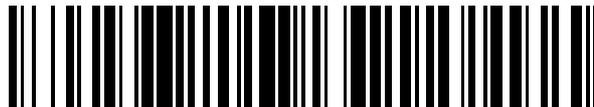


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 716**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C07K 14/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08847411 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2217271**

54 Título: **Vacuna viva avirulenta con un adyuvante contra Mycoplasma hyopneumoniae**

30 Prioridad:

06.11.2007 US 985811 P

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

18.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 577 716 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 viva avirulenta con un adyuvante contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere, en general, a los campos de la inmunología y la medicina veterinaria. Más específicamente, la presente divulgación provee composiciones vivas avirulentas con coadyuvante, de *M. hyopneumoniae* con base en una cepa J de *M. hyopneumoniae* que tiene el número de acceso al Genbank AE 107243, incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacuna, que ayudan en la reducción de la severidad y/o en la prevención de la enfermedad causada por una o más cepas virulentas de *M. hyopneumoniae*. También se proveen composiciones avirulentas vivas con adyuvante de *M. hyopneumoniae*,
10 incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacunas, que comprenden vacuna viva modificada de quimera tipo 1–tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2). La administración de una o dos dosis a un animal de una composición avirulenta viva con adyuvante de *M. hyopneumoniae* divulgada en la presente memoria es efectiva en proveer inmunidad, incluyendo inmunidad mediada por células y/o inmunidad humoral, frente a infección con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.

15 Antecedentes de la invención

El *Mycoplasma hyopneumoniae* (también denominado como *M. hyopneumoniae*) es el agente etiológico de la neumonía micoplasmática en cerdos. La enfermedad produce tos crónica, pelambre opaca, crecimiento retardado y apariencia no saludable que dura varias semanas. Las lesiones características de áreas de consolidación púrpura a grises, particularmente en los lóbulos ventral apical y cardiaco se observan en
20 animales infectados. Aunque la enfermedad produce poca mortalidad, frecuentemente los cerdos afectados son susceptibles de infecciones secundarias por patógenos oportunistas, dando como resultado la muerte o el estrés (R. F. Ross, *Mycoplasmal diseases*, pp. 436-444, in A. D. Laman, et al., (eds.) *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, 1986).

Se cree que la enfermedad es una de las causas más importantes de pérdida asociadas con enfermedades en cerdos (Whittlestone, pp. 133-176, in Tully and Whitcomb (eds.), *The Mycoplasma Vol 2: Human and Animal Mycoplasmas*, New York, Academic Press, (1979)). La enfermedad generalmente da como resultado animales con ganancia de peso insuficiente, de bajo crecimiento y enfermizos. También, los cerdos afectados son susceptibles de infecciones secundarias por organismos oportunistas (Burch, *Pig America* pp. 26-27, December, 1982). El impacto económico de la enfermedad es significativo. Solo las pérdidas económicas han
30 sido estimadas entre 200 a 250 millones de dólares anualmente.

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacteria de crecimiento lento, problemática, que carece de pared celular. Frecuentemente es difícil de aislar del tracto respiratorio debido al *Mycoplasma hyorhinis*, un agente secundario común también localizado en el tracto respiratorio. La enfermedad es dispersada por pulverización, producida por la tos, y por contacto directo de un cerdo portador afectado o convaleciente. La
35 convivencia de animales infectados con animales no infectados da como resultado una reinfección temprana y frecuente. La infección se inicia frecuentemente con la infección de lechones por cerdas portadoras en parto. La infección frecuentemente se inicia con la infección de lechones por cerdas portadoras durante el parto.

Debido a las técnicas de manejo de rebaños, la infección puede no hacerse evidente hasta más adelante en la vida. La enfermedad manifiesta se observa usualmente después del destete cuando los cerdos son agrupados. La aparición de la enfermedad se observa normalmente en cerdos a las seis semanas de edad o más. Las tasas de crecimiento y las tasas de conversión de alimento se reducen marcadamente en los animales afectados. Los tratamientos existentes utilizando antibióticos son costosos y requieren uso prolongado. La reinfección de los animales sigue siendo un problema.

45 Así, las vacunas son actualmente el método más efectivo para evitar infecciones y sus consecuencias. Ha habido numerosos intentos de proveer una vacuna para proteger los cerdos contra la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Varios investigadores han divulgado vacunas que comprenden antígenos de superficie producidos de forma recombinante de *Mycoplasma hyopneumoniae*, Schaller et al., Patente de los Estados Unidos No. 4.894.332, expedida el 16 de enero de 1990; Publicación de Patente Europea No. 283.840, publicada el 28 de septiembre de 1988, Publicación PCT No. WO 86/00019, publicada el 3 de enero
50 de 1986, divulga una vacuna para *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende exclusivamente membranas de plasma de *Mycoplasma hyopneumoniae*, libres de otros componentes celulares. Etheridge et al., *Res. Vet. Sci.* 33:188 (1982), encuentran una protección incompleta contra la colonización de pulmones por *Mycoplasma hyopneumoniae* cuando se administró una vacuna viva por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Kristensen et al., *Am. J. Vet. Res.* 42:784 (1981), no encontraron protección de los cerdos
55 contra la neumonía del *Mycoplasma* después de la inyección con *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada por calor. Ross et al., *Am. J. Vet. Res.* 45:1899 (1984), encontró que el uso de extractos de *Mycoplasma hyopneumoniae* o preparados mediante un procedimiento de congelación-descongelación para inmunizar

cerdos, suministró solamente protección variable, y en algunos casos, el desarrollo de lesiones potenciadas se notó en cerdos inmunizados. Estos investigadores también estudiaron una vacuna con células completas preparada por inactivación con formalina. La inactivación con formalina ocultó significativamente la inmunogenicidad protectora de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y esta vacuna no fue efectiva. Yoshioka et al., Patente de los Estados Unidos No. 3.917.819 (expedida el 4 de noviembre de 1975) divulga varias vacunas de *Mycoplasma* muerto que comprendía *Mycoplasma* inactivado con formalina, incluyendo una vacuna inactivada para *Mycoplasma hyopneumoniae*. La publicación de Patente Europea de Chung-Nan 571.648 divulga una vacuna de *M. hyopneumoniae* con base en la cepa PRIT-5 altamente proliferativa y antigénica. La WO 02/10343 divulga bacterias de *M. hyopneumoniae* vivas, sensibles a la temperatura que se emplean directamente como vacuna.

Hay disponibles comercialmente vacunas basadas en cepas virulentas inactivadas de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La Fort Dodge Animal Health (FDAH) comercializa bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* bajo el nombre *Mycoplasma hyopneumoniae* Suvaxyn® y Respifend® para uso como vacuna para proteger cerdos saludables contra signos clínicos causados por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Está vacuna de bacterina es recomendada como una vacuna en dos dosis para cerdos de al menos una semana de edad, con la segunda dosis a las dos o tres semanas después de la primera vacunación.

La cepa J de *M. hyopneumoniae* es una cepa no patógena con capacidad reducida para adherirse a los cilios porcinos, y, por lo tanto, para causar enfermedad. Castro et al., Veterinary Microbiology 116:258-269 (2006) and Vasconcelos et al., J. Bacteriol. 187(16):5568-5577 (2005) (que describe la secuencia genómica completa de la cepa J de *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934)). Las comparaciones genómicas entre las cepas patógenas y no patógenas (cepa J) han revelado variaciones en las proteínas de superficie, incluyendo la adhesina del cilio, que se consideran como determinantes de las propiedades patógenas relativas entre las cepas de *M. hyopneumoniae*. Vasconcelos et al. (2006) and Djordjevic et al., Infection and Immunity 72(5):2791-2802 (2004).

La *M. hyopneumoniae* expresa, sobre su superficie celular, lipoproteínas de membrana, particularmente las proteínas P46, P65, y P97, las cuales portan determinantes antigénicos específicos de la especie. Recientemente, Bouh et al. describieron anticuerpos monoclonales para P46 y P65 de la cepa J de referencia avirulenta viva de *M. hyopneumoniae* ATCC 25934. Clin. Diag. Lab. Immunology 10(3):459-468 (2003). Blank y Stemke describieron un mapa físico y genético del genoma de la cepa J de *M. hyopneumoniae*, Can. J. Microbiol. 46:832-840 (2000), y Wilton et al. describieron el tamizaje de genotecas de expresión generadas a partir de la cepa J no patógena de *M. hyopneumoniae* y el tamizaje de estas genotecas con antisuero hiperinmune porcino contra *M. hyopneumoniae*.

Existe la necesidad de composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacuna, hechas a partir de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo con adyuvante, composiciones que proveen eficacia contra cepas virulentas de *M. hyopneumoniae*. La mención de cualquier referencia en la presente memoria no debe considerarse como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior de la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención provee composiciones inmunogénicas (o composiciones de vacunas), que comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de un *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 95% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de una cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* de referencia que tiene el número de acceso al Genbank AE017243 y un adyuvante biológicamente aceptable el cual es aceite SP en donde el aceite SP comprende de 1% a 3% vol/vol de un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; 2% a 6% vol/vol de escualano; 0,1% a 0,5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina regulada.

Las composiciones divulgadas en la presente memoria provocan una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, previniendo y/o minimizando por lo tanto la severidad de la enfermedad causada por este organismo o mejorando al menos un síntoma asociado con la enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención provee una composición inmunogénica para uso en la protección de un animal contra una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo dicha composición una cantidad inmunológicamente efectiva de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y aceite SP, comprendiendo el aceite SP de 1% a 3% vol/vol de un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; 2% a 6% vol/vol de escualano; 0,1% a 0,5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina regulada; en la que una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de una cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* de referencia que tiene el número de acceso al Genbank AE017243.

En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 99% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de la cepa J de referencia.

5 El porcentaje de homología de la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria se determina por comparación con una cepa J de referencia avirulenta que tiene número de acceso ATCC 25934 (número de acceso al GenBank AE017243) o 27715. Alternativamente, la cepa de referencia puede ser una cepa que es una cepa virulenta, por ejemplo, las que tienen números de acceso ATCC 25617 o 25095.

10 Preferiblemente, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria es una cepa J designada como número de acceso ATCC 25934 o 27715.

Preferiblemente, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria es una cepa J designada como número de acceso ATCC 27715.

15 La respuesta inmune provocada por una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una composición inmunogénica de la presente invención protege un animal contra la infección con, o reduce la severidad y al menos un síntoma asociado con una infección por una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La administración en una dosis a un animal de una composición inmunogénica viva avirulenta con adyuvante de *M. hyopneumoniae* divulgada en la presente memoria es efectiva para suministrar inmunidad al animal frente a una infección por *Mycoplasma*.

20 La administración en dos dosis a un animal de una composición inmunogénica viva avirulenta con adyuvante de *M. hyopneumoniae* divulgada en la presente memoria es efectiva para proveer inmunidad al animal frente a infección por *Mycoplasma*.

