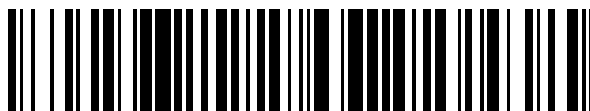


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 925**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2013** **PCT/US2013/035088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013** **WO13152083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2013** **E 13718432 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 2833910**

54 Título: **Vacuna de combinación de PCV/Mycoplasma hyopneumoniae**

30 Prioridad:

04.04.2012 US 201261620175 P

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

06.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NITZEL, GREGORY P.;
GALVIN, JEFFREY E.;
GARRETT, JOHN KEITH;
KULAWIK, JAMES R. II;
RICKER, TRACY L. y
SMUTZER, MEGAN MARIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 925 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 de combinación de PCV/*Mycoplasma hyopneumoniae*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a circovirus porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* o M.hyo). Más particularmente, la invención se refiere a una composición inmunogénica multivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina y su uso en una vacuna para proteger cerdos contra neumonía enzoótica y síndrome multisistémico consuntivo postdestete (PMWS).

Antecedentes de la invención

La neumonía enzoótica en cerdos, también denominada neumonía micoplásmica, está provocada por M.hyo. La enfermedad es una enfermedad crónica, no letal, que afecta a cerdos de todas las edades. Los cerdos infectados muestran solamente síntomas leves de tos y fiebre, pero la enfermedad tiene un impacto económico significativo debido a la reducción de la eficacia de alimentación y reducción del aumento de peso. La neumonía enzoótica es transmitida entre cerdos a través de las fosas nasales por organismos aéreos expulsados de los pulmones de cerdos infectados. La infección primaria por M.hyo puede seguirse de infección secundaria por otras especies de micoplasma (*Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma flocculare*) así como otros patógenos bacterianos.

M.hyo es un microbio procariota pequeño capaz de vivir libremente, aunque se encuentra con frecuencia asociado con células eucariotas debido a que tiene requisitos absolutos de esteroides y ácidos grasos. Estos requisitos necesitan en general crecimiento en medio que contiene suero. M.hyo está limitado por una membrana celular, pero no una pared celular.

La asociación física de micoplasmas con la superficie de células hospedadoras es la base del desarrollo y la persistencia de la neumonía enzoótica. M.hyo infecta el tracto respiratorio de cerdos, colonizando la tráquea, bronquios y bronquiolos. El micoplasma produce un factor ciliostático que provoca que los cilios que revisten las vías respiratorias detengan su movimiento. Con el tiempo, los cilios se degradan, haciendo a los cerdos propensos a la infección por patógenos secundarios. Se observan lesiones características de áreas de consolidación entre moradas y grises en animales infectados. Los estudios de animales sacrificados han revelado lesiones en 30 a 80 % de cerdos. Los resultados de 37 piaras en 13 estados indicaron que el 99 % de las piaras tenían cerdos con lesiones de neumonía típicas de neumonía enzoótica. Por lo tanto, existe una gran necesidad de medidas preventivas y de tratamiento eficaces.

Los antibióticos tales como tiamulina, trimetoprim, tetraciclinas y lincomicina tienen algunos beneficios, pero son caros y requieren uso prolongado. Adicionalmente, no se ha mostrado que los antibióticos eliminen eficazmente la propagación o reinfección de M.hyo. En ocasiones es posible la prevención manteniendo las piaras libres de patógenos pero con frecuencia se produce reintroducción de M.hyo. Debido a las graves consecuencias económicas de la neumonía porcina, se han buscado vacunas contra M.hyo. Se han comercializado vacunas que contienen preparaciones de organismos micoplásmicos cultivados en medio que contiene suero, pero han provocado dudas acerca de reacciones adversas inducidas por los componentes del suero (tales como inmunocomplejos o proteínas específicas no inmunogénicas) presentes en el material inmunizante. Otros intentos de proporcionar vacunas de M.hyo han tenido éxito, pero la enfermedad sigue estando extendida. Se ha desvelado una vacuna basada en el sobrenadante de un cultivo de M.hyo en Okada M. y col., 2000, Vaccine, 18: 2825-2831. El documento WO 2009/126356 desvela composiciones multivalentes que comprenden antígenos de *M. hyo* y PCV2. Un ejemplo muestra la vacunación de lechones con una única dosis de una mezcla de tres vacunas: Ingelvac® MycoFLEX™, Ingelvac® PRRS MLV™ e Ingelvac® CircoFlex™.

M.hyo y circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) son los dos patógenos más prevalentes que se encuentran en la industria porcina. Los cerdos infectados con PCV2 muestran un síndrome denominado habitualmente síndrome multisistémico consuntivo postdestete (PMWS). El PMWS se caracteriza clínicamente por consunción, palidez de la piel, retraso del desarrollo, dificultad respiratoria, diarrea e ictericia. Además de PMWS, PCV2 se ha asociado con varias otras infecciones incluyendo pseudorrabia, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de Glasser, meningitis estreptocócica, salmonelosis, colibacilosis postdestete, hepatitis dietética y bronconeumonía supurante. M.hyo está asociado con la neumonía enzoótica y también se ha implicado como uno de los cofactores principales en el desarrollo de la enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD).

