenos y la dificultad de fabricación de una vacuna de combinación como en vivo.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna para combatir *Lawsonia intracellularis*, y al mismo tiempo, combatir a uno o más de otros patógenos porcinos. Con este propósito, se ha ideado una vacuna que comprende en combinación antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino y un vehículo farmacéuticamente aceptable, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* es una composición que contiene hidratos de carbono, conteniendo los hidratos de carbono que en las células de *Lawsonia intracellularis* in vivo están asociados a la membrana celular externa de estas células. Sorprendentemente, en contra del conocimiento general persistente sobre cómo combatir *Lawsonia intracellularis* y que una vacuna de combinación debería comprender antígenos de *Lawsonia intracellularis* vivos, se descubrió que mediante el uso de antígenos de *Lawsonia intracellularis* no vivos, en combinación con antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y del circovirus porcino, se puede proporcionar una vacuna que proteja contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino.

En general, una vacuna se puede fabricar usando métodos conocidos en la técnica que, básicamente, comprenden la mezcla de los antígenos con un vehículo. Generalmente, el antígeno(s) se combina con un medio para portar los antígenos, a menudo simplemente referido como un vehículo o "vehículo farmacéuticamente aceptable". Dicho vehículo puede ser cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y agente retardante de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles y aceptables para el animal diana, por ejemplo, haciéndolos estériles. Algunos ejemplos de tales medios vehículo son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, fluido de cultivo bacteriano, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Estos pueden proporcionar una forma farmacéutica líquida, semisólida y sólida, dependiendo del modo de administración prevista. Como es sabido generalmente, la presencia de un medio de transporte no es esencial para la eficacia de una vacuna, pero puede simplificar significativamente la dosis y la administración del antígeno. Como tal, la fabricación de la vacuna puede tener lugar en un entorno industrial, aunque también, los antígenos pueden mezclarse con los otros constituyentes de vacunas *in situ* (es decir, en el veterinario, en una granja, etc.), por ejemplo, (inmediatamente) antes de la administración real a un animal. En la vacuna, los antígenos deben estar presentes en una cantidad inmunológicamente eficaz, es decir, en una cantidad capaz de estimular el sistema inmunitario del animal diana suficiente para al menos reducir los efectos negativos de una provocación post-vacunación con microorganismos de tipo silvestre. Opcionalmente otras sustancias tales como adyuvantes, estabilizadores, modificadores de la viscosidad u otros componentes se agregan en función del uso previsto o de las propiedades requeridas de la vacuna.

En una realización, la vacuna está en una forma adecuada para la administración sistémica. Para sorpresa de los solicitantes, se ha descubierto que se puede inducir una protección contra *Lawsonia intracellularis* que es comparable con, o incluso mejor con respecto a la protección proporcionada por el uso de la (única) vacuna viva Enterisol® Ileitis (administrada de acuerdo con las instrucciones correspondientes), cuando la vacuna de combinación de acuerdo con la presente invención se administra sistémicamente, es decir, de una manera que alcanza el sistema circulatorio del cuerpo (que comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando así al cuerpo como un todo en lugar de en un sitio específico, tal como el tracto gastro-intestinal. La administración sistémica se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración de los antígenos en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica), debajo de la piel (subcutánea), por debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (por vía intravenosa), etc. Para la vacunación sistémica muchas formas son adecuadas, en formulaciones líquidas (con antígenos disueltos, emulsionados o suspendidos), pero también formulaciones sólidas tales como implantes o en una forma intermedia, tal como un soporte sólido para el antígeno suspendido en un líquido. La vacunación sistémica, en particular, la vacunación parenteral (es decir, no a través del tubo digestivo) y formas adecuadas (físicas) de las vacunas para la vacunación sistémica se conocen desde hace más de 200 años. Una ventaja de esta realización es que se puede utilizar la misma forma de administración que la administración estándar actual para la administración de *Mycoplasma hyopneumoniae* o de los antígenos del circovirus porcino, a saber, parenteral, en particular, mediante inyección intramuscular o intradérmica (en este último caso a menudo sin aguja).

