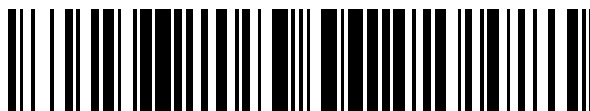


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 935**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10777221 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2453913**

54 Título: **Cepa de vacuna de Mycoplasma Hypopneumoniae sensible a temperatura y uso de la misma**

30 Prioridad:

**19.05.2009 AU 2009902255**

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

**17.08.2016**

73 Titular/es:

**BIOPROPERTIES PTY LTD (50.0%)  
36 Charter Street  
Ringwood, Victoria 3134, AU y  
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOUIL, RIMA;  
ABS EL-OSTA, YOUSSEF;  
BROWNING, GLENN y  
MARKHAM, PHILLIP**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 579 935 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**

Cepa de vacuna de Mycoplasma Hypopneumoniae sensible a temperatura y uso de la misma

5 Campo

La presente invención se relaciona con cepas de Mycoplasma hypopneumoniae, vacunas que comprenden dichas cepas y usos de dichas vacunas para proteger contra neumonía por micoplasma en cerdos.

10 Antecedentes

15 El Mycoplasma hypopneumoniae es el agente etiológico de la neumonía por micoplasma porcina (también llamada neumonía enzoótica (EP)). Es una de las enfermedades respiratorias más frecuentes y económicamente significativas que afectan a la producción porcina en todo el mundo. La enfermedad se asocia con infecciones secundarias, alta tasas de morbilidad y bajas tasas de mortalidad, baja conversión alimenticia y se puede atribuir a pérdidas económicas mundiales estimadas en aproximadamente USD\$ 1 mil millones por año.

20 En el documento EP, las bacterias de Mycoplasma hypopneumoniae se unen a los cilios de las células epiteliales en los pulmones de cerdos destruyendo los cilios normales y saludables lo que permite a organismos oportunistas establecerse por sí mismos en el tejido respiratorio provocando la enfermedad. Una vez establecida, la M. hypopneumoniae provoca lesiones en los pulmones de los cerdos.

25 La enfermedad es muy contagiosa y la transmisión es usualmente a través de contacto directo con las secreciones del tracto respiratorio infectado, por ejemplo gotas expulsadas desde el hocico o boca al estornudar o toser.

Actualmente existen diversas vacunas contra M. hypopneumoniae. La mayoría de las vacunas actuales son proporcionadas por cerca de 10 empresas con 22 marcas de vacunas registradas, ya sea como sencilla o bi/multivalente. Todas son preparaciones de M. hypopneumoniae muertas o inactivas

30 El documento WO02/10343 divulga una vacuna viva sensible a la temperatura para Mycoplasma hypopneumoniae.

35 Ejemplos de vacunas de M. hypopneumoniae inactivadas de células completas incluyen RESPISURE™ y STELLAMUNE™ (Pfizer), SUVAXYN M. HYO™ (Fort Dodge), HYORESP™ (Meriel), M+PAC™ (Schering-Plough) y PORCILIS™ (Intervet).

Mientras que algunas vacunas pueden reducir la gravedad de la EP, ninguna de las vacunas de células completas inactivadas o muertas disponibles proporciona una protección completa contra la infección por M. hypopneumoniae. De acuerdo con lo anterior subsiste la necesidad de una vacuna más efectiva.

40 Es un objetivo de una realización preferida de la presente invención proporcionar una cepa viva de Mycoplasma pneumoniae adecuada para su uso en vacunación para prevenir la neumonía enzoótica.

45 Todas las referencias, incluyendo cualesquier patentes o solicitudes de patentes, citadas en esta especificación se incorporan como referencia. Se entenderá claramente que, aunque se conocen aquí una serie de publicaciones de la técnica anterior, esta referencia no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la técnica.

Resumen

50 La invención proporciona de manera general una cepa de Mycoplasma hypopneumoniae atenuada viva que se puede utilizar para producir una vacuna viva que es efectiva en protección contra neumonía enzoótica en cerdos.

55 Un primer aspecto proporciona una cepa de la vacuna de Mycoplasma hypopneumoniae depositada ante el National Measurements Institute (Australia) bajo el número de acceso NM04/41259, cuya cepa es sensible a la temperatura y atenuada.

En una realización la cepa de vacuna comprende una mutación en todos los genes enumerados en la Tabla 1.

60 Las vacunas atenuadas son generalmente ventajosas porque presentan todos los determinantes inmunogénicos pertinentes de un agente infeccioso en su forma natural al sistema inmunitario del anfitrión y la necesidad de cantidades relativamente pequeñas de agente inmunizante debido a la capacidad del agente de multiplicarse en el anfitrión vacunado. Los métodos para atenuar incluyen pasar una cepa virulenta múltiples veces o exponerla a radiación o productos químicos. Se supone que estos métodos introducen mutaciones en el genoma que hacen al microorganismo menos virulento, pero todavía capaz de replicación.

65

Las desventajas de estos métodos son que introducen mutaciones aleatorias que no se caracterizan a nivel molecular. También los métodos para seleccionar atenuación, tal como al seleccionar sensibilidad a la temperatura asociada a menudo consumen mucho tiempo, producen resultados falsos ya que una cepa sensible a la temperatura no puede ser atenuada y una cepa atenuada no necesita ser sensible a la temperatura, y requieren una gran cantidad de ensayo y error. Adicionalmente, la cepa atenuada puede experimentar mutación adicional y revertir a virulencia.

Con el objetivo de proporcionar una vacuna viva contra la neumonía por micoplasma los inventores sometieron un aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae* a mutagénesis química y se seleccionaron clones que fueron sensibles a la temperatura. Los inventores secaron por congelación las bacterias mutantes vivas y encontraron que las bacterias se podrían reconstituir después de una semana y permanecer viables después de pasajes en serie y por lo tanto son adecuadas como una cepa de vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La cepa de vacuna y cepa maestra se secuenciaron y se identificó la comparación de las secuencias de genes que fueron mutados en la vacuna, lo que permite la caracterización genética de la cepa atenuada.

Se muestra que la cepa de vacuna confiere inmunidad protectora y no muestra ninguna reversión a la virulencia a pesar de los pasajes en serie (datos no mostrados).

Un segundo aspecto proporciona una composición de vacuna que comprende la cepa de vacuna de *M. hyopneumoniae* del primer aspecto y un portador, opcionalmente un adyuvante, y/o opcionalmente por lo menos un agente infeccioso adicional, cuya vacuna en una cantidad inmunizante es capaz de provocar inmunidad protectora contra una enfermedad provocada por *M. hyopneumoniae*. El agente infeccioso puede ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.