25 Las composiciones (vacunas) inmunogénicas vivas avirulentas con adyuvante de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la presente invención pueden ser empleadas de manera adecuada para uso en cerdos contra la infección y la enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* y encontrará utilidad en el manejo y/o prevención de la dispersión de la infección y enfermedad causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae* en poblaciones de cerdos.

30 Así, las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacunas de la presente invención emplean uno o más *Mycoplasma hyopneumoniae* vivos avirulentos en combinación con un adyuvante biológicamente aceptable el cual es aceite SP. También se divulgan en la presente memoria como adyuvantes biológicamente aceptables SL-CD, un polímero del ácido acrílico (tal como Carbopol[®], Noveon, Inc., Cleveland, OH), y una mezcla de un aceite metalizable tal como uno o más hidrocarburos terpénicos, por ejemplo escualeno o escualano, y un copolímero de bloque de polietileno-polipropileno tal como Pluronic[®] (BASF, Florham Park, New Jersey).

35 La concentración del adyuvante empleado en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza del adyuvante. Los adyuvantes están presentes típicamente en las composiciones descritas en la presente memoria a una concentración final de aproximadamente 1-50% (v/v) y más típicamente a una concentración final de aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, o 30% (v/v). En composiciones que comprenden aceite SP, el adyuvante está presente típicamente entre aproximadamente 1% y
40 aproximadamente 25% (v/v), más típicamente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15% (v/v) tal como, por ejemplo, a aproximadamente 10% (v/v).

Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente memoria pueden emplear, en combinación adicional, una o más otras bacterias vivas, bacterina, toxoides y/o antígenos virales. Así, dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, la composición viva avirulenta con adyuvante de *M. hyopneumoniae* puede comprender una cantidad inmunológicamente efectiva de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento y aceite SP en combinación adicional con (a) una o más bacterias vivas; (b) una o más bacterinas; (c) uno o más toxoides purificados de uno o más patógenos tales como, por ejemplo, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacterias leptospiras; y/o
45 (d) uno o más antígenos virales en los cuales el virus es seleccionado del grupo consistente de virus de la influenza porcina (SIV), virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRSV), virus de la viruela de mapache que expresa PRRS y/o otros antígenos, PRRS y/o otros antígenos que expresan TGEV, y circovirus porcino (PCV). Dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, se ejemplifican en la presente memoria composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas o composiciones de vacunas, las cuales emplean,
50 en combinación adicional, vacuna viva modificada con quimera Tipo 1 – Tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2). Dentro de estas u otras realizaciones alternativas, las composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacuna, pueden incluir adicional u opcionalmente un conservante y un estabilizador tales como por ejemplo, SGGK, timerosol y/o EDTA.

La concentración de tales otras bacterias, bacterina, toxoides y/o antígenos virales empleados en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza de las bacterias vivas, bacterina, toxoides y/o antígeno viral y están presentes típicamente en las composiciones descritas en la presente memoria. Para tales composiciones en las cuales el otro antígeno es bacteriano, las bacterias están presentes típicamente a una concentración final de entre aproximadamente $0,5 \times 10^5$ hasta $0,5 \times 10^{10}$ por mililitro. Alternativamente, las bacterias están presentes a una concentración final de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ hasta $0,5 \times 10^9$ por mililitro o a una concentración final de entre aproximadamente $0,5 \times 10^7$ hasta $0,5 \times 10^8$ por mililitro.

También se divulgan en la presente memoria composiciones inmunogénicas para uso en la generación de una respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para proteger un animal contra la enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o para prevenir o mejorar la aparición de tal enfermedad entre poblaciones animales administrando una composición viva avirulenta con adyuvante de *Mycoplasma hyopneumoniae* tal como se describe en la presente memoria. En un aspecto relacionado, la presente divulgación también provee composiciones inmunogénicas para uso en la protección de un animal contra una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad potenciando una respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tales usos comprenden las etapas de administrar a un animal, tal como un cerdo, en una o dos dosis, una composición que comprende una o más cepas vivas avirulentas con adyuvante de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En una realización las composiciones inmunogénicas de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene aproximadamente 95% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de una cepa J de referencia.

En una realización las composiciones inmunogénicas de la presente invención utilizan una cepa avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene aproximadamente 99% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de una cepa J de referencia.

En una realización, la cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizada en las composiciones inmunogénicas de la invención, tal como se describe en la presente memoria, es una cepa J designada con el número de acceso ATCC 25934 o 27715.

En una realización, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones inmunogénicas de la invención, tal como se describen en la presente memoria, es una cepa J designada como número de acceso ATCC 27715.

En una realización, la invención provee una composición inmunogénica para uso en la protección de un animal contra una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad potenciando una respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo esa potenciación las etapas de:

a) en un primer momento, administrar una primera composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulenta viva complementada con un material adyuvante biológicamente aceptable para un animal;

b) en un segundo momento, administrar una segunda composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de un avirulento vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene como adyuvante un material adyuvante biológicamente aceptable para un animal.

En ciertas realizaciones, dependiendo de la aplicación precisa contemplada, las composiciones pueden ser administradas por vía parenteral, por ejemplo a través de inyección intramuscular, subcutánea o intraperitoneal, o por aplicación tópica de una crema. Alternativamente, las composiciones pueden ser administradas a través de rutas por aerosol intranasal, u oral, tal como aspersión intranasal o administración oral o administración con la mano o aplicación de masa.

Un tercer aspecto de la invención provee el uso de composiciones inmunogénicas que comprenden las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* descritas en la presente memoria para tratar un animal que sufre de una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* o sufren de al menos un síntoma asociado con una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones anexas que se presentan en la presente memoria a continuación.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir las presentes composiciones inmunogénicas y su uso en métodos de metodologías de tratamiento, debe entenderse que esta invención no está limitada a métodos particulares, y a las condiciones

experimentales descritas, puesto que tales métodos y condiciones pueden variar. También se entiende que la terminología usada en la presente memoria es para propósitos de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante.

5 Tal como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, referencias a “el método” incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente memoria y/o que serán evidentes para las personas experimentadas en la técnica al leer esta divulgación y así sucesivamente.

10 De acuerdo con lo anterior, en la presente solicitud, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (en la presente memoria “Sambrook et al., 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

20 Aunque pueden utilizarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Definiciones

25 Los términos usados en la presente memoria tienen los significados reconocidos y conocidos por los experimentados en la técnica, sin embargo, por conveniencia y exhaustividad, se definen a continuación términos particulares y su significado.

30 El término “alrededor” o “aproximadamente” significa dentro de un rango estadísticamente significativo de un valor. Tal rango puede estar dentro de orden de magnitud, típicamente dentro del 50%, más típicamente dentro del 20%, más típicamente todavía dentro del 10%, y aún más típicamente dentro del 5% de un valor o rango dado. La variación permisible abarcada por el término “alrededor de” o “aproximadamente” depende del sistema particular bajo estudio y puede ser apreciada fácilmente por una persona de experiencia en la técnica.

35 “Adyuvante” significa una composición que comprende una o más sustancias que potencian la antigenicidad del *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento en una composición, típicamente una composición de vacuna. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que lentamente libera el antígeno y también como un activador del sistema linfóide y que potencia de manera no específica la respuesta inmune (Hood, et al., *Immunology*, Second Ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Frecuentemente, una vacuna primaria con un antígeno solo, en la ausencia de un adyuvante, fallará en provocar una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias con actividad superficial tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite o hidrocarburos, hemocianinas de lapa y adyuvantes humanamente potencialmente útiles tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvantes es aceptable biológicamente.

45 Los adyuvantes empleados en las composiciones descritas en la presente memoria son típicamente “adyuvantes biológicamente aceptables” y, así, pueden ser utilizados en combinación con *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo de tal manera que las composiciones resultantes puedan ser administradas *in vivo* sin toxicidad concomitante a un animal. Se ejemplifican en la presente memoria composiciones que incluyen *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo en combinación con uno o más adyuvantes biológicamente aceptables seleccionados del grupo consistente de aceite SP, SL-CD, Carboxpol, y una mezcla de un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos terpénicos insaturados, por ejemplo escualeno o escualano, y un copolímero de bloque de polioxitileno-polipropileno, tal como Pluronic®.

55 Una cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* o una molécula de la misma es “antigénica” cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor antígeno de células T. Típicamente, una molécula antigénica es un polipéptido, o una variante del mismo, que contiene un “epitopo” de al menos cinco y típicamente de al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Una porción antigénica de un polipéptido, denominada también en la presente memoria el “epitopo”, puede ser aquella porción que es

inmunodominante para el reconocimiento del anticuerpo o del receptor de células T, o puede ser una porción usada para generar un anticuerpo a la molécula conjugando a la porción antigénica a un polipéptido portador para inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunogénica por sí misma, esto es, capaz de provocar una respuesta inmune sin un portador.

5 El término "al menos" significa no menos de.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "bacterina" es una bacteria recolectada que ha sido inactivada y que, en combinación con ciertos adyuvantes, puede provocar inmunidad protectora para proteger contra una enfermedad o infección cuando se administra a animales.

10 Los polímeros de ácido acrílico son típicamente carbómeros. Los carbómeros están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial "Carbopol" y están descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 2.909.462 y 3.790.665.

15 El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, estabilizador, conservante y/o vehículo con el cual se administra un compuesto o composición. Tales portadores pueden ser líquidos o estériles tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético. Tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Agua o soluciones salinas en solución acuosa, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato. Soluciones de Ringer y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean frecuentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. El portador o diluyente debe ser no tóxico y debe no afectar la actividad biológica del antígeno/inmunógeno. Otras sustancias auxiliares adicionales, tales como agentes humectantes o emulsificantes, surfactantes, sustancias reguladoras del pH y similares también pueden utilizarse en la composición de la invención. Los conservantes pueden incluir, por ejemplo, timerosol y/o EDTA. Portadores farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 18th Edition. Una amplia variedad de portadores son bien conocidos en la técnica y la selección de portadores específicos está bien enmarcada dentro del nivel de los experimentados en la técnica.

25 El término "unidad formadora de colonias" o "CFU" es una unidad de medida utilizada para indicar el número de organismos capaces de replicación en una muestra dada. Esto se basa en la teoría de que una colonia es derivada de la replicación de una célula de bacteria en pareja/racimo o individual

30 La "cantidad inmunológicamente efectiva" es la cantidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo que provocará una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. La "cantidad inmunológicamente efectiva" dependerá de la especie, variedad, edad, tamaño, estado de salud del animal receptor y será influenciada por la exposición previa del animal a una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* si esa o más cepas son una cepa virulenta o una cepa avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad inmunológicamente efectiva" de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulenta viva, cuando se emplea en combinación con un adyuvante adecuado, es aquella cantidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* que es suficiente para potenciar la inmunogenicidad del *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo y así proveer la inmunidad protectora contra la carga con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Una cantidad inmunológicamente efectiva es un mínimo de aproximadamente 1×10^3 organismos. Alternativamente, una cantidad inmunológicamente efectiva varía desde aproximadamente 1×10^3 unidades formadoras de colonia/ml (CFU/ml) hasta aproximadamente 1×10^7 CFU/ml. Alternativamente, una cantidad inmunológicamente efectiva es aproximadamente 5×10^7 CFU/ml.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunogénico" significa que el *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo es capaz de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular. Una cepa inmunogénica también es antigénica. Una composición inmunogénica es una composición que provoca una respuesta inmune humoral y/o celular cuando se administra a un animal.