Los antígenos de la vacuna no viva de *Lawsonia intracellularis* se obtienen de una composición que contiene el hidrato de carbono, encontrándose también el hidrato de carbono en células vivas de *Lawsonia intracellularis* asociado a la membrana celular externa de estas células. Inesperadamente, mediante el uso de una fracción que contiene hidrato de carbono de células de *Lawsonia intracellularis* (es decir, una composición que contiene los hidratos de carbono como están presentes en las células vivas de *Lawsonia intracellularis*) en la vacuna de combinación, podría proporcionar una buena protección contra la EP. Se observa que para la formulación de la vacuna podría utilizarse una composición que contiene hidratos de carbono obtenida directamente de células de *Lawsonia intracellularis*, pero también una composición derivada de la misma, tal como una dilución o concentrado de la composición original o un extracto, uno o más componentes purificados etc. Se ha observado que las subunidades de las células de *Lawsonia intracellularis* se han comportado como antígenos en una vacuna para la protección contra esta bacteria. Sin embargo, estas son principalmente proteínas recombinantes y hasta ahora ninguna de ellas ha demostrado ser capaz y proporcionar una buena protección. También hay que señalar que una composición que contiene hidrato de carbono, en la que el hidrato de carbono también se encuentra en las células vivas de *Lawsonia intracellularis* se conoce de Kroll et al. (Clínical and Diagnostic Laboratory Immunology, junio de 2005, 693-699). Sin embargo, esta composición se utiliza para el diagnóstico. No ha sido probada como un antígeno protector por las razones indicadas aquí anteriormente.

En una realización, la composición que contiene el hidrato de carbono es un material resultante de matar la bacteria *Lawsonia intracellularis*. Se ha descubierto que una forma muy conveniente de proporcionar el hidrato de carbono para su uso de acuerdo con la presente invención es simplemente destruir las células de *Lawsonia intracellularis* y utilizar el material resultante de esto como una fuente de hidratos de carbono. En teoría también podría extraerse el hidrato de carbono de las células vivas (de forma análoga a la creación de células vivas fantasma mediante la eliminación de la pared celular), pero requiere técnicas más sofisticadas y, por lo tanto, más caras. Podría utilizarse el material en su conjunto, por ejemplo, una suspensión de células enteras o un lisado de células de *Lawsonia intracellularis*, o se podría purificar o incluso aislar el hidrato de carbono del material. Este método se puede realizar mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica relativamente simples.

En una realización preferida, la composición que contiene hidratos de carbono contiene células enteras de la bacteria *Lawsonia intracellularis* matada. Esto ha demostrado ser la forma más conveniente de proporcionar el hidrato de carbono como un antígeno en la vacuna. Además, la eficacia de la vacuna se incrementa aún más, posiblemente, ya que esta forma de ofrecer el antígeno al sistema inmunitario del animal diana imita mejor el entorno natural del hidrato de carbono.

En una realización, la vacuna comprende un aceite con un adyuvante acuoso que contiene gotitas de aceite de tamaño sub-micrométrico. En general, un adyuvante es un agente inmunoestimulante no específico. En principio, cada sustancia que es capaz de favorecer o amplificar un proceso en particular en la cascada de eventos inmunológicos, en última instancia, conduce a una mejor respuesta inmunológica (es decir, la respuesta corporal integrada a un antígeno, en particular, una mediada por linfocitos y que generalmente implica el reconocimiento de antígenos de anticuerpos específicos o linfocitos sensibilizados previamente), se puede definir como un adyuvante. Se ha demostrado que el uso de un adyuvante del tipo aceite en agua que contiene gotitas de aceite de tamaño sub-micrométrico ofrece una protección muy buena contra *Lawsonia intracellularis*. De hecho, la aplicación de adyuvantes aceite en agua como tales es frecuente en cuanto a los antígenos no vivos. Sin embargo, se sabe generalmente que las mejores propiedades inmunoestimulantes se obtienen cuando las gotitas de aceite son de diámetro grande. En particular, las gotitas de aceite con un diámetro por debajo de 1 micrómetro son especialmente usadas cuando se cree que la seguridad es un tema importante. En ese caso, se podrían utilizar gotas pequeñas, ya que se sabe que estas provocan menos daño a los tejidos, signos clínicos etc. Sin embargo, en el caso de obtener protección para un trastorno intestinal asociado mediante la vacunación sistémica (como es el caso en la presente

invención), se podría elegir gotas grandes, ya que sería de esperar que la respuesta inmunitaria fuese reforzada de manera significativa. Por el contrario, se observó que el uso de pequeñas gotitas de aceite en la composición proporciona resultados muy buenos en lo que respecta a la protección contra *Lawsonia intracellularis*.

- 5 En una realización aún más preferida, el adyuvante comprende gotitas de aceite biodegradable y gotitas de aceite mineral, teniendo las gotitas de aceite biodegradable un tamaño medio que difiere del tamaño medio de las gotitas de aceite mineral. Se ha demostrado que el uso de una mezcla de aceite biodegradable y aceite mineral proporciona muy buenos resultados con respecto a la eficacia y la seguridad. Además de esto, la estabilidad de la composición es muy alta, lo que es una ventaja económica importante. La estabilidad ha demostrado ser muy buena, en particular, cuando el tamaño promedio (volumen pesado) de las gotitas de aceite biodegradables o las gotitas de aceite mineral es inferior a 500 nm (preferiblemente alrededor de 400 nm).