Un tercer aspecto comprende un método para elaborar la vacuna del segundo aspecto, el método comprende combinar la *Mycoplasma hyopneumoniae* del primer aspecto con un portador, opcionalmente un adyuvante y/o opcionalmente por lo menos un agente infeccioso adicional. Un agente infeccioso puede ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.

Un cuarto aspecto proporciona el uso de la cepa de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para prevenir la enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal porcino.

En una realización preferida la "enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*" es la neumonía enzoótica o neumonía de micoplasma porcina.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Colonización nasal de cepa de vacuna de ts19 en cerdos vacunados en altas sobredosis.

Figura 2: Colonización de tráquea a 59 días después de vacunación (DPV) en cerdos vacunados en altas sobredosis con vacuna ts19.

Figura 3: Colonización nasal en cerdos vacunados con cepa de vacuna de ts19 en diversas dosis.

Figura 4: Pesos corporales totales diferenciales durante el periodo de estudio (105 días).

Figura 5: Determinación de Dosis Protectora Mínima para ts19.

Figura 6: Índice protector de ts19 y vacuna comercial con base en la reducción en la severidad de lesiones pulmonares.

Descripción Detallada

La cepa de *M. hyopneumoniae* "LKR" se aisló originalmente de un espécimen de matadero (Lloyd y Etheridge 1981, J Comp Path 91: 77-83). El organismo se volvió a aislar a partir de cerdos infectados experimentalmente antes de ser pasado aproximadamente 10 veces en un medio acelular para alcanzar el aislamiento clonal (CSIRO, Victoria). El clon luego se presentó a la colección de *Mycoplasma* de la Universidad de Adelaida, Australia del Sur. El aislado LKR luego se obtuvo por la Universidad de Melbourne, Departamento de Ciencias Veterinarias (Grupo de *Mycoplasma*), donde fue sometido a 3 pasajes in vitro en caldo de cultivo Friis modificado, para almacenamiento. Los frascos almacenados se designaron "LKR P3 29/5/97". Este clon representa la cepa progenitora.

La LKR P3 29/5/97 se pasó in vitro y se sometió a mutagénesis NTG (200 mg/ml) utilizando un método descrito previamente (Nonamura and Imada (1982) Avian Diseases 26:763-775). Se seleccionó un clon sensible a temperatura ("ts-19") de una placa de agar y se cultivó en 3 mL de caldo de cultivo modificado Friis. El número de pasajes para este clon se designó "P0" y se había sometido posteriormente a cuatro pasajes in vitro adicionales en una dilución 1: 4 v/v por pasaje en caldo de cultivo Friis modificado. El nivel de pasajes final se designó "LKR ts-19 P4 MS".

La LKR ts-19 P4 MS se sometió a una serie de pasajes de dilución in vitro en caldo de cultivo Friis Modificado para alcanzar una dilución de  $3.2 \times 10^{-21}$ . El clon mutante final se designó "LKR ts-19 de  $3.2 \times 10^{-21}$ ".

La LKR ts-19 3.2 x 10<sup>-21</sup> se secó por congelamiento y se presentó a los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia (Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósito de procedimiento de patentes) bajo el número de acceso NM04/41259.

Los micoplasmas tienen un tamaño de genoma muy reducido que refleja sus capacidades biosintéticas limitadas y su dependencia parasitaria como la dependencia de su anfitrión. A la luz de la redundancia limitada en sus genomas, la mutagénesis NTG de un componente particular de una ruta puede tener un efecto significativo sobre la supervivencia de una célula de Mycoplasma. La mutagénesis NTG resulta en mutaciones aleatorias (transiciones de nucleótidos, transversiones, supresiones o inserciones) dentro del genoma. Esto daría lugar a una población de genomas variantes que contienen cada uno ya sea una o más mutaciones. Es de suponer que muchos de los genomas variantes no sobrevivirían debido a un gen o genes críticos que permanecen disfuncionales. Si las mutaciones no incurrían en un efecto perjudicial sobre la capacidad de los organismos para crecer entonces esos organismos supervivientes variantes se pueden someter a una selección adicional (por ejemplo, selección de temperatura). En el desarrollo de ts19, la selección se basa en la capacidad de la cepa variante de crecer a un título alto a una temperatura de 33° C y disminuye la capacidad de crecer a 39.5° C. Sobre la base de la comparación de secuencias del genoma completo entre la cepa de vacuna de Mycoplasma hyopneumoniae ts19 y aquella de la cepa progenitora (LKR), se ha identificado un número de mutaciones (cambios de nucleótidos) en el genoma de ts19. Estas mutaciones incluyen sustituciones de nucleótidos (transiciones y transversiones), así como supresiones e inserciones.

Las mutaciones se encuentran alrededor del genoma completo e incluyen un rango de genes expresados, así como proteínas hipotéticas y secuencias no codificantes. La Tabla 1 enumera los genes que se han mutado por sustituciones, supresiones o inserciones de bases. Los genes se han clasificado de acuerdo a su función principal. Los expertos en la técnica fácilmente apreciarán cómo detectar si una cepa de M. hyo contenía una mutación en uno de los genes enumerados en la Tabla 1 al determinar de si existe una diferencia entre la secuencia de referencia proporcionada (por ejemplo YP\_278901.1) y la secuencia de la cepa atenuada. La ts19, depositado como NM04/41259 es una cepa atenuada que comprende la totalidad de las mutaciones enumeradas en la Tabla 1.

La cepa atenuada comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o todas las mutaciones enumeradas en la Tabla 1. La cepa atenuada comprende una mutación en uno o cada uno de los factores de virulencia, y/o uno o cada uno de los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, y/o el gen implicado en el metabolismo de fosfolípidos, y/o el gen implicado en el metabolismo de cofactor, y/o uno o cada uno de los genes implicados en la transcripción o traducción, y/o uno o cada uno de los genes implicados en el transporte de membrana, y/o uno o cada uno de los genes implicados en la replicación, reparación o metabolismo del ADN y/o el gen de transposasa enumerado en la Tabla 1.

En una realización, la cepa atenuada comprende una mutación en cada uno de los factores de virulencia.

Tabla 1: Mutaciones atenuantes dentro de los genes de cepa de vacuna de M. hyopneumoniae Tts19.