50 El término "composición inmunogénica" relaciona cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo un microorganismo, composición que puede ser utilizada para provocar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune puede incluir una respuesta a células T, una respuesta a células B, o ambas o tanto una respuesta a células T como a células B. La composición puede servir para sensibilizar el mamífero por la presentación de antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. Además, los linfocitos T o anticuerpos específicos del antígeno pueden ser generados para permitir la protección futura de un huésped inmunizado. Una "composición inmunogénica" puede contener una vacuna viva, atenuada o muerta/inactivada que comprende un microorganismo completo o una porción inmunogénica derivada del mismo que induce bien sea una respuesta inmune mediada por células (células T) o una respuesta inmune mediada por un anticuerpo (células B), o ambas, o puede proteger el animal de uno o más síntomas asociados con infección por el microorganismo, o puede proteger el animal de la muerte debida a la infección con el microorganismo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" significa que el material referenciado es retirado de su ambiente nativo. Así, un material biológico aislado puede estar libre de algunos o todos los componentes celulares, esto es, componentes de las células en las cuales el material nativo se presenta de manera natural (por ejemplo, componentes citoplasmáticos o de membranas). Un material está aislado si está presente en un extracto o sobrenadante celular. Una proteína aislada puede estar asociada con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los cuales se asocian las células, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un organelo, célula o tejido aislado se retiran del sitio anatómico en el cual se encuentran en un organismo. Un material aislado puede ser, pero no necesita serlo, purificado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "MHDCE" designa equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* y se define como una unidad de medida utilizada para determinar el número aproximado de organismos de *Mycoplasma hyopneumoniae* presentes en una muestra dada.

El término "administración parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria significa la administración por algunos medios diferentes a pasar a través del tracto gastrointestinal, particularmente administración de sustancias en un organismo por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, o intramedular, pero también a otras rutas de administración no orales y no nasales tales como inyección intraperitoneal o aplicación tópica.

El término "purificado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, esto es, contaminantes, incluyendo materiales nativos de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, una bacteria o proteína purificada está sustancialmente libre de células huésped o componentes de cultivo, incluyendo cultivo de tejidos o proteínas de huevo, patógenos no específicos, y similares. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sustancialmente libre" se utiliza operativamente, en el contexto de las pruebas analíticas del material. Típicamente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50% puro; más típicamente al menos 90% puro, y más típicamente todavía al menos 99% puro. La pureza puede ser evaluada por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayos, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica. Los métodos para purificación son bien conocidos en la técnica. El término "sustancialmente puro" indica el grado más alto de pureza que puede ser alcanzado utilizando técnicas de purificación convencionales conocidas en la técnica.

Una "cepa de referencia" se refiere a una cepa de microorganismo, por ejemplo *Mycoplasma hyopneumoniae*, que se obtiene a partir de una fuente confiable y que puede ser utilizada como una cepa de control con la cual pueden hacerse comparaciones con otros cultivos no establecidos o desconocidos. En la presente invención, las cepas de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden ser cepas J avirulentas que son obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y a las que se asignan números de acceso ATCC 25934 y 27715. En la presente invención, estas "cepas de referencia" que tienen números de acceso ATCC 25934 o 27715 también han sido utilizadas para preparar las composiciones inmunogénicas de la invención. En otras ciertas realizaciones de la presente invención, las cepas de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden ser obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y reciben la asignación de números de acceso ATCC 25617 y 25095.

El término "SL-CD" se refiere a una sulfolipociclodextrina que cabe dentro de la familia de los adyuvantes de ciclodextrina descritos en las Patentes de los Estados números 6.610.310 y 6.165.995. Típicamente, la SL-CD se formula en una mezcla con un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos terpénicos insaturados, por ejemplo, escualeno y preferiblemente un surfactante no iónico, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano.

El término "aceite SP" se refiere a un adyuvante que es una emulsión en aceite que comprende: 1% a 3% vol/vol de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; 2% a 6% vol/vol de escualano; 0,1% a 0,5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina regulada.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", los cuales se utilizan indistintamente, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune en un animal. Una vacuna o composición de vacuna puede proteger el animal frente a una enfermedad o posible muerte debida a una infección, y puede o puede no incluir uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender adicionalmente componentes adicionales típicos para las vacunas o composiciones de vacunas, incluyendo, por ejemplo, un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunogénicamente activo de una vacuna puede comprender organismos vivos completos bien sea en su forma original, o como organismos atenuados en una vacuna viva modificada, o más componentes inmunogénicos del virus, o vacunas manipuladas genéticamente mutadas o clonadas preparadas por métodos conocidos para los experimentados en la técnica. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos más arriba.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "virulento" se refiere a la capacidad de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* para producir la enfermedad asociada con infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La virulencia puede ser evaluada observando la progresión de la enfermedad en el animal. Un ejemplo de una cepa "virulenta" de *Mycoplasma hyopneumoniae* es la ejemplificada por la cepa de carga de *Mycoplasma hyopneumoniae*, tal como se describe y utiliza en la presente invención. Otras cepas virulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae* están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), designada como cepa No. 25617 o 25095. El término "avirulento" se refiere a cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* que carecen de virulencia. Esto es, cepas, aislados o constructos avirulentos son no patogénicos y son incapaces de producir enfermedad. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "avirulento" se utiliza como sinónimo con el término "no virulento." Se ejemplifican en la presente memoria composiciones que emplean la cepa J de cultivo vivo avirulento de *M. hyopneumoniae* (línea 1 de FCX3, la cual está disponible del American Type Culture Collection (ATCC) como cepa No. 27715). Otra cepa "avirulenta" que también está disponible de la ATCC está designada como cepa No. 25934. La cepa J designada como número de acceso ATCC 27715 fue clonada a partir de la cepa J original designada con el número de acceso ATCC 25934, tal como se describe en el catálogo de la ATCC.

Descripción general

La presente divulgación se basa en el descubrimiento de que regímenes de una o dos dosis de una composición de *Mycoplasma hyopneumoniae*, incluyendo una composición inmunogénica o una composición de vacuna, utilizando uno o más *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulentos vivos, tales como, por ejemplo, la cepa J (línea 1 de FCX3; nº de acceso a ATCC 27715) y uno o más adyuvantes, típicamente un adyuvante biológicamente aceptable, son efectivos en la protección contra y/o prevención o mejora de la enfermedad asociada con infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* virulenta.

En una realización, otras cepas avirulentas vivas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que incluyen, pero no se limitan a, cepas J, cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tienen al menos aproximadamente 95% de homología, o al menos aproximadamente 99% de homología, con una referencia de cepa J, se contemplan para uso en las composiciones para uso en los métodos de tratamiento de la presente invención.

La cepa J de referencia puede ser seleccionada de las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* designadas con los números de acceso ATCC 25934 o 27715.

La cepa J avirulenta viva utilizada en las composiciones para uso en los métodos de tratamiento de la presente invención es una cepa J designada con los números de acceso ATCC 25934 o 27715.

La cepa J avirulenta viva usada en las composiciones para uso en los métodos de tratamiento de la presente invención es una cepa J designada con el número de acceso ATCC 27715.

También se divulgan en la presente memoria que las composiciones, que incluyen composiciones de vacuna, que emplean una o más cepas avirulentas vivas de *Mycoplasma hyopneumoniae* en combinación adicional con la vacuna viva modificada de quimera Tipo 1-Tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2) (Véase Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0170270 y número 2004/0253270) también son efectivas en la protección contra y/o prevención o mejora de la enfermedad asociada con infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* virulenta y/o infección por circovirus porcino virulento.

En ciertas realizaciones, las composiciones para uso de la invención comprenden adicionalmente una o más bacterias vivas, bacterinas y/o uno o más toxoides purificados seleccionados del grupo consistente de *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y bacterias leptospira.

En ciertas realizaciones, las composiciones para uso de la invención comprenden adicionalmente uno o más antígenos virales seleccionados del grupo consistente de un antígeno del virus de influenza porcino (SIV), un antígeno del virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRSV), PRRS que expresa virus de viruela de mapache u otros antígenos, PRRS que expresa TGEV u otros antígenos, y un antígeno de circovirus porcino (PCV).

Dentro de ciertas realizaciones, la presente divulgación se describe de en la presente memoria en adelante con referencia a la protección contra la infección con un homogenizado de pulmón designado como LI-34 que contiene la cepa 11 de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulenta (véase J. Clin. Microbiol. 1999 Mar; 37(3):620-7). Sin embargo, se contempla que las composiciones divulgadas en la presente memoria serán efectivas en la protección contra y/o prevención o mejora de la enfermedad o al menos un síntoma asociado con la enfermedad que está asociada con un amplio rango de infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* virulenta. Numerosos aislados virulentos de *Mycoplasma hyopneumoniae* son conocidos en la técnica y están disponibles de diversas fuentes incluyendo la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852. Ejemplos de estas cepas virulentas incluyen, pero no se limitan a, los números de acceso ATCC 25095, 27714 y 25617.

Las composiciones, en particular las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, de la presente divulgación pueden prepararse a partir de cultivos liofilizados o recién recolectados de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento vivo por una o más metodologías que están fácilmente disponibles en la técnica. Se ejemplifican en la presente memoria composiciones que comprenden la cepa J de *M. hyopneumoniae* virulenta viva (línea 1 de FCX3) la cual está disponible como ATCC número 27715 (un aislado filtrado y clonado 3 veces del número ATCC 25934).

El *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo puede ser cultivado por la metodología descrita en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.338.543 y 5.565.205. Más específicamente, el *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser propagado en medio de cultivo tal como medio PPLO completo (organismo similar a pleuroneumonía) (Difco; Becton Dickinson and Company, San José, California). El crecimiento del organismo es monitorizado por técnicas estándar tales como la determinación de las unidades de cambio de color (CCU), y recolectado cuando se haya alcanzado un título suficientemente alto. Las preparaciones de reserva pueden ser concentradas o liofilizadas posteriormente, por métodos convencionales antes de la inclusión en las formulaciones de la composición. También pueden emplearse otros métodos, tales como los descritos en Thomas et al., Agri-Practice 7(5):26-30.

Las condiciones bajo las cuales se cultiva un aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden variar dependiendo de la composición precisa del medio y del aislado específico que está siendo cultivado. Los aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae* son cultivados típicamente desde aproximadamente 48 horas hasta aproximadamente 144 horas, medidas desde el tiempo de incubación hasta el momento de la recolección.