La presente invención también se refiere a un kit que comprende un primer envase que tiene contenido en el mismo antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, uno o más otros envases que tienen contenidos en los mismos antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y antígenos del circovirus porcino y las instrucciones para la mezcla de los antígenos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino para formular una vacuna de combinación adecuada para la vacunación sistémica, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* es una composición que contiene hidratos de carbono, conteniendo los hidratos de carbono que en las células de *Lawsonia intracellularis* in vivo están asociados a la membrana celular externa de estas células. En esta realización, se proporciona un envase separado para los antígenos de *Lawsonia intracellularis* en un kit que contiene también los otros antígenos (ya sea combinados en un envase, como se sabe de la técnica anterior o presentes en envases separados que forman parte de los contenidos del kit. Una ventaja de esta realización es que se puede evitar que los antígenos de *Lawsonia* tengan interacciones con los otros antígenos hasta justo antes de la administración de la vacuna. Además, dado que los antígenos están en un envase separado se producen menos pérdidas. En una realización, los antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y del circovirus porcino están contenidos en un envase, formulado en un adyuvante de tipo aceite en agua. En esta realización, los antígenos de *Lawsonia* se pueden mezclar con los otros justo antes del uso.

La invención se explicará adicionalmente basándose en los siguientes ejemplos.

El Ejemplo 1 describe un método para obtener una composición de hidrato de carbono sustancialmente libre de proteínas y una vacuna que se prepara mediante el uso de esta composición.

El Ejemplo 2 describe un experimento en el que una vacuna no viva contra *Lawsonia intracellularis* se compara con la vacuna que existe actualmente en el mercado y una vacuna experimental que comprende proteínas de las subunidades de *Lawsonia intracellularis*.

El Ejemplo 3 describe un experimento en el que se comparan dos vacunas diferentes que comprenden antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis* con la vacuna viva que existe actualmente en el mercado.

Ejemplo 1

En este ejemplo se describe un método para obtener una composición de hidratos de carbono sustancialmente libre de proteínas asociados con la membrana celular externa de las células de *Lawsonia intracellularis* y una vacuna que se puede producir usando esta composición. En general, un hidrato de carbono es un compuesto orgánico que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno, generalmente en la relación de 1:2:1. Ejemplos de hidratos de carbono son azúcares (sacáridos), almidones, celulosas y gomas. Por lo general, sirven como una fuente de energía importante en la dieta de los animales. *Lawsonia intracellularis* es una bacteria gram negativa que, por lo tanto, contiene una membrana externa que no está construida únicamente a base de fosfolípidos y proteínas, sino que también contiene hidratos de carbono, en particular, polisacáridos (por lo general polisacáridos, tales como lipopolisacárido, lipooligosacárido o incluso polisacáridos no lipo).

FRACCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO PARA LA PREPARACIÓN DE LA VACUNA

Se tomaron 20 ml de agua tamponada (PBS 0,04 M, solución salina tamponada con fosfato) que contiene células de *Lawsonia intracellularis* a una concentración de $3,7 \times 10^8$ (= $3,7 \times 10^8$) células/ml. Las células fueron lisadas manteniéndolas a 100 °C durante 10 minutos. Se añadió proteinasa K (10 mg/ml) en PBS 0,04 M a una concentración final de 1,7 mg/ml. Esta mezcla se incubó a 60 °C durante 60 minutos con el fin de degradar todas las proteínas y mantener los hidratos de carbono intactos. Posteriormente, la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K. El material resultante, que es una composición que contiene hidrato de carbono, en particular, que contiene los hidratos de carbono como están presentes en las bacterias *Lawsonia intracellularis* in vivo asociados a su membrana celular externa (véase el párrafo siguiente), se almacenó a 2-8 °C hasta su uso posterior. La composición se formuló en adyuvante Diluvac Forte, que también sirve como un vehículo para los antígenos. Este adyuvante (véase también el documento EP 0 382 271) comprende 7,5 por ciento en peso de gotitas de acetato de vitamina E con un volumen de tamaño medio ponderado de aproximadamente 400 nm, suspendidas en agua y estabilizadas con 0,5 por ciento en peso de Tween 80 (polioxitileno sorbitán mono-oleato). Cada mililitro de vacuna contenía material que se había extraído de las células $1,2 \times 10^8$ células de *Lawsonia intracellularis*.