Factores de virulencia:	
Proteína de membrana externa putativa P95	YP_278901.1
Lipoproteína putativa (MHJ_0213)	YP_279015.1
Lipoproteína putativa (MHJ_0362)	YP_279161.1
Proteína de superficie putativa P216	YP_279290.1
Proteína similar a adhesión putativa P146	YP_279457.1
Metabolismo de carbohidratos:	
Triosafosfato isomerasa	YP_278904.1
Transquetolasa	YP_279223.1
Componente ABC II específico a N-acetilglucosamina-II del sistema PTS putativo	YP_279370.1
Metabolismo de fosfolípido:	
CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato-3- fosfatidial transferasa	YP_279075.1
Metabolismo de co-factores:	
Nicotinato de fosforribosiltransferasa	YP_279204.1
Transcripción/traducción:	
Gen GidA [enzima de modificación tARN uridina 5-carboximetilaminometil	YP_278808.1
Proteína ribosomal L3 50S	YP_278992.1
Leucil-tARN sintetasa	YP_279441.1
Isoleucil tARN sintetasa	YP_278833.1
Transporte de membrana:	

Proteína permeasa de transportador ABC putativo	YP_279164.2
Unión ATP de transportador ABC putativo	YP_278823.1
Proteína transportadora de cromato putativo	YP_278943.1
Proteína permeasa y Unión ATP de transportador ABC putativo	YP_278958.1
Componente Yidc de translocasa proteína de membrana interna putativa	YP_279468.1
Proteína permeasa similar a p69 del sistema de transporte ABC putativo	YP_279157.1
Proteína permeasa de transportador ABC putativo	YP_279176.1
Unión Pr1 de ATP de transportador ABC putativo	YP_279419.1
Replicación /reparación/metabolismo de ADN	
Topoisomerasa I ADN	YP_279077.1
glicosilasa ADN Uracilo	YP_278929.1
ObgE GTPasa	YP_278842.1
Polimerasa IV de ADN	YP_278846.1
Subunidad alfa de ribonucleótido-reductasa disulfato	YP_279017.1
Timidilato quinasa	YP_279053.1
Subunidad delta de polimerasa III de ADN	YP_279054.1
ADN ligasa	YP_279060.1
Subunidad A de girasa ADN	YP_279326.1
Ribonucleasa HII	YP_279388.1
Pirofosfatasa inorgánica	YP_279400.1
Subunidad C ABC de excinucleasa	YP_278867.1
Transposasa	
Transposasa ISMhp1 putativa	YP_279110.1
El número YP indica secuencia de referencia NCBI	

La cepa bacteriana descrita aquí es una cepa sensible a temperatura viva y atenuada y se puede utilizar en una vacuna viva.

5 Una cepa viva atenuada es una cepa bacteriana viva que ha sido cultivada bajo condiciones que redunden o “atenúan” sus propiedades virulentas. Las vacunas vivas normalmente provocan una respuesta inmunológica más duradera que los microorganismos inactivados o muertos.

10 La cepa de vacuna de acuerdo con el primer aspecto se puede producir por mutación química de un aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La mutación química comprende particularmente mutagénesis mediante tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Nonamura y Imada (1982), Avian Diseases 26; 763-775). Las bacterias mutantes sensibles a temperatura se pueden seleccionar por su capacidad para crecer a una temperatura permisiva (33° C) y no es capaz de crecer a una temperatura no permisiva (39.5° C). Para uso en una vacuna los mutantes sensibles a temperatura se someten a pasajes en serie y dilución.

15 La cepa de la vacuna bacteriana de *Mycoplasma* de acuerdo con el primer aspecto es viable (o viva). En general la viabilidad significa la “capacidad de supervivencia” general y se utiliza más específicamente en el sentido de una capacidad para vivir, desarrollarse o germinar bajo condiciones favorables. Una célula bacteriana es viable si es capaz de crecer en ya sea un caldo adecuado o medios de agar.

20 La cepa bacteriana depositada bajo el Tratado de Budapest como NM 04/41259 fue producida por pasajes in vitro tres veces (3x) a (1: 4 v/v en caldo de cultivo Friss modificado) de aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae* LKR Australiano (obtenido de la colección *Micoplasma* de Universidad de Adelaide por el Grupo de *Micoplasma* de la Universidad de Melbourne) para producir LKR P3. Luego, el aislado de LKR P3 se sometió a mutagénesis NTG. El LKR P3 mutagenizado se cultivó en agar a 33° C (una temperatura permisiva) y a 39.5° C (temperatura no permisiva). Se seleccionaron clones mutantes que crecieron a 33° C pero no crecieron en 39.5° C. Los clones seleccionados se sometieron a varias rondas de pasajes in vitro y de dilución en serie. En la ronda final de los pasajes, un clon seleccionado (ts19) se depositó bajo el Tratado de Budapest en el National Measurements Institute (luego llamado Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia) como un cultivo secado por congelamiento. Las muestras se reconstituyeron después de una semana de almacenamiento y se encontró que son viables.

35 El término “pasajes en serie in vitro” se refiere a la práctica de pasajes repetidos de las bacterias en medios. Se trata de la inoculación de un medio de caldo con un cultivo bacteriano vivo, al que luego se da un tiempo para incubar a la temperatura apropiada. Una porción del cultivo incubado luego se utiliza para inocular un cultivo estéril fresco que a su vez se le da un tiempo para incubar. El ciclo continúa para alcanzar el número deseado de pasajes. Cada ronda de crecimiento y reinoculación se refiere como un único pasaje.

El segundo aspecto proporciona una vacuna que comprende la cepa bacteriana del primer aspecto y un portador tal como medio de de crecimiento de *M. hyopneumoniae*, agua estéril o solución salina isotónica estéril.

Una vacuna es una preparación biológica que establece o mejora la inmunidad a una enfermedad particular. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para prevenir o mejorar los efectos de una futura infección por el patógeno) o terapéuticas (por ejemplo, para tratar la infección). La vacuna del segundo aspecto es profiláctica para una enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El portador apropiado será evidente para aquellos expertos en la técnica y dependerá en gran parte de la ruta de administración. La vacuna puede comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes.