Dependiendo de la composición precisa que va ser formulada, el *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser concentrado por ejemplo, por ultracentrifugación o ultrafiltración. El *Mycoplasma hyopneumoniae* concentrado puede ser recuperado por la metodología conocida en la técnica y puede ser mezclado con un portador adecuado fisiológicamente aceptable –típicamente un medio acuoso tal como, por ejemplo, solución salina, solución salina regulada con fosfato (PBS), medio esencial mínimo (MEM) o MEM con regulador HEPES. Puede ser combinado adicionalmente con un adyuvante apropiado para proveer la concentración deseada en una base de volumen por volumen (v/v). Las composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más quelantes, tales como EDTA, típicamente a una concentración de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,20% (p/v). Alternativamente, la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* que va a ser utilizada en las composiciones inmunogénicas o de vacuna puede ser concentrada como se describió más arriba, o liofilizada y resuspendida en un adyuvante apropiado a la concentración deseada en una base de peso por volumen (p/v).

Como se indicó anteriormente, las composiciones, incluyendo las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, de la presente divulgación comprenden en general una cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* en combinación con uno o más adyuvantes, al menos un adyuvante que es el adyuvante de Aceite SP biológicamente aceptable.

Para la administración en una dosis, las composiciones pueden contener una cantidad del *Mycoplasma pneumoniae* avirulento vivo correspondiente a aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 3×10^{11} MHDCE/ml. Alternativamente, las composiciones pueden contener una cantidad de *Mycoplasma pneumoniae* avirulento vivo correspondiente a aproximadamente 1×10^9 hasta aproximadamente 3×10^9 MHDCE/ml. Las composiciones se formulan de tal manera que cada dosis de administración estará entre aproximadamente un (1) ml y aproximadamente cinco (5) ml, o entre aproximadamente dos (2) ml, por animal para administración intramuscular, subcutánea o intraperitoneal y entre aproximadamente uno (1) y aproximadamente diez (10) ml, o entre aproximadamente dos (2) y aproximadamente cinco (5) ml, para administración oral o intranasal.

Para una administración en dos dosis, las composiciones contienen típicamente una cantidad de *Mycoplasma pneumoniae* avirulento vivo de aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 3×10^{11} MHDCE/ml, más típicamente aproximadamente 1×10^9 hasta aproximadamente 3×10^9 MHDCE/ml. En ciertas realizaciones para la administración en dos dosis, las composiciones pueden contener una cantidad de *Mycoplasma pneumoniae* avirulento vivo que contiene aproximadamente 10^3 CFU/ml hasta 10^{11} CFU/ml. Las composiciones se formulan de tal manera que cada dosis de administración estará entre aproximadamente un (1) ml y aproximadamente cinco (5) ml, preferiblemente aproximadamente dos (2) ml por animal para administración intramuscular, subcutánea o intraperitoneal y entre aproximadamente uno (1) y aproximadamente diez (10) ml, típicamente entre aproximadamente dos (2) y aproximadamente cinco (5) ml para administración oral o intranasal.

La mezcla adyuvante para uso en las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna de la presente invención potencia la respuesta inmune estimulando las respuestas inmunes mediadas por células y/o locales (IgA secretado). El adyuvante biológicamente aceptable consiste de Aceite SP.

La concentración de adyuvante empleado en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza del adyuvante. Los adyuvantes están presentes típicamente en las composiciones en la

presente memoria descritas a una concentración final de aproximadamente 1-50% y más típicamente a una concentración final de aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, o 30%. La concentración del antígeno en el adyuvante puede ser preparado sobre una base de peso por volumen (p/v) o una base de volumen por volumen (v/v). Por ejemplo, el antígeno que va a ser suministrado en las composiciones de la invención puede ser preparado de forma liofilizada, seguido por la reconstitución del adyuvante directamente para dar como resultado las concentraciones especificadas sobre una base de peso por volumen. Alternativamente, el antígeno puede ser reconstituido primero en un diluyente apropiado (por ejemplo, un regulador) al cual se agrega entonces un adyuvante en un volumen suficiente para dar como resultado la concentración final deseada tanto de antígeno como de adyuvante sobre una base de volumen por volumen, como se describió más arriba.

Un adyuvante puede ser administrado con el antígeno/inmunógeno, una composición sencilla o puede ser administrado antes, concurrente con, o después de la administración del antígeno/inmunógeno.

La selección del adyuvante depende de la estabilidad del antígeno/inmunógeno que contiene el adyuvante, la ruta de administración, la programación de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que están siendo vacunadas y también debe ser aprobado para uso en animales o humanos por los cuerpos reguladores pertinentes.

En composiciones que comprenden Aceite SP, el adyuvante está presente típicamente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 25% (v/v), más típicamente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15% (v/v) tal como, por ejemplo, a aproximadamente 10% (v/v); en composiciones que comprenden un polímero de ácido acrílico y una mezcla de un aceite metabolizable que comprende uno o más hidrocarburos terpénicos y un copolímero de bloque polioxietileno-polipropileno, la relación del polímero de ácido acrílico a la mezcla de aceite metabolizable/copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno está típicamente en una relación de entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:50. Un aceite metabolizable, un copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno y un polímero de ácido acrílico pueden ser empleados en la forma de una emulsión de aceite en agua en donde los polímeros de ácido acrílico se emplean típicamente a una concentración de entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 10 g/l; los aceites metabolizables se emplean típicamente a una concentración de entre aproximadamente 2 ml/l y aproximadamente 6 ml/l; y los copolímeros de bloque de polioxietileno-propileno se emplean típicamente a una concentración de entre aproximadamente 1 ml/l y aproximadamente 3 ml/l.

Mezclas adyuvantes adecuadas de ejemplo incluyen, pero no se limitan, a mezclas de uno o más polímeros de ácido acrílico con una mezcla de aceite metabolizable, por ejemplo un hidrocarburo terpénico insaturado o un producto de hidrogenación del mismo, preferiblemente escualeno (2,3,10,15,19,23-hexametil-tetracosano) o escualeno, y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno. Tal polímero de ácido acrílico puede ser un homopolímero o un copolímero.

Los polímeros de ácido acrílico son típicamente carbómeros. Los carbómeros están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial de Carbopol y están descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 2.909.462 y 3.790.665.

Los copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno son surfactantes, típicamente surfactantes líquidos, los cuales ayudan en la suspensión de componentes sólidos y líquidos. Los surfactantes están disponibles comercialmente como polímeros bajo el nombre comercial Pluronic[®]. El poloxámero surfactante 401 está disponible comercialmente bajo el nombre comercial de Pluronic[®] L121.

La mezcla adyuvante puede comprender un aceite metabolizable, un polímero de ácido acrílico y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno formulado como una emulsión en un medio acuoso. La mezcla adyuvante puede incluir un aceite metabolizable y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno tal como una mezcla de escualeno y Pluronic[®] L121 (poloxámero 401) el cual puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 50 ml/l y aproximadamente 100 ml/l y el polímero de carboximetileno puede ser Carbopol 934P (Carbámero 934P), el cual puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 ml/l.

Polímeros de ácido acrílico preferidos son aquellos comercializados por B. F Goodrich como Carbopol 934 P NF y 941 NF, los cuales son polímeros de ácido acrílico entrecruzados con polialilsacarosa y que tienen la fórmula química $(\text{CH}_2\text{CHOOH})_n$. Estos polímeros forman geles acuosos que se formulan de manera adecuada con portadores acuosos. Los copolímeros de bloque de polioxietileno-polipropileno pueden ser surfactantes no iónicos comercializados por BASF como Pluronic[®] L121, L61, L81 o L101.

Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente memoria para uso en la presente invención pueden emplear, en combinación adicional, una o más de otras bacterias vivas, bacterinas, toxoides y/o antígenos virales. Así, dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, la composición de *M. hyopneumoniae* avirulenta viva con adyuvante puede comprender una cantidad inmunizante de un *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulento vivo y aceite SP tal como se define en la presente

- memoria en combinación adicional con (a) una o más bacterias vivas tales como, por ejemplo, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y bacterias de leptospira; (b) una o más bacterinas; (c) uno o más toxoides purificados de uno o más patógenos tales como, por ejemplo,
- 5 *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacterias leptospira; y/o (d) uno o más antígenos virales en el que el virus es seleccionado del grupo consistente de virus de influenza porcina (SIV; tal como cepas de SIV H1N1, H1N2, y H3N2), virus del síndrome reproductivo respiratorio (PRRSV), PRRS que expresa virus de viruela de mapache y/o otros antígenos, PRRS que expresa TGEV y/o
- 10 otros antígenos, y circovirus porcino (PCV). Se ejemplifican en la presente memoria composiciones, que incluyen composiciones de vacunas, las cuales emplean una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulentas vivas en combinación con vacunas vivas modificadas con quimeras Tipo 1-Tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2) (véanse Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos 2003/0170270 y 2004/0253270).
- 15 Las composiciones, incluyendo composiciones de vacuna, pueden incluir adicional u opcionalmente un conservante, tal como por ejemplo, timerosol y/o EDTA. Véanse también las publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2002/0131980 y 2003/0017171.

La concentración de tales otras bacterias vivas, bacterinas, toxoides y/o antígenos virales empleados en las composiciones descritas en la presente memoria dependerán de la naturaleza de la bacteria, toxoide y/o

20 antígeno viral y están presentes típicamente en las composiciones descritas en la presente memoria a una concentración final de entre aproximadamente $0,5 \times 10^5$ hasta $0,5 \times 10^{10}$ por ml. Alternativamente, las bacterias están presentes en una concentración final de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a $0,5 \times 10^9$ por ml o entre aproximadamente $0,5 \times 10^7$ a $0,5 \times 10^8$ por ml.

Las composiciones de la presente divulgación se utilizan para proteger un animal contra una enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o para prevenir o mejorar una aparición de tal enfermedad entre poblaciones animales por administración de una composición de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulenta viva con adyuvante como se describe en la presente memoria. Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden ser empleadas ventajosamente para potenciar en un animal una respuesta inmune, tal como una respuesta inmune mediada por células y/o humoral, al *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tales

25 métodos comprenden las etapas de administrar a un animal, típicamente un cerdo, en una o dos dosis, una composición que comprende una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* avirulentas vivas con adyuvante. Dependiendo de la aplicación precisa contemplada, las composiciones pueden ser administradas por vía intramuscular, subcutánea, oral, por aerosol o intranasal.

De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, un régimen de dosificación deseable involucra la administración de una o más dosis de la composición de vacunas deseada al cerdo. Típicamente, cuando se administran dos dosis al animal, las dosis son administradas con una separación de aproximadamente una

35 (1) semana y aproximadamente cuatro (4) semanas, más típicamente entre aproximadamente dos (2) semanas y aproximadamente tres (3) semanas de separación

Ejemplos

40 La presente divulgación será mejor entendida con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1: Preparación de una vacuna viva con adyuvante de *M. hyopneumoniae* avirulenta

Este ejemplo divulga la preparación de una composición de *M. hyopneumoniae* avirulenta viva con adyuvante de ejemplo de acuerdo con la presente divulgación junto con composiciones de referencia también descritas en la presente memoria.