PRECIPITACIÓN INMUNITARIA DE LOS ANTÍGENOS HIDRATOS DE CARBONO DE LAWSONIA

Se hicieron precipitar dos lotes de anticuerpos monoclonales (AcMo) obtenidos contra células enteras de *Lawsonia intracellularis* con Na₂SO₄ saturado a temperatura ambiente de acuerdo con procedimientos estándar. El precipitado se sedimentó por centrifugación (10.000 g durante 10 minutos). El precipitado se lavó con Na₂SO₄ al 20 % y se resuspendió en PBS 0,04 M. Se lavaron previamente perlas de Dynal activadas con tilosilo (DynaBeads, DK) con NaPO₄ 0,1 M (pH 7,4), de acuerdo con el manual del fabricante. De cada lote de AcMo se tomaron 140 µg y se añadieron a perlas lavadas previamente con 2E8 y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las perlas se sedimentaron por centrifugación y los AcMo no unidos se extrajeron por aspiración del sobrenadante. Las mediciones espectrofotométricas mostraron que entre el 20 y el 35 % de los AcMo añadidos se habían unido a las perlas.

Dos lotes de 1 ml de células de *Lawsonia intracellularis* (3,7E8/ml) en PBS 0,04 M se sometieron a ultrasonidos durante 1 minuto. Los lisados de las células resultantes se añadieron a los complejos perlas activadas con tilosilo – anticuerpos monoclonales y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los complejos perlas activadas con tilosilo – anticuerpos monoclonales se lavaron tres veces con NaPO₄ 0,1 M (pH 7,4). Los compuestos unidos se eluyeron mediante el lavado de las perlas en 0,5 ml de urea 8M en PBS 0,04 M (E1), 0,5 ml de glicina 10 mM pH 2,5 (E2) y 0,5 ml de HCl 50 mM (E3), de una manera secuencial. Después de la elución, E2 y E3 se neutralizaron con cualquiera de 100 µl y 200 µl de Tris/HCl 1 M (pH 8,0).

Se tomaron muestras de cada paso y se cargaron en geles de SDS-PAGE. Los geles se tiñeron utilizando azul brillante de Commassie (CBB) y tinción de plata o se transfirieron. Las transferencias fueron desarrolladas utilizando los mismos AcMo mencionados anteriormente en la presente memoria. La inspección de los geles y las manchas mostró que los AcMo se reconocían en bandas con un peso molecular aparente de 21 y 24 kDa que no se observaban en los geles CBB pero que sí eran visibles en geles teñidos de plata. Además, se estableció que la fracción de las células que se unía a los AcMo era resistente a la proteinasa K. Por lo tanto, basándose en estos resultados se puede concluir que esta fracción contiene hidratos de carbono (a saber: toda la proteína se lisa y las fracciones de ADN tratadas con ultrasonidos no se mostrarán como una banda clara en una tinción de plata) y que los hidratos de carbono se encuentran asociados a (es decir, formando parte de, unidos a) la membrana celular externa de *Lawsonia intracellularis* (a saber: los AcMo obtenidos frente a esta fracción también reconocían las células enteras de *Lawsonia intracellularis*). Teniendo en cuenta el hecho de que *Lawsonia intracellularis* es una bacteria gram-negativa, se cree que la composición de carbohidratos comprende el polisacárido(s).

Ejemplo 2

Este experimento se llevó a cabo para probar una manera conveniente de formular el antígeno hidrato de carbono en una vacuna, a saber, a través de una célula entera matada (también conocido como bacterina). Como controles se utilizaron la vacuna disponible comercialmente Enterisol® Ileitís y una vacuna de subunidad experimental que comprende subunidades de proteínas. Además, se usaron animales no vacunados como control.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EJEMPLO 2

Se preparó una vacuna de células enteras inactivadas de la siguiente manera. Se recogieron células vivas de *Lawsonia intracellularis* obtenidas de los intestinos de cerdos con EPP. Las células fueron inactivadas con BPL (beta-propiolactona) al 0,01 %. El material resultante, que inherentemente es una composición que contiene hidrato de carbono no vivo en el sentido de la presente invención (en particular, ya que contiene los hidratos de carbono como están presentes en las bacterias *Lawsonia intracellularis* vivas asociados a su membrana celular externa), se formuló en el adyuvante Diluvac forte (véase el Ejemplo 1) a una concentración de aproximadamente $2,8 \times 10^8$ células por ml de vacuna.

La vacuna de subunidad recombinante contenía P1/2 y P4, como se conoce a partir del documento EP 1219711 (las proteínas de 19/21 y 37 kDa respectivamente) y las proteínas recombinantes expresadas por los genes 5074, 4320 y 5464 como se describe en el documento WO2005/070958. Las proteínas se formularon en adyuvante Diluvac forte. La vacuna contenía aproximadamente 50 µgramos de cada proteína por mililitro.