Aún los componentes adicionales que pueden estar presentes en la vacuna son adyuvantes, conservantes, estabilizantes químicos, u otras proteínas antigénicas. Normalmente, los estabilizantes, adyuvantes y conservantes se optimizan para determinar la mejor formulación para eficacia en el animal objetivo. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, vainillina de etilo, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Los ingredientes estabilizantes adecuados que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, casaminoácidos, sacarosa, gelatina, rojo fenol, N-Z amina, difosfato de monopotasio, lactosa, hidrolizado de lactalbúmina, y leche en polvo. Se utiliza un adyuvante convencional para atraer leucocitos o potenciar una respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, entre otros, MPL.TM. (lípidos 3-O-desacilado monofosforil AA; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT), aceite mineral y agua, hidróxido de aluminio, Amphigen, Avridina,

L121/escualeno, D-lactida-polilactida/glucósido, pliois Plurónicos, muramil dipéptido, Bordetella muerta, saponinas, tales como Quil A o StimulonTM. QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.) y toxina del cólera (ya sea en una forma del tipo silvestre o forma mutante, por ejemplo, en donde el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 se sustituye por otro aminoácido, preferiblemente una histidina, de conformidad con la Solicitud de Patente Internacional No. WO2000/018434

En una realización, la vacuna, si se inyecta tiene poca o ninguna reacción adversa o no deseada en el sitio de inyección, por ejemplo irritación de la piel, hinchazón, erupción cutánea, necrosis, sensibilización de piel.

La invención se relaciona adicionalmente con la protección contra la enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La vacuna del segundo aspecto es profiláctica para una enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La "profilaxis" o terapia "profiláctica" o "preventiva" o "protección contra" como se menciona aquí incluye mantener la infección que ocurre u obstaculizar o defender de o proteger de la aparición o gravedad de una enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que incluye prevenir, proteger o disminuir la gravedad de un síntoma o característica de enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero todavía no se ha diagnosticado que la tiene. También incluye la reducción del período de la infección o la incidencia de los síntomas y reducir el tamaño de cualquier lesión.

"Profilaxis", como se utiliza aquí abarca la prevención total de la enfermedad o una reducción en la extensión o síntomas de la enfermedad. También se refiere a la reducción o inhibición de la transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* o la prevención de las bacterias que se establecen en el anfitrión o la protección contra la infección secundaria con otras cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* u otros agentes infecciosos.

La vacuna del segundo aspecto se puede preparar para administración a los cerdos en la forma de, por ejemplo, líquidos, polvos, aerosoles, comprimidos, cápsulas, comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico, o supositorios. Las rutas de administración incluyen, sin limitación, administración parenteral, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración oral, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar, administración rectal, administración vaginal, y similares.

En una realización preferida se formula la vacuna para administración al tracto respiratorio, por ejemplo, por administración intranasal, administración en aerosol o administración por inhalación por la boca o la nariz. Esta ruta de administración se prefiere debido a la naturaleza de la inmunidad protectora por *M. hyopneumoniae* puede ser la inmunidad local (pulmonar) y la inmunidad mediada por células en la prevención de la enfermedad en lugar de a partir de anticuerpos circulantes. La presentación de la vacuna en el tracto respiratorio puede estimular una respuesta inmune local. Por lo tanto la administración localizada de la vacuna puede ser más efectiva. Adicionalmente al administrar la vacuna en el lugar o granero (administración masiva de rociado grueso) y al permitir que los cerdos lo inhalen, se reduce la mano de obra involucrada en la vacunación de un gran número de animales. La vacunación con aerosol (vacunación por pulverización) se utiliza actualmente sobre una base comercial para vacunar a las aves de corral con eficacia contra ciertas enfermedades y se ha mostrado en nuestros ejemplos que son adecuadas para la vacunación de los cerdos.

La administración intranasal cubre cualquier administración a través de las fosas nasales o el hocico. La vacuna se puede aplicar a la cavidad nasal como una solución, suspensión o polvo seco. Las soluciones y suspensiones se pueden administrar por vía intranasal utilizando, por ejemplo, una pipeta, un cuentagotas o un aerosol, opcionalmente un pulverizador de aerosol. Los polvos secos se pueden administrar por vía intranasal mediante inhalación.

5

La administración en aerosol se refiere a la administración de la vacuna en forma de una suspensión de partículas sólidas finas o gotitas líquidas en un gas.

10

La inhalación (también conocida como inspiración) es el movimiento de aire desde el entorno externo, a través de las vías respiratorias, y en los alvéolos en los pulmones.

Una dosis efectiva de la vacuna que se emplea terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y la condición del cerdo.

15

Los niveles de dosificación para la vacuna por lo general serán del orden de aproximadamente  $10^4$  a  $10^8$  unidades de cambio de color (CCU) por ml por dosis, y preferiblemente de aproximadamente  $10^5$  a  $10^7$  CCU por ml por dosis.

20

Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica para cualquier animal porcino particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración y ruta de administración.

La selección y ajuste hacia arriba o abajo de la dosis efectiva se encuentra dentro del alcance de la técnica.

25

En una realización preferida, la vacuna se administra por vía intranasal, por aerosol o mediante inhalación.

Los términos “cerdo” y “porcino” se utilizan aquí de forma intercambiable y se refieren a los lechones, cerdos, cerdos jóvenes, cerdos castrados, jabalís y miembros de la familia de los suidos.

30

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado o número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

35

También hay que señalar que, tal como se utiliza en la especificación objeto, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen los aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40

Será evidente para el experto en la técnica que mientras que la invención se ha descrito con cierto detalle para propósitos de claridad y comprensión, diversas modificaciones y alteraciones a las realizaciones y métodos descritos aquí se pueden hacer sin apartarse del alcance del concepto de la invención descrito en esta especificación.

45

La invención se describe ahora con más detalle mediante referencia al siguiente ejemplo. El ejemplo se proporciona solo con fines de ilustración, y no se pretende que sean limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención abarca cualquiera y todas las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada aquí.

Ejemplo 1: Preparación de la cepa de la vacuna

50

La cepa LKR de *Mycoplasma hyopneumoniae* australiana es una muestra de matadero de pulmón de cerdo que presenta la enfermedad típica de neumonía enzoótica (Lloyd and Etheridge (1981), J. Comp. Path. 91:77-83). El aislado se cultivó y se almacenó en la colección de cultivos de referencia de *Mycoplasma* en la Universidad de Adelaida, Australia del Sur. Un cultivo de esta cepa se obtuvo posteriormente por el grupo de *Mycoplasma* en la Universidad de Melbourne, Victoria.