45 El *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser obtenido de cualquier número de fuentes fácilmente disponibles. En una realización descrita en la presente memoria, la cepa J de cultivo vivo avirulento de *M. hyopneumoniae* (línea 1 de FCX3), fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) como cepa ATCC No. 27715. Cualquier otra cepa avirulenta de *M. hyopneumoniae* puede ser utilizada para la preparación de las composiciones, tales como, por ejemplo, la cepa J original designada como número de acceso ATCC 25934. En ciertas otras realizaciones, se prevé que cualquier cepa virulenta viva de

50 *Mycoplasma pneumoniae*, puede ser modulada, atenuada o mutada hasta que se establezca de que el cultivo es avirulento, según se determina por pruebas *in vitro* o *in vivo*, utilizando procedimientos conocidos para los experimentados en la técnica. La secuencia genómica completa de la cepa J ATCC 25934 ha sido publicada por Vasconcelos et al (J. Bacteriol. (2005), 187(16): 5568-5577) y ha sido asignada con el número de acceso AE017243 asignado a GenBank. Varias de las secuencias asociadas con la cepa 25934 de ATCC pueden encontrarse en PubMed y tienen números de acceso de GenBank AY737012 (gen ARN ribosómico de 16S), y AY512905 (gen de adhesina, AF013714 (gen de prolipoproteína p65), U02538 (gen ARNr 23S) y como genes homólogos de proteína con resistencia a multifármacos U02537).

55

ES 2 577 716 T3

- 5 Cada composición de vacuna para el ensayo bactericida fue preparada a partir de un vial liofilizado de un cultivo de *M. hyopneumoniae* rehidratado con 20 ml de solución salina normal. Las composiciones de vacuna incluyeron la combinación de 5 ml del cultivo rehidratado y adyuvante suficiente para adquirir la concentración de adyuvante específico en un volumen final de 10 ml. Se mezclaron todas las composiciones durante 5 minutos antes del muestreo. También se preparó una composición de control combinando 5 ml de cultivo deshidratado con 5 ml de solución salina normal. Se tomaron muestras de todas las composiciones a los 5 minutos (0 hora), 3 horas, y 7 horas después de la mezcla. La viabilidad de cada vacuna fue determinada por las Unidades Formadoras de Colonia (CFU) en cada punto de muestreo (véase Tabla 1).

Tabla 1

	CFU/ml			MPN/ml		
	0 horas	3 horas	7 horas	0 horas	3 horas	7 horas
30% SL-CD	1,44E+07	0	0	1,15E+07	0	0
10% SL-CD	1,48E+07	6,40E+05	5,2E+03	2,87E+07	8,42E+05	0,00E+00
Control	8,30E+07	1,06E+08	9,00E+07	3,62E+07	6,22E+07	3,62E+07
5% Aceite SP	9,46E+07	7,60E+07	2,55E+07	4,67E+07	9,40E+07	6,22E+06
5% Aceite SP/0,2%	1,50E+08	5,61E+07	4,53E+07	4,27E+08	7,74E+07	2,84E+06
Control	2,17E+08	1,41E+08	9,86E+07	1,91E+08	8,42E+07	4,67E+07
10% Aceite SP	1,09E+07	1,07E+07	7,13E+06	3,40E+06	7,74E+06	3,62E+06
Control	3,50E+07	4,75E+07	7,20E+07	1,03E+07	3,42E+07	3,14E+07
10% Aceite SP+0,2% carbopol	5,20E+07	1,30E+07	8,13E+06	5,50E+07	1,91E+07	2,26E+06
0,2% Carbopol	6,80E+07	6,67E+07	6,60E+07	1,63E+08	1,38E+08	4,45E+07
Control	2,90E+07	Sin prueba	5,54E+07	1,23E+08	Sin prueba	1,38E+07

- 10 La viabilidad promedio del cultivo de reserva fue determinada promediando todas las viabilidades de control a la hora 0, promedio $9,09 \times 10^7$ CFU/ml. En comparación, el número más probable (MPN) fue determinado para los cultivos de reserva dando como resultado $1,85 \times 10^8$ MPN/ml. La mezcla de la vacuna y la vacuna tiene lugar típicamente en menos de 3 horas; por lo tanto, cuando se ven el efecto bactericida de los adyuvantes, el punto de tiempo de 3 horas es el más importante. La tendencia del Aceite SP al 5% y 10% en el muestreo de 3 horas en comparación con el control es una diferencia de 2 veces y una diferencia de 4 veces, respectivamente.

La vacuna A fue preparada rehidratando viales de cultivo liofilizado con diluyente que contenía 10% (v/v) de concentración final de Aceite SP. La vacuna de placebo fue solución salina normal estéril.

Ejemplo 2: Eficacia *in vivo* de vacunas vivas con adyuvante avirulentas de *M. hyopneumoniae* en cerdos

- 20 Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de composiciones de vacuna avirulentas vivas con adyuvante de ejemplo de *M. hyopneumoniae*.

Un total de 30 cerdos, de cuatro a seis semanas de edad, fueron adquiridos de un rebaño de Fort Dodge Animal Health's SPF en Charles City, Iowa. Los cerdos fueron mantenidos con alimentación sin antibióticos o promotores de crecimiento y recibieron agua y alimento *ad libitum*. Los animales que recibieron

composiciones de vacuna y composiciones de control fueron alojados en diferentes habitáculos y todos los cerdos fueron mantenidos bajo condiciones similares durante los períodos de vacunación, monitorización y carga.

5 Los 30 cerdos fueron asignados aleatoriamente en tres (3) grupos como sigue: Un (1) grupo recibió una composición de vacuna, un (1) grupo recibió un placebo y un (1) grupo sirvió como control ambiental. Los cerdos fueron agrupados como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupo	Número total de cerdos	Vacuna	Número total de cerdos cargados
1	13	A	13
2	12	Placebo	12
3	5	N/A	N/A

10 Los cerdos de cuatro a seis semanas de edad fueron vacunados por vía intramuscular con una dosis de 2 ml de la vacuna apropiada. El grupo 1 recibió la administración de vacuna A, el grupo 2 recibió la administración del placebo. Los cerdos del grupo 3 no fueron vacunados o cargados y sirvieron como controles ambientales. Los cerdos en el grupo 1 fueron vacunados dos veces, con separación de dos semanas. Dos semanas después de la segunda vacunación, todos los cerdos en los grupos 1 y 2 fueron cargados con un homogenizado de pulmón (LI-34) que contenía una cepa virulenta de cepa 11 de *M. hyopneumoniae* (J. Clin. Microbiol., 1999 Mar;37(3):620-7). Cuatro semanas después de la carga, todos los cerdos en los grupos 1-3
15 fueron sometidos a necropsia y se evaluaron las lesiones pulmonares.

Preparación de homogenizado de pulmón (LI-34) para la cepa de carga de *M. hyopneumoniae*

20 Se obtuvieron siete cerdos de cruce de Spring Prairie Colony Farms (Genetipork) y fueron inoculados por vía intratraqueal con 10 ml de una dilución 1:30 de un homogenizado de pulmón crudo al 10% (LI31) de cepa 11 de *M. hyopneumoniae*. El homogenizado crudo de pulmón LI31 había sido producido haciendo pasar homogenizado de pulmón que contenía *M. hyopneumoniae* en cerdos libre de patógenos específicos y recolectando los pulmones con neumonía resultantes a una etapa media temprana de la enfermedad. Los homogenizados de pulmón fueron almacenados a -70°C hasta que fueron requeridos.

25 El suero fue recolectado a la llegada y en la necropsia de todos los cerdos y fue evaluado en el ISU Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU-VDL) para evidencia de anticuerpos a TGE (PRCV), SW y PRV. Además, se llevó a cabo ELISA para anticuerpos de PRRSV y *M. hyopneumoniae* y todas las muestras fueron negativas para todos los patógenos respiratorios anteriores.

30 Todos los cerdos fueron sometidos a necropsia. Se utilizó pentobarbital para inducir anestesia profunda de los cerdos antes del desangrado. El pecho ventral fue abierto y se retiraron asépticamente las áreas de lesiones de neumonía típicas de *M. hyopneumoniae* y se colocaron individualmente en contenedores estériles.

35 Una pequeña porción de cada pulmón fue triturada y verificada en cuanto a pureza sobre placas de agar sangre, caldo de infusión de corazón de res, y medio Friis. Se llevaron a cabo diluciones en tubo en medio Friis para titular la *M. hyopneumoniae*. Las piezas de pulmón restante fueron congeladas en tubos de centrifuga de 50 ml a -70°C hasta conocer los resultados de la bacteriología y el aislamiento de mycoplasma. Los lóbulos pulmonares de 3 de los 7 cerdos fueron utilizados para producir el inóculo de pulmón de *M. hyopneumoniae*.

40 Los trozos de lóbulo fueron descongelados para los cerdos #329, 331, y 332 y triturados en medio Friis que no contenía antibióticos. La pureza del inóculo de pulmón fue confirmada por cultivo en infusión de corazón de res, agar sangre y medio Friis. Solamente los micrococos consistentes con la contaminación ambiental fueron encontrados en una sola placa. El inóculo de pulmón fue titulado en cuanto a los niveles de *M. hyopneumoniae* y se encontró que contenían aproximadamente 10⁷ CCU/ml. Una alícuota fue sometida a ISU-VDL para el ensayo de aislamiento de virus para SN, EMS, enterovirus, HEV, PRCV, PRRSV, pseudorrabia, TGE, parvovirus, y rotavirus. Los resultados de todos los ensayos fueron negativos. El volumen final de inóculo de pulmón triturado (marcado como LI 34) fue 1780 ml a partir de 178,1 gramos de tejido pulmonar. Este fue separado en alícuotas en volúmenes de 100 X 5 ml y 110 X 10 ml.
45

En la segunda fase del estudio, se utilizaron 9 cerdos en la determinación de la concentración del inóculo de pulmón requerida para inducir un promedio de lesiones pulmonares por neumonía del 8% en un mínimo del 80% de los cerdos: todos los cerdos fueron cargados con la cepa 11 LI34 de *M. hyopneumoniae* por vía intratraqueal como se describió previamente. Las diluciones de carga incluyeron 1:30, 1:100, y 1:500.

Los cerdos fueron sometidos a necropsia. Se utilizó pentobarbital para inducir anestesia profunda antes del desangrado. Los pulmones fueron retirados y se registraron las lesiones sobre diagramas de pulmón estándar. Se recolectó el suero de todos los cerdos y fue analizado por ELISA en cuanto a anticuerpos para *M. hyopneumoniae*. Todos los cerdos fueron o positivos o seronegativos para *M. hyopneumoniae* sugiriendo que no hubo una exposición previa a *M. hyopneumoniae* antes de la llegada. Se recolectaron frotis de tráquea asépticamente de todos los cerdos. Se aislaron *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis* de cuatro y tres cerdos respectivamente. La *M. hyopneumoniae* fue aislada de todos los cerdos cargados. Los esquemas de pulmón fueron evaluados con un sistema de análisis de imágenes Zeiss para determinar el porcentaje de lesiones pulmonares de neumonía.