Se utilizaron 40 cerdos SFP con 6 semanas de edad. Los cerdos fueron asignados a 4 grupos de diez cerdos cada uno. El grupo 1 fue vacunado por vía oral una vez (en T = 0) con 2 ml de "Enterisol® Ileitís" viva (Boehringer Ingelheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El grupo 2 y 3 fueron vacunados dos veces por vía intramuscular (en T = 0 y T = 4s) con 2 ml de la vacuna de células enteras de *Lawsonia intracellularis* inactivada y la vacuna de combinación de la subunidad recombinante como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, respectivamente. El grupo 4 se dejó como control no vacunado. En T = 6s todos los cerdos fueron provocados por vía oral con mucosa homogeneizada infectada con *Lawsonia intracellularis*. Posteriormente todos los cerdos se observaron diariamente para detectar signos clínicos de enteropatía proliferativa porcina (EPP). A intervalos regulares antes y después de la exposición, se extrajeron de los cerdos muestras de suero (para serología) y heces (para PCR). En T = 9s todos los cerdos fueron sacrificados y sometidos a autopsia. Se tomaron y examinaron microscópicamente muestras histológicas del íleon.

El inóculo para la provocación se preparó a partir mucosa infectada: se descongelaron 500 gramos de mucosa infectada (raspado de los intestinos infectados) y se mezclaron con 500 ml de solución salina fisiológica. Esta mezcla se homogeneizó en un omnimixer durante un minuto a toda velocidad en hielo. Todos los cerdos fueron provocados por vía oral con 20 ml de inóculo en T = 6s.

En T = 0, 4, 6, 7, 8 y 9s se tomó una muestra de heces (cantidades en gramos) y una muestra de suero de cada cerdo y se almacenó congelado hasta el momento de realizar las pruebas. Las muestras de heces se ensayaron en un ensayo de PCR cuantitativa (Q-PCR) y se expresaron como el logaritmo de la cantidad encontrada en picogramos (pg). Las muestras de suero se sometieron a la prueba IFT generalmente aplicada (ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes para detectar anticuerpos contra las células enteras de *Lawsonia intracellularis* en el suero). Para la puntuación histológica se tomó una muestra relevante del íleon, fijado en formalina tamponada al 4 %, generalmente embebida y los cortes se montaron en portas. Los portas se tiñeron con hematoxilina-eosina (tinción HE) y con una tinción inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales anti-*Lawsonia intracellularis* (tinción IHC). Los portas se examinaron al microscopio. Las puntuaciones histológicas son las siguientes:

Tinción HE:	
sin anomalías detectadas	Puntuación = 0
lesión dudosa	Puntuación = ½
lesiones leves	Puntuación = 1
lesiones moderadas	Puntuación = 2
lesiones graves	Puntuación = 3
Tinción IHC:	
bacterias <i>L. intracellularis</i> no evidentes	Puntuación = 0
presencia dudosa de bacterias	Puntuación = ½
presencia de bacterias individuales/pequeñas cantidades de bacterias en el porta	Puntuación = 1
presencia de un número moderado de bacterias en el porta	Puntuación = 2
presencia de un gran número de bacterias en el porta	Puntuación = 3

Todos los datos se registraron para cada cerdo individualmente. La puntuación por grupo se calculó como la media de los animales positivos para los diferentes parámetros después de la provocación. Se usó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar la significación estadística (prueba bilateral y nivel de significación de 0,05).

RESULTADOS DEL EJEMPLO 2

Serología

Antes de la primera vacunación, todos los cerdos fueron seronegativos en las pruebas IFT de los títulos de anticuerpos. Después de la vacunación con la bacterina de célula entera (grupo 2), los cerdos desarrollaron títulos de anticuerpos altos (IFT), mientras que los controles y los cerdos vacunados con la vacuna de subunidad se mantuvieron negativos hasta la provocación (Tabla 1). Dos de los cerdos vacunados con Enterisol® (grupo 1) desarrollaron títulos (IFT) moderados mientras que todos los otros cerdos en este grupo se mantuvieron seronegativos. Después de la exposición, todos los cerdos desarrollaron altos niveles de anticuerpos (IFT). Los resultados medios se representan en la tabla 1 (con la dilución utilizada, 1,0 fue el nivel de detección en el lado inferior).