55

El cultivo se pasó in vitro tres veces antes de ser sometido a mutagénesis utilizando N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) a 200 mg/mL utilizando un método descrito previamente (Nonamura and Imada (1982) Avian Diseases 26:763-775). En pocas palabras, un cultivo de cepa LKR de *M. hyopneumoniae* se hace crecer hasta la fase logarítmica tardía y se sedimenta por centrifugación. Las células se lavaron en solución salina regulada con fosfato (PBS) y se expusieron a NTG. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en medio Friis modificado (Friis, N.F. 1975) y se incubaron a 33° C durante 4 h. El cultivo se pasó a través de un filtro de 0.45 µm, se hacen diluciones apropiadas y se colocan alícuotas sobre placas de agar y se incubaron a 33° C. Las colonias que habían crecido se clonaron en 3 ml de caldo y se incubaron a 33° C. Las ampollas de los clones se almacenaron a -70° C y se determinó la sensibilidad a la temperatura de cada clon.

60

La sensibilidad a la temperatura de tS19 se determinó al realizar una valoración por duplicado y la incubación a 33 °C y 39.5 °C. El título es normalmente  $> 1 \times 10^8$  CCU/ml a 33° C y  $< 1 \times 10^2$  CCU/ml a 39.5 °C.

La cepa TS19 se depositó bajo el Tratado de Budapest como NM 04/41259.

La cepa ts19 y la cepa LKR se secuenciaron utilizando técnicas estándar, permitiendo de esta manera que la cepa atenuada sea caracterizada genéticamente. Se encontró que la cepa ts19 para contener una serie de mutaciones genéticas en comparación con su cepa maestro y los genes que contienen estas mutaciones se identifican en la Tabla 1.

Ejemplo 2: Preparación de vacuna

Para preparar una vacuna, un cultivo de ts19 se hace crecer a 33° C en medio de Friis modificado que contiene rojo fenol (indicador de pH) hasta que se observó un cambio de color ácido. La vacuna se tituló en los medios Friis modificados utilizando una placa de microtitulación de 96 pozos. Se realizó una serie de diluciones de diez veces a través de las primeras 10 de las 12 columnas de la placa de microtitulación. Los últimos dos filas permanecieron no inoculadas y sirvieron como un medio de solo control (negativo). Hasta seis placas de microtitulación fueron utilizadas en cada titulación.

Después de incubación hasta 3 semanas las placas se calificaron por cambio de color y el título promedio medido a través del número más probable (NMP). El título promedio final se expresa como unidades de cambio de color (CCU) por mL.

El cultivo de vacuna ts19 se mantuvo en almacenamiento a largo plazo como un formato de "húmedo congelado" a -70° C a -80° C. Como alternativa, se liofilizó el cultivo de vacuna ts19 (secado por congelamiento) y se mantiene en almacenamiento a a -20° C.

Ejemplo 3: Seguridad de vacuna y estudio de colonización

Un estudio se llevó a cabo con el fin de evaluar el perfil de seguridad de la cepa de la vacuna ts19. El diseño del estudio implicó el uso de cerdos de 6 semanas de edad, obtenidos a partir de una piara de cerdos libre de Mycoplasma. El estudio se realizó bajo nivel de bioseguridad PC2 en el CSIRO Commonwealth Serum Industry Research Organisation), Werribee, Victoria, Australia. Un total de 20 cerdos fueron asignados aleatoriamente a dos grupos de 10 cerdos cada uno (ver Tabla 2).

Tabla 2: Estudio de seguridad en la cepa de la vacuna ts19

Grupo	Propósito	Número de cerdos tratados con medio de M. hyopneumoniae en el primer día del ensayo	Número de cerdos vacunados con ts-19 (CCU/dosis) en el primer día del ensayo	Número total de cerdos por grupo
1	Vacunado simulado (control negativo)	10	---	10
2	Seguridad (Alta Sobredosis)	---	10	10
Total				20

La vacuna fue suministrada por vía intranasal por lo cual solo las pruebas de seguridad para la presentación de la mucosa de la vacuna. Grupo 1 (control no vacunado) y Grupo 2 (alta sobredosis de cerdos vacunados) se llevaron a cabo durante 59 días para la observación clínica (Tabla 2).

Todos los cerdos en este estudio de seguridad se controlaron dos veces al día para la temperatura corporal rectal desde un día antes de la vacunación, así como cuatro días después de la vacunación. Todos los cerdos también fueron monitorizados para detectar signos respiratorios como tos, estornudos, disnea y taquipnea. Todos los cerdos fueron evaluados para lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas. Las lesiones pulmonares macroscópicas fueron evaluadas utilizando el método Hannan et al, 1982. Adicionalmente, se tomaron muestras de frotis nasal, de pulmón y tráquea para propósitos de análisis PCR.

Los cerdos de cada grupo también se ensayaron 3 semanas después de vacunación para la presencia de M. hyopneumoniae en sus cavidades nasales utilizando una técnica de PCR. Por último, se monitorizaron los cerdos para el aumento de peso durante el período de estudio. Los resultados mostraron que no se observaron signos clínicos en ninguno de los cerdos. No hubo un aumento significativo en la temperatura detectada entre los grupos vacunados y el grupo de control no vacunado. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal entre los grupos de control no vacunados y vacunados. En la necropsia, dos de cada diez cerdos del grupo de alta sobredosis cada uno tenía una pequeña lesión macroscópica típica de pneumoniae enzoótica. No se observaron lesiones adicionales por el análisis microscópico del tejido pulmonar. En general, la cepa de la vacuna ts19 sensible a la temperatura demostró ser segura, incluso a una alta sobredosis.



El análisis de PCR (utilizando cebadores específicos para *M. hyopneumoniae*) mostró la presencia de *M. hyopneumoniae* en las fosas nasales de los cerdos vacunados a las 3 semanas y 8 semanas después de vacunación (véase Figura 1). Los estudios de colonización de *M. hyopneumoniae* utilizando análisis de PCR también mostraron la presencia de *M. hyopneumoniae* en la tráquea (ya sea en las regiones superior, media e inferior) y colectivamente en por lo menos 60% de la tráquea de los cerdos vacunados (véase Figura 2). Estos resultados indican la colonización de la cepa de la vacuna ts19 en las fosas nasales y de la tráquea.

Ejemplo 4: Modelo de exposición de estudio de eficacia de vacuna – Protección documentada

Se llevó a cabo un estudio con el fin de evaluar la eficacia de la cepa de la vacuna ts19. El diseño del estudio implicó el uso de cerdos de 6 semanas de edad, obtenidos de un rebaño de cerdos libres de *Mycoplasma*. El estudio se realizó bajo nivel de bioseguridad PC2 en el CSIRO Commonwealth Serum Industry Research Organisation), Werribee, Victoria, Australia. Un total de 56 cerdos fueron asignados aleatoriamente a tres grupos de 12 cerdos de cada grupo vacunado y 10 cerdos para cada uno de los grupos de control (véase Tabla 3).