10 Conclusiones

La carga de los cerdos fue exitosa y una dilución de 1:100 sería la dilución óptima para usar. El porcentaje promedio de neumonía inducida fue de 10,17 +/- 6,6, la cual es más alta que la normal, lo cual sin embargo puede ser atribuido a la presencia de *Pasteurella multocida* y/o *parasuis* en los cerdos. Además, 100% de los cerdos inoculados con el inóculo de carga tuvieron lesiones pulmonares significativas. Globalmente, estos resultados son bastantes típicos con respecto a los que se observaron en nuestros estudios de *M. hyopneumoniae*, en cuanto a que si hay otros patógenos presentes, hay un incremento en la neumonía. Esto puede ser debido a la interacción entre los patógenos y el sistema inmune. Produjimos 1,600 ml de inóculo de pulmón de *M. hyopneumoniae* para uso en experimentos de carga experimentales. El inóculo producirá al menos 8% o más de lesiones pulmonares por neumonía en un mínimo del 80% de los cerdos inoculados cuando se utilizó una dilución 1: 100 por vía intratraqueal.

La vacuna fue titulada antes del día de vacunación y se llevaron a cabo ensayos bactericidas para determinar los sistemas adyuvantes apropiados para ser usados (véase Ejemplo 1). A partir de estos datos, se seleccionó un sistema de adyuvante de Aceite SP al 10% para estudio posterior. La viabilidad promedio por vial de cultivo de reserva fue de $3,64 \times 10^9$ CFU/Botella.

En el día de la primera administración, se prepararon composiciones de vacuna como sigue: Vacuna A – cada uno de los tres viales de cultivo liofilizado avirulento de *M. hyopneumoniae* fue rehidratado con 10 ml de diluyente de Aceite SP al 10%. Los tres viales de composición de vacuna para cada tipo de diluyente fueron reunidos y se dejaron en mezcla durante 20 minutos sobre una placa con agitación con una barra de agitación. El placebo fue solución salina normal dividida en alícuotas en una botella estéril para administración. Las composiciones permanecieron sobre hielo durante el transcurso de la vacunación durante 2 horas.

En el día de la segunda administración, las composiciones de vacuna fueron preparadas como sigue: Vacuna A - cada una de los tres viales de cultivo liofilizado avirulento de *M. hyopneumoniae* fue rehidratado con 10 ml de diluyente Aceite SP al 10%. Los tres viales fueron rehidratados para cada tipo de diluyente y reunidos y dejados en mezcla durante 20 minutos en una placa de agitación con una barra de agitación. El placebo fue solución salina normal dividida en alícuotas en una botella estéril para administración. Las composiciones permanecieron sobre hielo durante el curso de la vacunación durante 2 horas.

La concentración de *M. hyopneumoniae* viable en cada composición fue determinada antes y después de la administración. La viabilidad fue evaluada determinando las unidades formadoras de colonia (CFU/ml). Un vial de cultivo de reserva liofilizado fue rehidratado con 10 ml de solución salina normal, se dejó en mezcla durante 20 minutos y sirvió como control para el ensayo de viabilidad. Puesto que la primera viabilidad de control fue inferior que la viabilidad de vacuna de prueba, durante la segunda administración, se rehidrataron dos viales y se reunieron para servir como control. (Véase Tabla 3 para las viabilidades de vacuna de prueba y viabilidades de control).

Tabla 3

Vacuna	Primera vacunación CFU/ml	Segunda vacunación CFU/ml
Grupo 1: Adyuvante Aceite SP al 10%	2,79E+08	2,27E+08
Control de viabilidad	1,29+08	2,69E+08

Todos los cerdos fueron observados diariamente en cuanto a temperaturas y síntomas clínicos partiendo dos días antes de cada administración y continuaron durante siete días después de cada administración. Los cerdos fueron observados en cuanto a sus síntomas clínicos, los cuales incluían, pero no se limitaban a, tos, estornudo, descarga nasal, depresión, inapetencia y respiración dificultosa.

Catorce días después de la segunda administración, los cerdos en el grupo 1 fueron cargados por vía transtraqueal con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.

En el día de la carga, una solución de reserva de carga virulenta de *M. hyopneumoniae* del homogenizado de pulmón (-70°C) (LI-34) fue descongelada rápidamente bajo agua tibia y diluida (dilución 1:100) con. Los cerdos fueron sedados con una mezcla de Xilazina-Ketamina-Telazol™ consistente de 50 mg/ml de Xilazina, 50 mg/ml de Ketamina y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml del material de carga por vía transtraqueal. Para asegurar la colocación de la aguja, se extrajo aire en la jeringa antes de la administración del material de carga. Todos los cerdos fueron observados diariamente en cuanto a síntomas clínicos postcarga.

Los cerdos fueron sangrados para tener suero en los días 0, 14, 28 y 56. La respuesta serológica de los cerdos a la carga de *M. hyopneumoniae* fue determinada por ELISA. Cuatro semanas después de la carga, todos los cerdos de los grupos 1-3 fueron sometidos a eutanasia y se retiraron los pulmones. Los grupos de prueba eran ciegos y calificados en cuanto a lesiones pulmonares grandes. Las lesiones atípicas por *M. hyopneumoniae* fueron fijadas con formalina para evaluación histopatológica subsecuente. Las muestras de frote de los pulmones afectados fueron recolectadas para aislamiento bacteriano.

Las calificaciones de lesiones pulmonares promedio para los cerdos en el grupo 1 (5,9%) fue aproximadamente 50% menor que el grupo de placebo (14,8%). Cuando el análisis estadístico fue ajustado por titulación, la fracción mitigada para el grupo 1 fue 69,2% de reducción en severidad de las lesiones pulmonares en comparación con los controles. Estos datos se resumen en la Tabla 4. Todos los cerdos fueron seronegativos en el día de la primera administración indicando que los cerdos eran susceptibles a infección por *M. hyopneumoniae*. Con la excepción de un (1) cerdo en el grupo con Aceite SP, los cerdos no sufrieron seroconversión después de la primera vacunación. Todos los cerdos que recibieron la composición de vacuna con adyuvante de Aceite SP desarrollaron una respuesta de anticuerpos después de la segunda aplicación. La respuesta serológica demuestra que se provocó una respuesta inmune a *M. hyopneumoniae* (véase Tabla 9 para resultados serológicos).

Tabla 4

Vacuna	Descripción	Reducción de fracción mitigada en lesiones en comparación con control	Reducción en fracción mitigada, nivel de confianza inferior
Vacuna A	<i>M. hyopneumoniae</i> vivo avirulento con Aceite SP al 10%	69,2	40,2
Control	Placebo	NA	NA

El análisis estadístico de los datos debe satisfacer los criterios para la fracción mitigada (<50% con nivel de confianza inferior >30%) para la reducción en lesiones pulmonares para una vacuna que se considera eficaz para *M. hyopneumoniae*. En total, estos datos demuestran que un *M. hyopneumoniae* con adyuvante avirulento vivo puede ser empleado ventajosamente para provocar una respuesta inmune protectora cuando se administra *in vivo* a un animal.

Ejemplo 3: Estudio de inmunogenicidad preliminar de la fracción de *Mycoplasma hyopneumoniae* de cepa virulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae*-quimera modificada viva Tipo 1-Tipo 2 de circovirus porcino

Vacuna de combinación en cerdos de 3 a 4 semanas de edad

Este Ejemplo divulga la eficacia de una vacuna de combinación que comprende una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* J avirulenta viva con adyuvante (línea 1 de FCX3) y una vacuna viva de quimera Tipo 1-Tipo 2 de circovirus porcino (PCV) (cPCV1-2; véase Patentes de los Estados Unidos Nos. 7.279.166 y 7.276.353) cuando se administra por vía intramuscular (IM) o intranasal (IN) en cerdos de 3-4 semanas de edad. Esta vacuna de combinación (PCV/MH) es adecuada para uso en la vacunación de cerdos saludables como un auxiliar en la prevención y/o para reducir la severidad de una enfermedad causada por *M. hyopneumoniae* y circovirus porcino.

La vacuna de prueba buscada debería contener aproximadamente 4,0 Log₁₀ FAID₅₀/dosis de virus vivo modificado de cPCV1-2 y 4x10⁸ CFU/dosis de cepa J de *M. hyopneumoniae* (véase King et al, Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29:85-89 (1965) y Patente de los Estados Unidos número 4.824.785 para el método FAID). La vacuna recibió adyuvante para contener una concentración final de Aceite SP de 10% (v/v). La vacuna placebo fue solución salina normal estéril.

Se empleó un total de 66 cerdos de 3-4 semanas de edad en este estudio. 16 cerdos recibieron administración de 2 ml de vacuna viva PCV/MH por vía intramuscular una vez y fueron cargados (Grupo 1); 15 cerdos recibieron administración de 2 ml de vacuna viva PCV/MH por vía intramuscular dos veces (con separación de dos semanas) y fueron cargados (Grupo 2); 15 cerdos recibieron administración de 2 ml (1

ml/fosa nasal) de vacuna viva PCV/MH por vía intranasal dos veces (con separación de dos semanas) y fueron cargados (Grupo 3); 15 cerdos no recibieron administración de la vacuna PCV/MH y fueron cargados (Grupo 4); y 5 cerdos sirvieron como controles ambientales (Grupo 5).

- 5 La vacuna usada en el estudio divulgado en la presente memoria fue una combinación del antígeno vivo liofilizado MH (lote #1744-56) y un diluyente que contenía vacuna viva PCV (Lote C108-56). En el día de la vacunación, la torta MH viva liofilizada fue rehidratada con diluyente que contenía virus vivo PCV ($4,0 \text{ Log}_{10} \text{FAID}_{50} / \text{mL}$ con la adición de adyuvante con Aceite SP al 10%). A la vacuna final se asignó el lote # 2315-30. La viabilidad para la fracción MH fue determinada antes y después de la vacunación, $3,18 \times 10^8$ CFU/mL (antes) y $1,65 \times 10^8$ CFU/mL (después), respectivamente. El título en PCV para la vacuna pre y post vacunación fue de $4,09 \text{ Log}_{10} \text{FAID}_{50}$ y $3,7 \text{ Log}_{10} \text{FAID}_{50}$, respectivamente. La vacuna para la segunda vacunación fue preparada como se indicó anteriormente y recibió la asignación de lote # 2315-32. La viabilidad para la fracción MH fue de $1,24 \times 10^8$ CFU/mL y $1,5 \times 10^8$ CFU/mL pre y post vacunación respectivamente. La viabilidad para la fracción PCV fue de $4,36 \text{ Log}_{10} \text{FAID}_{50}$ y $3,83 \text{ Log}_{10} \text{FAID}_{50}$, respectivamente.
- 10
- 15 Los cerdos fueron observados durante 7 días después de la vacunación para cualquier reacción adversa a la vacuna. Tres cerdos murieron durante el período de observación postvacunación debido a causas no relacionadas con MH o PCV. En la Tabla 5 se encuentra un resumen de las observaciones clínicas para el período postvacunación.