Tabla 1. Media de los títulos de anticuerpos (IFT) (2 log) de suero de cerdo después de la vacunación y provocación

Grupo	T = 0 semanas	T = 4 semanas	T = 6 semanas	T = 9 semanas
1	<1,0	1,1	1,7	> 11,4
2	<1,0	3,7	> 11,8	> 12,0
3	<1,0	<1,0	<1,0	> 11,6
4	<1,0	<1,0	<1,0	> 12,0

PCR en tiempo real en muestras de heces

Antes de la provocación todas las muestras de heces fueron negativas. Después de la provocación se encontraron reacciones positivas en todos los grupos. El grupo 1 (p = 0,02), grupo 2 (p = 0,01) y el grupo 3 (p = 0,03) tenía un nivel de eliminación significativamente menor en comparación con el control. Un panorama post-desafío se da en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados medios de PCR en muestras de heces (log pg) después de la vacunación y la provocación

Grupo	T = 6 semanas	T = 7 semanas	T = 8 semanas	T = 9 semanas	Total después de la provocación
1	0	1,3	3,6	1,8	6,3
2	0	0,8	2,8	1,9	5,5

3	0	0,5	3,8	2,0	5,9
4	0	0,8	4,9	4,9	10,0

Puntuaciones de histología

- 5 El Grupo 2 tenía la puntuación de HE de histología más baja ($p = 0,05$), la puntuación de IHC ($p = 0,08$) y la puntuación de histología total ($p = 0,08$). Los otros grupos tenían las puntuaciones más altas y no fueron significativamente diferentes del grupo control. Ver tabla 3.

Tabla 3. Puntuación de histología media para el íleon

Grupo	Puntuación HE	Puntuación IHC	Puntuación total
1	1,8	1,5	3,3
2	1,3	1,5	2,7
3	1,8	1,6	3,4
4	2,4	2,3	4,7

10 CONCLUSIONES EN RELACIÓN CON EL EJEMPLO 2

- De los resultados se puede concluir que la vacuna de células enteras no vivas de *Lawsonia intracellularis* que contienen intrínsecamente el hidrato de carbono tal como se encuentra también asociado a la membrana externa de las células vivas de *Lawsonia intracellularis*, indujeron protección al menos parcial. Todos los parámetros estudiados y las puntuaciones histológicas fueron significativamente o casi significativamente mejor en comparación con los controles.

Ejemplo 3

- 20 Este experimento se llevó a cabo para probar una vacuna que comprende una composición que contiene hidrato de carbono sustancialmente libre de proteínas como antígeno. Una segunda vacuna a analizar contenía, además de células enteras matadas de *Lawsonia intracellularis*, antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino (la vacuna "combi"). Como control se utilizó la vacuna Enterisol® Ileitis disponible comercialmente. Además, los animales no vacunados fueron utilizados como un segundo control.

25 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EJEMPLO 3

La vacuna basada en una composición que contiene hidrato de carbono sustancialmente libre de proteína se obtuvo como se describe en el Ejemplo 1.

- 30 La vacuna combi experimental contenía antígeno de células enteras de *Lawsonia intracellularis* inactivada (véase el Ejemplo 2 para el método utilizado de proporcionar las bacterias inactivadas) a un nivel de $1,7 \times 10^8$ células/ml. Además, contenía antígeno PCV-2 inactivado (20 µgramos de la proteína codificada por ORF 2 de PCV 2 por ml; la proteína se expresa en un sistema de expresión de baculovirus como comúnmente se conoce en la técnica, por ejemplo como se describe en el documento WO 2007/028823) y antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado (el mismo antígeno en la misma dosis que se conoce de la vacuna disponible comercialmente Porcilis Mhyo®, que se puede adquirir en Intervet, Boxmeer, Holanda). Los antígenos se formularon en una emulsión de adyuvante gemelo "X". Este adyuvante es una mezcla de 5 partes en volumen de adyuvante "A" y 1 parte en volumen de adyuvante "B". El adyuvante "A" se compone de gotitas de aceite mineral con un tamaño medio aproximado (volumen ponderado) de aproximadamente 1 µm, estabilizado con Tween 80 en agua. El adyuvante "A" comprende 25 % en peso de aceite mineral y 1 % en peso de Tween. El resto es agua. El adyuvante "B" consiste en gotitas de acetato de vitamina E biodegradable con un tamaño promedio aproximado (volumen ponderado) de 400 nm, estabilizado también con Tween 80. El adyuvante "B" comprende 15 % en peso de acetato de vitamina E y el 6 % en peso de Tween 80, el resto es agua.