Tabla 3: Estudio de eficacia sobre la vacuna ts19

Grupo	Propósito	Número de cerdos tratados con medio de <i>M. hyopneumoniae</i> en el primer día del ensayo	Número de cerdos vacunados con ts-19 (CCU/dosis) en el primer día del ensayo	Número de cerdos expuestos con aislado de campo Australiano en el día 22 del ensayo	Número total de cerdos por grupo
1	Vacunado simulado (control negativo)	10	---	---	10
2	Eficacia	---	10 <sup>6</sup>	12	12
3	Eficacia	---	10 <sup>7</sup>	12	12
4	Eficacia	---	10 <sup>8</sup>	12	12
5	Neon-vacunado (control positivo)	---	---	10	10
Total					56

La vacuna fue suministrada por ruta intranasal con ello solo se prueba la eficacia para la presentación de la mucosa de la vacuna. Todos los grupos excepto el grupo negativo no vacunado, no expuesto fueron expuestos a los 22 días después de vacunación mediante administración intranasal de un aislado de *M. hyopneumoniae* de campo Australiano. Las autopsias se realizaron durante 3 días (días 57, 58 y 59 después de vacunación). A lo largo del estudio se monitorizaron todos los grupos diariamente para detectar signos clínicos como tos, estornudos, disnea y taquipnea. Se tomaron mediciones de peso corporal al principio y al final del estudio. A los 22 días después de vacunación (y antes de exposición) se tomaron frotis nasales para análisis de PCR para determinar la presencia de *M. hyopneumoniae* de cada grupo.

Los resultados mostraron que no se observaron signos clínicos y no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso corporal en todos los grupos analizados. El análisis de frotis mostró presencia de *M. hyopneumoniae* a los 22 días después de vacunación en el 60 -70% de los cerdos vacunados pre-exposición (véase la Figura 3). Todos los cerdos de control vacunados simulados fueron negativos para *M. hyopneumoniae* por análisis de PCR. En la necropsia, el análisis de lesión macroscópica (Hannan et al., 1982) indicó la ausencia de lesiones en el grupo de control vacunado simulado vacunado, así como los grupos vacunados a 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> CCU/ml/dosis. Uno de cada 10 cerdos vacunados a 10<sup>8</sup> CCU/ml/dosis mostró presencia de una pequeña lesión macroscópica. Sin embargo, 4 de cada 10 cerdos que no fueron vacunados pero expuestos mostraron signos clínicos de tos y estornudos. En la necropsia, el examen de los pulmones de los cuatro cerdos mostró lesiones pulmonares macroscópicas típicas de infección por *M. hyopneumoniae*.

En general, la cepa de la vacuna ts19 sensible a temperatura mostró ser efectiva en la protección contra infección por *M. hyopneumoniae*.

Ejemplo 5: Eficacia de la vacuna en diferentes dosis y comparación con una vacuna muerta comercial.

Se llevó a cabo un estudio con el fin de evaluar la eficacia de la cepa de la vacuna ts19 en cuatro dosis diferentes. El diseño del estudio implicó el uso de cerdos spf de 3 a 4 semanas de edad. El estudio se realizó en una instalación de PC2 en el Centro de Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) - una instalación de pruebas del gobierno en Tecamac, México. Un total de 70 cerdos fueron asignados aleatoriamente a siete grupos, conteniendo cada uno 10 cerdos (Tabla 4).

Tabla 4: Dosis protectora mínima y estudio de eficacia comparativo

Grupo	Propósito	Dosis de vacuna ccu/ml/dosis	Número de cerdos vacunados	Número de cerdos expuestos	Número Total de cerdos por
-------	-----------	------------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

					grupo
1	Control simulado	NA	0	0	10
2	ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>3.0</sup>	10	10	10
3	ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>4.0</sup>	10	10	10
4	ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>5.0</sup>	10	10	10
5	ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>6.0</sup>	10	10	10
6	Comercial inactivado <sup>b</sup>	2 mL	10	10	10
7	Control positivo	NA	0	10	10
Total	NA	NA	50	60	70

<sup>a</sup> La vacuna se suministró mediante pulverización intranasal  
<sup>b</sup> La vacuna se suministró mediante administración intramuscular

Se suministraron cuatro dosis diferentes de vacuna ts19 (10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> CCU/ml) a cuatro grupos separados de los cerdos por ruta intranasal. Un quinto grupo recibió 2 mL de una vacuna inactivada comercial suministrada por ruta intramuscular. Los grupos positivos (no vacunados, pero expuestos) y negativos (no vacunados, no expuestos) también se incluyeron en este estudio. Todos los grupos excepto el grupo control negativo fueron expuestos en dos momentos. La primera exposición se llevó a cabo a los 22 días después de vacunación por administración intranasal utilizando un aislado de *M. hyopneumoniae* (cepa IOWA 194). La segunda exposición se llevó a cabo a los 84 días después de la vacunación con la misma cepa de exposición. A lo largo del estudio se monitorizaron todos los grupos diariamente para detectar signos clínicos como tos, estornudos, disnea y taquipnea. Las mediciones de peso corporal fueron tomadas al principio y al final del estudio.

Los resultados mostraron que no hubo signos clínicos durante todo el período de prueba de 105 días. El análisis de varianza para un rendimiento en peso entre el grupo de control positivo y cada uno de los grupos vacunados indicó que ts19 a dosis de 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> CCU/ml mostró aumento significativo en el peso corporal en comparación con el grupo de control positivo (Figura 4). El grupo vacunado con la vacuna comercial no mostró ninguna diferencia significativa en el aumento de peso en comparación con el grupo de control positivo (Figura 4, Tabla 5). En la necropsia, se realizó un análisis de la lesión macroscópica para cada grupo. El criterio para determinación de la dosis protectora mínima se basó en un índice de protección de ≥70% con respecto a la reducción de la gravedad de las lesiones pulmonares. La dosis protectora mínima para ts19 se determinó que era 10<sup>4</sup> CCU/mL ya que se logró un índice de protección del 70% a esta dosis con respecto a la reducción de la gravedad de las lesiones pulmonares (Figura 5). Las dosis más altas de ts19 (10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> CCU/ml) también se probaron y se encontró que proporcionan inhibidores de proteasa de 83% y 88%, respectivamente, en relación con la reducción en la gravedad de las lesiones pulmonares (Figura 6). La vacuna inactivada comercial alcanzó un IP de sólo el 37%, que es muy inferior a la dosis más baja de ts19 utilizado (10<sup>3</sup> CCU/mL que alcanzó un IP del 60%).