Tabla 5

Grupo	# de cerdos	Tratamiento	Ruta	Dosificación	Observación después de la vacunación
1	16	Vacunación	IM	1 dosis	Se notó que un cerdo tenía temperatura elevada ($40,6-41,2^{\circ}\text{C}$) durante 7 días consecutivos partiendo en el día quince después de la primera vacunación. Se anotó que otro cerdo tuvo temperatura elevada, inapetencia y depresión durante 4 días consecutivos comenzando 18 días después de la primera vacunación
2	15	Vacunación	IM	2 dosis	Un cerdo murió el día antes de la segunda vacunación debido a posible infección por HPS o S. suis. Los signos clínicos de depresión y delgadez fueron notados antes de la vacunación. Un cerdo tuvo 3 días consecutivos de temperatura elevada ($40,5-41-5^{\circ}\text{C}$) comenzando 5 días después de la primera vacunación.
3	15	Vacunación	IN	2 dosis	Dos días antes de la segunda vacunación un cerdo murió debido a perforación intestinal. Dos cerdos tuvieron articulaciones inflamadas y tos durante 8 días consecutivos, lo cual se había originado antes de la primera vacunación. Se notó que otros dos cerdos un día antes de la segunda vacunación tenían corvejones inflamados durante 7 días consecutivos en los cuales uno de ellos dio como resultado un absceso, y el otro sanó.

Grupo	# de cerdos	Tratamiento	Ruta	Dosificación	Observación después de la vacunación
4	15	Solución salina	IM	2 dosis	Se notó que un cerdo tenía corvejones inflamados a lo largo del estudio anotado antes de la primera vacunación. Otro cerdo tuvo también corvejones inflamados durante varios días durante el estudio. Un cerdo tuvo dos días de temperatura elevada durante dos días consecutivos 40,6°C y 41,3°C comenzando 6 días después de la segunda vacunación.
5	5	Sin vacunación	NA	NA	Alojado con grupo de 4 cerdos durante la vacunación. No se notaron reacciones adversas.

NA: No aplicable
 IN: Intranasal
 IM: Intramuscular

5 Todos los cerdos en los grupos 1-4 fueron cargados con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* (homogenizado de pulmón de cerdo que contenía MH virulento (LI-34)). Los cerdos del Grupo 1 fueron cargados 4 semanas después de la primera vacunación. Los cerdos en los Grupos 2-4 fueron cargados 2 semanas después de la segunda vacunación. A las 4 semanas después de la carga, todos los cerdos en los Grupos 1-5 fueron sometidos a necropsia y se evaluaron las lesiones pulmonares.

10 La vacuna fue titulada antes del día de vacunación. El cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* avirulento fue rehidratado en el día de la vacunación. La concentración de organismos de *M. hyopneumoniae* en la vacuna fue de aproximadamente 2×10^8 CFU/ml. Se retuvo una muestra de vacuna y se llevó a cabo un ensayo de viabilidad antes y después de la vacunación para confirmar los CFU/ml reales. La vacuna fue mantenida sobre hielo durante el curso de la vacunación.

15 Todos los cerdos fueron observados diariamente en cuanto a temperatura y signos clínicos comenzando dos días antes de cada vacunación y continuando siete días después de cada vacunación. Los cerdos fueron observados en cuanto a síntomas clínicos, los cuales incluían, pero no se limitaron a, tos, estornudo, descarga nasal, depresión, inapetencia, y respiración laboriosa. 14 días después de la segunda vacunación, los cerdos en los Grupos 1-4 fueron cargados por vía transtraqueal con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.

20 En el día de la carga, la solución de reserva de carga virulenta de *M. hyopneumoniae*, un homogenizado de pulmón (LI-34) congelado (-70°C) fue descongelado rápidamente bajo agua tibia y diluido (dilución 1:100) utilizando medio de cultivo estéril para *M. hyopneumoniae*. Los cerdos fueron sedados con una mezcla de Xilazina, Ketamina, Telazol[®] que comprendía 50 mg/ml de Xilazina, 50 mg/ml de Ketamina y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml del material de carga por vía transtraqueal. Para asegurar la colocación de la aguja, se introdujo aire dentro de la jeringa antes de la administración del material de carga.

25 Todos los cerdos fueron observados de manera general en cuanto a sus signos clínicos después de la carga. La observación fue llevada a cabo diariamente en cuanto a cualquier signo clínico anormal. Los cerdos fueron sangrados para obtener suero (no más de 13 ml de sangre entera) en los días 0, 14, 28 y 56 del estudio. Se recolectó el suero, pero no se evalúa. Se puede llevar a cabo ELISA para evaluar la respuesta serológica de los cerdos usando el suero recolectado durante el período de estudio en el futuro.

30 Cuatro semanas después de la carga, todos los cerdos de los Grupos 1-5 fueron sometidos a eutanasia y se retiraron los pulmones. Las lesiones por *M. hyopneumoniae* y atípicas fueron fijadas con formalina y las muestras fueron examinadas para histopatología. Las muestras de frote de los pulmones afectados fueron recolectadas para aislamiento bacteriano. Los cerdos que murieron después de la carga fueron sometidos a necropsia y se recolectaron muestras como se describió más arriba. La eficacia de la vacuna fue definida como una calificación de lesiones pulmonares promedio combinadas de los vacunados que fue 50% menos

que la calificación de lesiones pulmonares promedio combinadas de los controles.

En el día de la necropsia todos los cerdos fueron sometidos a eutanasia, se calificaron las lesiones pulmonares y se hicieron frotis para aislamiento bacteriano. Las bacterias aisladas de los frotis consistían de las siguientes: *Staphylococcus heamolyticus*, *Streptococcus suis* (P322), *Staphylococcus epidermis*, *A. pyogenes*, *aerococcus species*, *S. uberis*, *Bordetella bronchiseptica* (P344) y Microbacteria. El análisis estadístico para las calificaciones de lesiones pulmonares está en la Tabla 6.

Tabla 6

Grupo	Proporción de protección	MF de camada ajustado	MF nivel de confianza inferior	Calificación de lesión pulmonar Porcentaje ajustado camada	Calificación de lesión pulmonar LCL	Desviación estándar de lesión pulmonar	Percentil medio para lesiones
Vacunado por vía IM dosis individual	1/15	52,9%	19,6%	6,30%	3,86%	4,41	0,37
Vacunado IM dosis doble	3/15	63,8%	33,8%	5,03%	2,39%	4,59	0,31
Vacunado IN dosis individual	0/14	-8,6%	-51,8%	12,86%	8,59%	7,38	0,65
Control	0/15	NA	NA	11,46%	8,41%	5,5	0,62

LCL = Nivel de confianza inferior
MF = Fracción mitigada

El análisis estadístico de los datos satisfizo los criterios para la fracción mitigada (<50%, con LCL >30%) para la reducción en lesiones pulmonares. Este ejemplo demuestra (a) la eficacia de la vacuna de MH/PCV para la fracción MH con dos dosis de 2 mL administradas por vía IM, a $3,18 \times 10^8$ CFU/mL y (b) la seguridad de la vacuna MH/PCV debida a la carencia de signos clínicos relacionados con MH o PCV después de la vacunación.

Ejemplo 4: Estudio de inmunogenicidad de la vacuna de combinación de la fracción de *Mycoplasma hyopneumoniae* en la cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* –quimera viva modificada Tipo 1- Tipo 2 de circovirus porcino en cerdos de 3-4 semanas de edad.

Este ejemplo divulga un estudio de inmunogenicidad que soporta los resultados del estudio presentado en el Ejemplo 4 y confirma la eficacia de la vacuna combinada de la fracción de *M. hyopneumoniae* de la cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* -vacuna viva modificada de quimera Tipo 1 – Tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2) (MH/PCV) cuando se administra por vía intramuscular. La vacuna MH/PCV divulgada en la presente memoria puede ser empleada de manera adecuada para la vacunación de cerdos saludables y como auxiliar en la prevención y/o minimización de la severidad de la enfermedad causada por *M. hyopneumoniae* y circovirus porcino.

Los cerdos utilizados en el presente estudio fueron seronegativos a *M. hyopneumoniae* según se determinó por ELISA.

Un total de 79 cerdos de tres a cuatro semanas de edad fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos. 24 cerdos, Grupo 1 fueron vacunados con una dosis individual de una combinación de vacuna viva PCV/MH. 24 cerdos, Grupo 2, fueron vacunados con la vacuna de combinación dos veces con dos semanas de separación. 24 cerdos, Grupo 3, fueron vacunados con solución salina normal dos veces con separación de dos semanas para servir como controles de carga. Todas las vacunas fueron administradas por vía intramuscular. Cuatro cerdos, Grupo 4, no fueron vacunados ni cargados y sirvieron como controles ambientales.

5 La vacuna utilizada en el estudio fue una combinación de antígeno vivo liofilizado de MH (Lote 1744-66) y diluyente que contenía vacuna viva PCV (cPCV1-2 Lote C108-56). En el día de la vacunación, la torta de MH vivo fue rehidratada con diluyente que contenía el virus vivo PCV ($3,5 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}/\text{mL}$ con adyuvante de Aceite SP al 10%). La vacuna final recibió la denominación Lote 2315-40. La viabilidad de la fracción MH fue determinada antes y después de la vacunación, $2,09 \times 10^8$ CFU/mL y $1,56 \times 10^8$ CFU/mL respectivamente. La vacuna placebo fue solución salina normal estéril.

10 La vacuna para la segunda vacunación fue preparada como se indicó más arriba y recibió el nombre de Lote # 2315-42. La viabilidad de la fracción de MH fue de $1,05 \times 10^8$ CFU/mL y $6,72 \times 10^7$ CFU/mL pre y post vacunación respectivamente. La viabilidad para el diluyente de la fracción PCV fue de $3,44 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}$.

15 La vacuna fue titulada antes del día de la vacunación. El cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* virulento fue rehidratado en el día de la vacunación. Una muestra de vacuna fue retenida y se llevó a cabo un ensayo de viabilidad y después de la vacunación para determinar CFU/ml. La vacuna permaneció sobre hielo durante el transcurso de la vacunación.

20 Todos los cerdos fueron observados diariamente en cuanto a temperaturas y signos clínicos empezando dos días antes de cada vacunación y continuando durante 7 días después de cada vacunación. Se observaron los cerdos en cuanto a sus síntomas clínicos, los cuales incluían, pero no se limitaban a, tos, estornudo, descarga nasal, depresión, inapetencia y respiración laboriosa.

Los cerdos fueron observados durante 7 días después de la vacunación en cuanto a cualquier reacción adversa a la vacuna. Tres cerdos murieron durante el período de observación postvacunación debido a causas no relacionadas con MH o PCV. Un resumen de las observaciones clínicas del período de postvacunación se encuentra en la Tabla 7.