- 45 Se utilizaron 64 lechones SPF de 3 días de edad. Los cerdos se asignaron a cuatro grupos de 14 lechones y un grupo de 8 lechones (Grupo 4). El grupo 1 fue vacunado por vía intramuscular a los 3 días de edad con 2 ml de la vacuna combi, seguido de una segunda vacunación a los 25 días de edad. El grupo 2 fue vacunado por vía intramuscular una vez con 2 ml de vacuna combi a los 25 días de edad. El grupo 3 fue vacunado por vía oral con 2 ml de Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim) a los 25 días de edad, de acuerdo con las prescripciones. El grupo 4 fue vacunado por vía intramuscular a los 3 y 25 días de edad con 2 ml de la vacuna de hidratos de carbono no proteica. El grupo 5 se dejó sin vacunar como un grupo de control de provocación. A los 46 días de edad, todos los cerdos fueron provocados por vía oral con mucosa infectada homogeneizada. Posteriormente todos los cerdos se observaron diariamente para detectar signos clínicos de enteropatía proliferativa porcina (EPP). A intervalos regulares antes y después de la provocación, se tomaron muestras de suero y heces de los cerdos para serología y PCR, respectivamente. A los 68 días de edad, todos los cerdos fueron sacrificados y se realizó la autopsia. El íleon

se examinó histológicamente.

Los otros aspectos del diseño experimental fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 2, a menos que se indique lo contrario.

RESULTADOS DEL EJEMPLO 3

Serología

1 - *Lawsonia*

Antes de la primera vacunación todos los cerdos fueron seronegativos para los títulos de anticuerpos (IFT). Después de la vacunación con la vacuna combi (grupos 1 y 2) y la vacuna de hidratos de carbono no proteicos (grupo 4), muchos cerdos desarrollaron títulos de anticuerpos (IFT) mientras que los controles y los cerdos vacunados con Enterisol® permanecieron seronegativos hasta la provocación. Después de la provocación todos los cerdos (excepto dos en el grupo Enterisol®) desarrollaron títulos de anticuerpos (IFT). Para una visión general de los valores medios obtenidos, véase la tabla 4 (debido a la dilución más alta en comparación con el ejemplo 2, el nivel de detección fue de 4,0).

Tabla 4. Media de los títulos de anticuerpos (IFT) anti-*Lawsonia* (2 log) de suero de cerdo después de la vacunación y la provocación

Grupo	T = 3 días	T = 25 días	T = 46 días	T = 67 días
1	<4,0	<4,0	7,9	10,3
2	<4,0	<4,0	4,8	9,8
3	<4,0	<4,0	<4,0	8,5
4	<4,0	<4,0	6,9	10,6

2 - *Mycoplasma hyopneumoniae*

Con respecto a Mhyo, al comienzo del experimento, así como en los días de refuerzo (25 días de edad) todos los cerdos fueron seronegativos para Mhyo. Tras la vacunación de refuerzo, el grupo 1 desarrolló títulos de anticuerpos anti-Mhyo altos, al mismo nivel de los que se obtienen con la vacuna de inducción y refuerzo disponibles comercialmente Porcilis Mhyo®. Los resultados se presentan en la Tabla 5 siguiente. Aparentemente, en estas circunstancias (administrada por vía intramuscular) sólo cuando se administra una vacuna de refuerzo, los títulos de anticuerpos a los 46 días se encuentran por encima del nivel de detección (6,0 para el método utilizado). Sin embargo, se sabe que una única vacunación con antígenos Mhyo puede proporcionar protección suficiente, en particular cuando se administra por vía intradérmica (véase, por ejemplo el documento WO 2007/103042).

Tabla 5. Media de los títulos de anticuerpos anti-Mhyo (IFT) (2 log) de suero de cerdo después de la vacunación

Grupo	T = 3 días	T = 25 días	T = 46 días
1	Por debajo del nivel de detección	Por debajo del nivel de detección	8,3
2	Por debajo del nivel de detección	Por debajo del nivel de detección	Por debajo del nivel de detección
5	Por debajo del nivel de detección	Por debajo del nivel de detección	Por debajo del nivel de detección

3 - *Circovirus porcino*

Con respecto al CVP, a los 3 días de edad, los lechones tenían títulos de anticuerpos anti-CVP maternos elevados. En el día de refuerzo (25 días de edad) los vacunados (grupo 1) tenían un título similar en comparación con el grupo 2 y el grupo control. El título de CVP a los 25 días de edad fue ligeramente inferior en comparación con el título de 3 días de edad. Después de la vacunación a los 25 días de edad, los títulos del grupo 1 (2 vacunas: en el día 3 y 25) y el grupo 2 (una vacuna en el día 25) se mantuvieron en un nivel alto, mientras que los lechones de control mostraron una disminución normal en los anticuerpos derivados de la madre. Los títulos de CVP obtenidos son comparables a los títulos obtenibles con una sola vacuna que contiene el mismo antígeno (por ejemplo, Circumvent PCV de Intervet, vacuna que proporciona una excelente protección contra el CVP). Para una visión general de los valores medios, consulte la tabla que figura a continuación.