Tabla 5. Análisis de Varianza de la ganancia de peso promedio de los grupos vacunados en comparación con el grupo de control positivo en DPV-104/105

Grupo	Tratamiento	Análisis de Varianza (P) en comparación con el control positivo
1	Control negativo	0.001
2	ts 19 10 <sup>3.0</sup>	0.394
3	ts 19 10 <sup>4.0</sup>	0.175
4	ts 19 10 <sup>5.0</sup>	0.033
5	ts 19 10 <sup>6.0</sup>	0.004
6	Vacuna comercial	0.315
7	Control positivo	NA

Dosis ts19 (CCU / mL). No hubo diferencias significativas (P > 0.05), una diferencia significativa (P < 0.05).

Reivindicaciones

- 5 1. Una cepa de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* depositada ante el National Measurements Institute (Australia) bajo el número de acceso NM04/41259, cuya cepa es sensible a la temperatura y atenuada.
- 10 2. Una composición de vacuna que comprende la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la reivindicación 1 y un portador, opcionalmente un adyuvante, y/o opcionalmente por lo menos un agente infeccioso adicional, cuya vacuna en una cantidad inmunizante es capaz de provocar inmunidad protectora contra una enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 15 3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que el agente infeccioso es un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.
- 20 4. La composición de vacuna de la reivindicación 2 o reivindicación 3 formulada para administración al tracto respiratorio.
- 25 5. La composición de vacuna de la reivindicación 2 o reivindicación 3 en formulación de aerosol.
- 30 6. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para uso en prevenir una enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal porcino.
7. La vacuna para uso de acuerdo con reivindicación 6, en la que la vacuna se administra mediante inhalación, por vía intranasal o a través de un aerosol.
8. Un método para elaborar la vacuna de la reivindicación 2 que comprende combinar la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la reivindicación 1 con un portador, opcionalmente un adyuvante y/o opcionalmente por lo menos un agente infeccioso adicional.
9. Uso de la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para prevenir enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal porcino.
10. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o el uso de la reivindicación 9 en la que la enfermedad provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae* es la neumonía enzoótica o neumonía de micoplasma porcina.

FIGURA 1

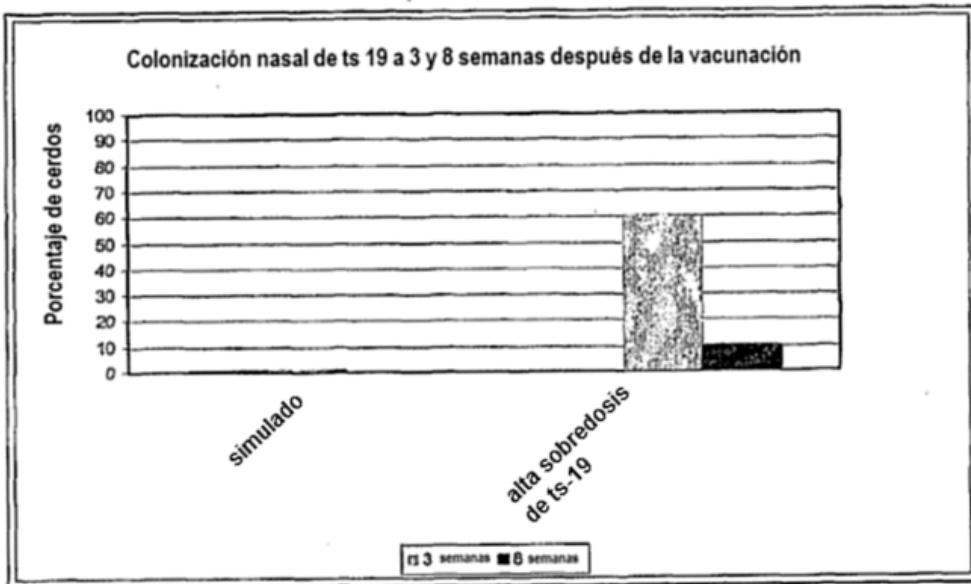


FIGURA 2

Colonización de la tráquea en post-mortem (59 DPV)