Tabla 7

Grupo	# de cerdos	Tratamiento	Dosificación	Observaciones después de la vacunación
1	24	Vacunación	1 dosis	No se notaron reacciones adversas debidas a la vacunación
2	24	Vacunación	2 dosis	Un cerdo murió en este grupo debido a perforación intestinal. En el día 5 después de la primera vacunación un cerdo tenía una temperatura de 105,5°F y se notó respiración laboriosa durante un día.
3	24	Vacunación con solución salina	NA	En el día 6 después de la vacunación se notó un cerdo con respiración laboriosa durante solo un día
4	4	Sin vacunación	NA	Alojado con 3 cerdos durante la vacunación. No se anotaron reacciones adversas.
NA: No aplicable				

25 Todos los cerdos en los Grupos 1-3 fueron cargados con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* a las aproximadamente 7 semanas de edad. Los cerdos del Grupo 1 fueron cargados dos veces después de la primera vacunación. Los cerdos en los Grupos 2 y 3 fueron cargados dos semanas después de la segunda vacunación. La reserva virulenta de *M. hyopneumoniae* cargada, un homogenizado de pulmón (LI-34) congelado (-70°C) fue descongelado rápidamente bajo agua tibia y diluida (dilución 1:100) utilizando medio de cultivo estéril para *M. hyopneumoniae*. Los cerdos fueron sedados con una mezcla de Xilazina-Ketamina-Telazol™ que comprendía 50 mg/ml de Xilazina, 50 mg/ml de Ketamina, y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml de material de carga por vía transtraqueal.

35 Los cerdos fueron sangrados para obtener suero en los días 0, 14, 28, y 56 del estudio. Las muestras de suero recolectadas de este estudio pudieron ser probadas para evaluar la respuesta serológica del animal a *M. hyopneumoniae* y PCV2 utilizando métodos de ELISA bien conocidos en la técnica. Las muestras de suero recolectadas desde el día 0 después de la vacunación (ODPV) y día cero postcarga (ODPC) pueden ser probados en cuanto a anticuerpos para *M. hyopneumoniae*, influenza porcina (H1N1), y síndrome reproductor

respiratorio porcino (PRRS) utilizando kits de pruebas de ELISA comercialmente disponibles.

5 Cuatro semanas (28 DPC) después de la carga, todos los cerdos de los grupos 1-4 fueron sometidos a eutanasia y se retiraron los pulmones. Las calificaciones de lesiones pulmonares fueron registradas y las lesiones típicas por *M. hyopneumoniae* fueron fijadas con formalina. Las muestras fueron examinadas por histopatología. Las muestras de frote de un lóbulo afectado por *M. hyopneumoniae* fueron recolectadas para aislamiento bacteriano para la detección de infecciones secundarias. Además, se recolectó el fluido de lavado alveolar bronquial. Los pulmones fueron juagados con solución salina regulada con fosfato y el fluido resultante fue dividido en alícuotas para pruebas por PCR.

10 Para la evaluación de la reducción en la severidad de las lesiones pulmonares, el estimador fue la estadística de fracción mitigada (MF). La fracción mitigada se calculó como sigue:

$$MF = \frac{2W_1 - n_c(1 + n_c + n_v)}{n_c n_v}$$

en la cual:

W_1 estadística de suma Wilcoxon Rank

n_c = número de sujetos en el grupo de control

15 n_v = número de sujetos en el grupo vacunado

Se calculó el intervalo de confianza del 95% para la fracción mitigada. Para reivindicar las reducciones en la severidad de las lesiones pulmonares:

$H_0: M_v = M_c$

$H_A: M_v < M_c$

20 en las cuales:

M_v = Media de la lesión de la calificación de lesión pulmonar en el grupo vacunado

M_c = Media de la calificación de lesión pulmonar en el grupo de control

25 La distribución de frecuencia de las variables resultantes continuas fue establecida utilizando PROC UNIVARIATE, el cual lleva a cabo análisis paramétricos y no paramétricos de una muestra para una población sencilla (SAS Institute Inc., Cary NC). Las transformaciones logarítmicas de los títulos de anticuerpos fueron empleadas para satisfacer la suposición de normalidad requerida para las pruebas paramétricas. Las evaluaciones de línea base para evaluar la comparabilidad de los grupos por litro y habitáculo se hicieron por chi-cuadrado. La severidad de las lesiones pulmonares fue comparada entre cada grupo vacunado y el grupo de control por la prueba de suma de rango de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY con calificación de lesión pulmonar como variable dependiente y tratamiento incluido como una variable independiente. PROC NPAR1WAY, el cual lleva a cabo pruebas no paramétricas para la localización y diferencias de escala a través de una clasificación de una vía; PROC NPAR1WAY también provee un análisis estándar de varianza de los datos brutos y estadísticos con base en la función de distribución empírica (SAS Institute Inc., Cary NC).

35 Todos los análisis estadísticos serán llevados a cabo utilizando el sistema SAS. En casos donde la transformación no mejora la distribución de los residuales para ninguna variable transformada según se determina mediante la prueba W para normalidad, se empleó pruebas no paramétricas según fue necesario. El nivel de significado fue fijado en $p < 0,05$.

40 En el día de la necropsia todos los cerdos fueron sometidos a eutanasia, se calificaron las lesiones pulmonares y se frotó para aislamiento bacteriano. También se recogieron los lavados broncoalveolares (BAL). Las bacterias aisladas de los frotis consistían de las siguientes: *Actinobacillus species*, *Moraxella osloensis*, *Streptococcus sanguinis*, *A. pyogenes* y *Bordetella bronchiseptica*. Las muestras de BAL fueron probadas en cuanto a MH por metodología PCR; dos muestras del grupo de control ambiental con lesiones registradas y dos muestras con calificaciones de lesiones bajas en el grupo vacunado y de control; las muestras BAL para ambos cerdos del grupo de control ambiental con lesiones fueron negativas y ambos cerdos con calificaciones de lesiones bajas en el grupo vacunado fueron positivos. El análisis estadístico para las calificaciones de lesión pulmonar está en la Tabla 8.

Tabla 8

Grupo	Proporción de protección	MF de camada ajustado	MF nivel de confianza inferior	Calificación de lesión pulmonar Porcentaje ajustado camada	Calificación de lesión pulmonar LCL	Desviación estándar de lesión pulmonar	Percentil medio para lesiones
Vacunado por vía IM dosis individual	1/23	58,4	31%	8,84%	6,68%	4,99	0,38
Vacunado IM dosis doble	4/19	71,2%	48,7%	6,62%	4,37%	4,67	0,3
Control	0/23	NA	NA	19,27%	14,62%	10,76	0,69

LCL = Nivel de confianza inferior

MF = Fracción mitigada

El análisis estadístico de los datos satisface los criterios para la fracción mitigada (<50%, con LCL >30%) para reducción en las lesiones pulmonares. La vacuna se considera eficaz para la fracción MH con una dosis de 2 mL administrada IM, bien sea dosis sencilla o dosis doble a $2,09 \times 10^8$ CFU/ml. Además la vacuna es considerada segura debido a la carencia de signos clínicos relacionados con MH o PCV después de la vacunación.

5

Tabla 9

Resultados de serología para el Ejemplo 2						
ID del cerdo	Grupo	ODPV1	ODPV2	ODPC	Necropsia	Calificación pulmonar
730	1	<50	100	400	400	9,5
733	1	<50	<50	100	>400	35,5
735	1	<50	<50	100	200	5,5
740	1	<50	<50	200	400	5,5
742	1	<50	<50	200	200	0,5
745	1	<50	<50	200	100	0,9
754	1	<50	<50	400	400	6,8
755	1	<50	<50	400	>400	0,0
761	1	<50	<50	200	200	4,5
762	1	<50	<50	>400	200	0,5
763	1	<50	<50	400	200	2,7
771	1	<50	<50	>400	>400	5,5
774	1	<50	<50	>400	>400	0,0
732	2	<50	<50	<50	<50	1,8
738	2	<50	<50	<50	<50	5,9
739	2	<50	<50	<50	50	18,2

ES 2 577 716 T3

Resultados de serología para el Ejemplo 2						
ID del cerdo	Grupo	ODPV1	ODPV2	ODPC	Necropsia	Calificación pulmonar
743	2	<50	<50	<50	50	19,1
747	2	<50	<50	<50	200	0,5
749	2	<50	<50	<50	50	21,4
752	2	<50	<50	<50	<50	9,5
759	2	<50	<50	<50	<50	15,9
764	2	<50	<50	<50	<50	26,4
768	2	<50	<50	<50	<50	31,8
769	2	<50	<50	<50	<50	16,8
773	2	<50	<50	<50	<50	10,0
726	3	<50	<50	<50	<50	0,0
744	3	<50	<50	<50	<50	0,0
750	3	<50	<50	<50	<50	0,0
767	3	<50	<50	<50	<50	1,4
770	3	<50	<50	<50	<50	0,5
Grupo 1: Vacuna con Aceite SP (vacunado y cargado)						
Grupo 2: Control/carga (no vacunado y cargado)						
Grupo 3: Control no cargado (no vacunado y no cargado)						

ODPV1 y ODPV2: Los números indican la dilución más alta que fue positiva en la prueba de ELISA después de la primera dosis de vacuna (ODPV1) o después de la segunda dosis de vacuna (ODPV2).

ODPC: Los números indican los resultados de ELISA postcarga. El número más alto indica seroconversión.

5 Calificación pulmonar: El número indica el porcentaje de lesiones en los pulmones de los animales. El número más alto indica un número mayor de lesiones pulmonares debido a una carencia de inmunidad protectora. El número más bajo indica un cerdo más saludable con menores lesiones debido a la inducción de una respuesta inmune protectora.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica para uso en la protección de un animal contra una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo dicha composición una cantidad inmunológicamente efectiva de una cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* y Aceite SP, comprendiendo el Aceite SP de 1% a 3% vol/vol de copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno; 2% a 6% vol/vol de escualano; 0,1% a 0,5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina regulada; en la cual la cepa avirulenta viva de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa cuyo genoma comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tienen al menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de ácidos nucleicos de una cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* de referencia que tiene el número de acceso al Genbank AE017243.
2. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
- (a) una o más bacterias vivas, bacterinas y/o uno o más toxoides purificados seleccionados del grupo consistente de *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y bacterias leptospira; o.
- (b) uno o más antígenos virales seleccionados del grupo consistente de un antígeno del virus de influenza porcina (SIV), un antígeno del virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), PRRS que expresa virus de viruela de mapache u otros antígenos, PRRS que expresa TGEV u otros antígenos, y un antígeno del circovirus porcino (PCV).
3. Una composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en prevenir o reducir al menos un síntoma de una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
4. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho animal es un cerdo.
5. Una composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en la prevención o mejora de un brote de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
6. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en potenciar una respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que dicha potenciación comprende la etapa de administrar una dosis individual o múltiple de dicha composición inmunogénica a un animal.
7. Una composición inmunogénica para uso en la protección de un animal contra una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para prevenir o reducir algunos síntomas asociados con la enfermedad potenciando una respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que dicha potenciación comprende las etapas de:
- a) en un primer tiempo, administrar una primera composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2;
- b) en un segundo tiempo, administrar una segunda composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.