Tabla 6. Media de títulos de anticuerpos anti-CVP (IFT) (2 log) de suero de cerdo después de la vacunación

Grupo	T = 3 días	T = 25 días	T = 46 días
1	11,5	9,6	10,1
2	12,1	9,5	10,8
5	10,9	9,1	7,0

PCR en tiempo real en muestras de heces

Tres semanas después de la provocación, los cerdos del grupo 1, 2 y 4 tenían menos *Lawsonia* (ADN) en sus heces en comparación con los grupos 3 y 5. Sólo las diferencias entre el grupo 1 y 3 (Enterisol®) y el grupo 4 y 3 fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney). Para los resultados medios, véase la tabla 7.

Tabla 7. Resultados medios de PCR en muestras de heces (log pg) después de la vacunación y la provocación

Grupo	Valor medio
1	1,0
2	1,2
3	2,0
4	0,6
5	1,8

Puntuaciones de histología

Las puntuaciones de histología del grupo 1 y 4 fueron significativamente más bajas en comparación con las de los grupos 3 y 5 ($p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney bilateral (véase el cuadro 8). El número de cerdos con EPP confirmada eran 2/13 en el grupo 1, 6/12 en el grupo 2, 12/14 en el grupo 3, 2/7 en el grupo 4 y 12/14 en el grupo 5 control. Los grupos 1 y 4 tuvieron una incidencia significativamente menor de EEP en comparación con los grupos 3 y 5 ($p < 0,05$, prueba exacta de Fischer bilateral).

Tabla 8. Puntuación media de histología para el íleon

Grupo	Puntuación HE	Puntuación IHC	Puntuación total
1	0,4	0,6	1,0
2	0,7	0,7	1,4
3	1,6	1,4	3,0
4	0,4	0,4	0,8
5	1,9	1,5	3,4

CONCLUSIÓN DEL EJEMPLO 3

De los resultados se puede concluir que el antígeno de la membrana celular externa de hidratos de carbono ofrece una protección relativamente buena contra la ileítis. También se encontró que la bacterina de la célula entera de *Lawsonia* es un buen medio para ofrecer el antígeno hidrato de carbono en una vacuna para combatir la ileítis. Además, dado el hecho de que la vacuna de combinación proporciona títulos para anticuerpos anti-Mhyo y anticuerpos anti-CVP a un nivel comparable con los niveles que se pueden obtener con las vacunas individuales disponibles que son adecuados para combatir estos microorganismos, se ha demostrado que una vacuna de combinación que comprende antígenos de *Lawsonia intracellularis* no viva en combinación con antígenos Mhyo y CVP es adecuada para combatir *Lawsonia intracellularis* así como *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende en combinación antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino y un vehículo, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* es una composición que contiene hidratos de carbono, conteniendo los hidratos de carbono que en las células de *Lawsonia intracellularis* vivas están asociados a la membrana celular externa de estas células.
2. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la vacuna está en una forma adecuada para la administración sistémica.
3. Vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** la composición que contiene el hidrato de carbono es el material resultante al matar la bacteria *Lawsonia intracellularis*.
4. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la composición que contiene el hidrato de carbono contiene células enteras de la bacteria *Lawsonia intracellularis* matada.
5. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna comprende un adyuvante de aceite en agua que contiene gotitas de aceite de tamaño sub-micrométrico.
6. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** el adyuvante comprende gotitas de aceite biodegradable y gotitas de aceite mineral, las gotitas de aceite biodegradable tienen un tamaño medio que difiere del tamaño medio de las gotitas de aceite mineral.
7. Un kit que comprende un primer envase que tiene contenido en el mismo antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, uno o más otros envases que tienen contenidos en los mismos antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de circovirus porcino e instrucciones para la mezcla de los antígenos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el circovirus porcino para formular una vacuna de combinación adecuada para la vacunación sistémica, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* es una composición que contiene hidrato de carbono, los cuales en las células de *Lawsonia intracellularis* vivas están asociados a la membrana celular externa de estas células.
8. Kit de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* y del circovirus porcino están contenidos en un envase, formulado en un adyuvante de tipo aceite en agua.
9. Una vacuna que comprende en combinación antígenos no vivos de *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino y un vehículo, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* es célula entera de *Lawsonia intracellularis* inactivada, el antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* es *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado y el antígeno del circovirus porcino es antígeno inactivado de PCV-2, para su uso en la protección contra *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y circovirus porcino.