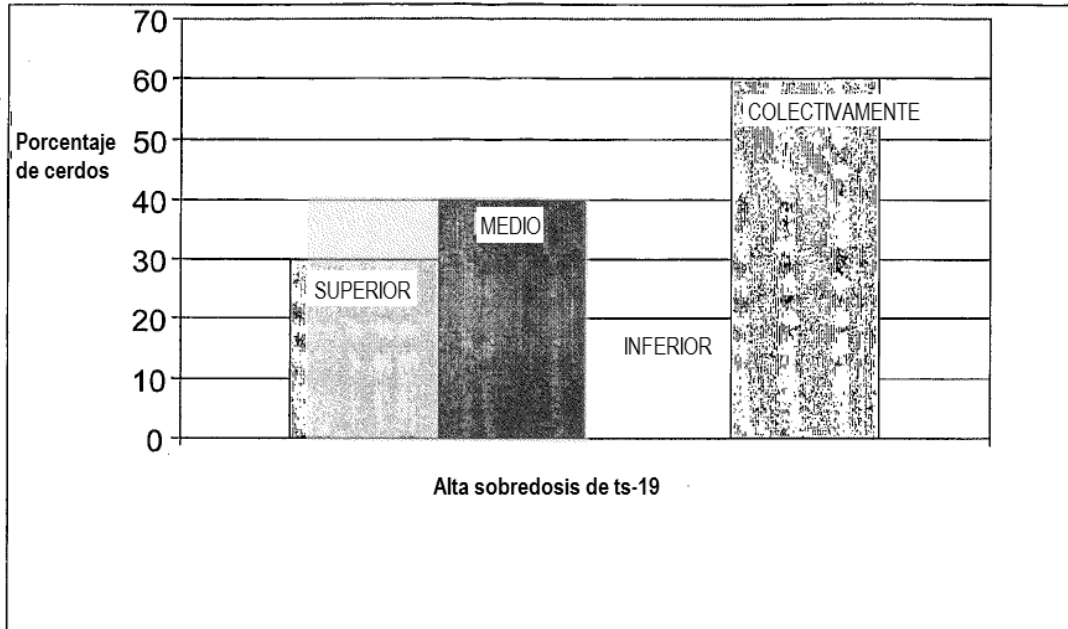


FIGURA 3

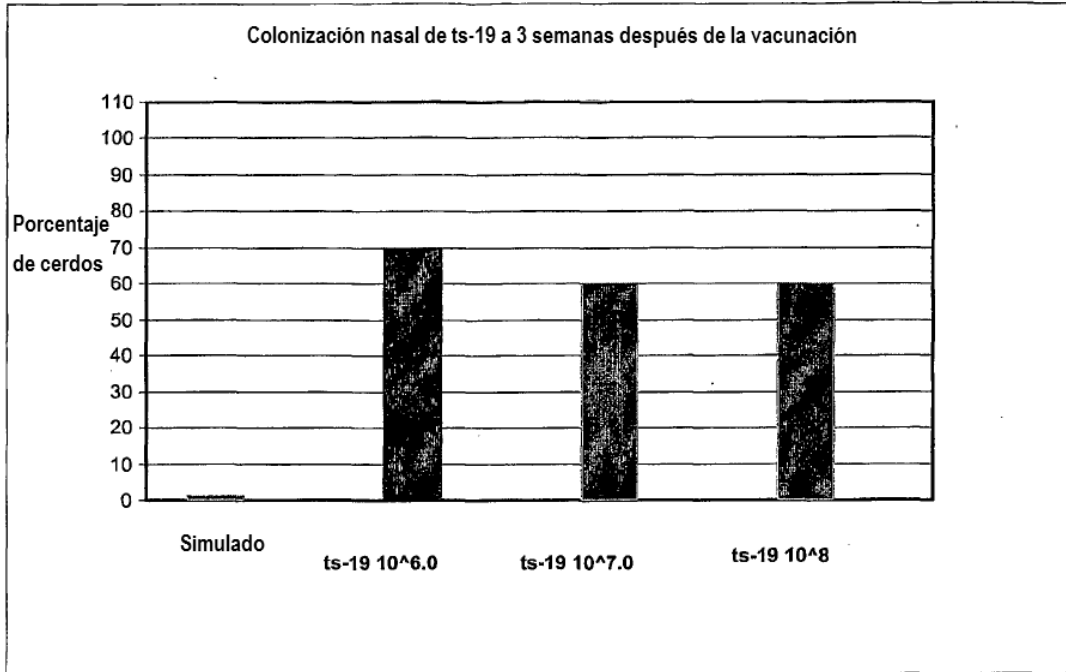


FIGURA 4

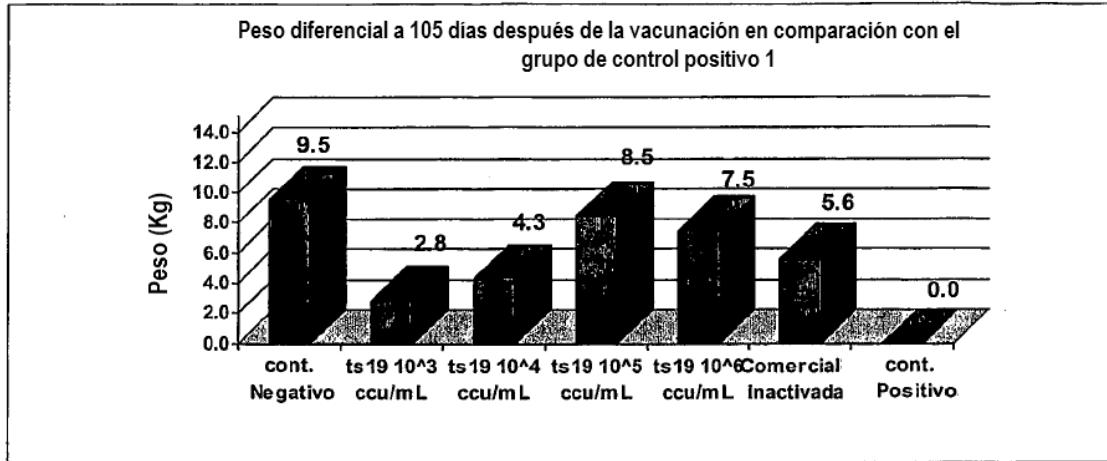


FIGURA 5

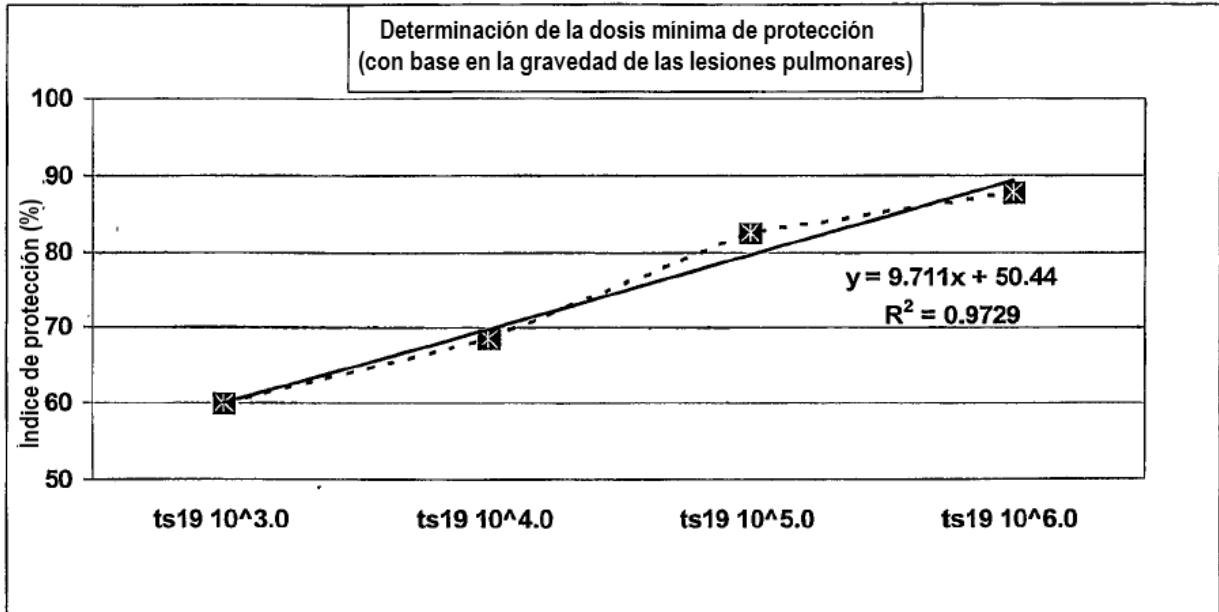




FIGURA 6