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) está causado por un arterivirus, que tiene una afinidad particular por los macrófagos, particularmente los hallados en el pulmón (macrófagos alveolares). Estos macrófagos ingieren y eliminan bacterias y virus invasores, pero no en el caso del virus del PRRS (PRRSV). En el caso del virus del PRRS, se multiplica dentro de los macrófagos produciendo más virus y destruye los macrófagos. Una vez que el PRRSV ha entrado en una piara, tiende a permanecer presente y activo de forma indefinida. Hasta el 40 % de los macrófagos se destruyen, lo que permite a las bacterias y otros virus proliferar y provocar daños. Un ejemplo

habitual de esto es el aumento notable de la gravedad de la neumonía enzoótica en unidades de crecimiento/finalizadoras cuando se infectan con virus del PRRS. Más de la mitad de cerdos negativos para virus del PRRS en edad de destete se infectan antes de entrar en el mercado.

- 5 Es necesaria una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo contra infección tanto por PCV2 como por *Mycoplasma* en cerdos. Preferentemente, esta vacuna multivalente será compatible con otros antígenos porcinos, tales como antígeno del virus del PRRS. Sería muy deseable proporcionar una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo de una única dosis, lista para usar en un frasco.

Sumario de la invención

- 10 La presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina. En un aspecto, la parte soluble de la preparación de células completas de M.hyo se ha tratado con proteína A o proteína G antes de añadirse a la composición inmunogénica. En un aspecto adicional, la composición
15 está en forma de una composición líquida lista para usar.

La preparación de M.hyo incluye antígenos proteicos de M.hyo.

- En algunas realizaciones, la composición de la presente invención induce una respuesta inmunitaria protectora contra M.hyo y PCV2. En una realización, el antígeno de PCV2 está en forma de un circovirus quimérico de tipo 1-
20 tipo 2, incluyendo el virus quimérico un circovirus porcino recombinante inactivado de tipo 1 que expresa la proteína ORF2 de circovirus porcino de tipo 2. En otra realización, el antígeno de PCV2 está en forma de una proteína ORF2 recombinante. En otra realización más, la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus.

- En algunas realizaciones, la composición de PCV2/M.hyo de la presente invención incluye además al menos un antígeno adicional. En una realización, el al menos un antígeno adicional es protector contra un microorganismo que
25 puede provocar enfermedad en cerdos.

- En una realización, el microorganismo incluye bacterias, virus o protozoos. En otra realización, el microorganismo se selecciona de, pero sin limitación, los siguientes: virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus hyicus*, *Staphylococcus hyicus*,
30 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, bacterias leptospiras, *Lawsonia intracellularis*, virus de la gripe porcina (SIV), antígeno de *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus respiratorio porcino, virus de diarrea epidémica porcina (PED), rotavirus, virus torque teno (TTV), citomegalovirus porcino, enterovirus porcinos, virus de la encefalomiocarditis, un patógeno causante de enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica (CSF) y un patógeno causante de gastroenteritis transmisible porcina, o combinaciones de los
35 mismos.

- En algunas realizaciones, la composición de la presente invención incluye además un adyuvante. En una realización, el adyuvante se selecciona de, pero sin limitación, los siguientes: un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos. En otra realización, la composición de la presente invención incluye además un
40 transportador farmacéuticamente aceptable.

- En determinadas realizaciones, la composición de la presente invención induce una respuesta inmunitaria protectora tanto contra M.hyo como contra PCV2 cuando se administra como una administración de una única dosis. En realizaciones adicionales, la composición induce una respuesta inmunitaria protectora contra M.hyo, PCV2, y al menos un microorganismo adicional que puede provocar enfermedad en cerdos cuando se administra como una
45 administración de una única dosis. En más realizaciones adicionales, una composición de la presente invención induce una respuesta protectora tanto contra M.hyo como contra PCV2 cuando se administra como una administración de dos dosis.

- La presente invención también proporciona un procedimiento para inmunizar un cerdo contra M.hyo y PCV2. Este procedimiento incluye administrar al cerdo una composición inmunogénica multivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina. La parte soluble de la preparación de M.hyo de la composición administrada incluye antígenos proteicos de M.hyo.
50

- 55 En una realización del procedimiento de la presente invención, la composición se administra por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica o por vía subcutánea. En otra realización del procedimiento de la presente invención, la composición se administra en una única dosis. En otra realización más del procedimiento de la

presente invención, la composición se administra como dos dosis.

En una realización adicional del procedimiento de la presente invención, la composición de PCV2/M.hyo se administra junto con al menos un antígeno adicional que es protector contra un microorganismo que puede provocar enfermedad en cerdos, tal como uno o más de los microorganismos descritos anteriormente. Dichos otros antígenos pueden proporcionarse simultáneamente con la composición de PCV2/M.hyo (es decir, como vacunas individuales separadas) o combinados en una vacuna lista para usar.

En una realización adicional, la composición se administra a cerdos que tienen anticuerpos obtenidos por vía materna contra al menos uno de M.hyo y PCV2. En una realización adicional más, la composición se administra a cerdos que tienen anticuerpos obtenidos por vía materna tanto contra M.hyo como contra PCV2.

En una realización, la composición se administra a cerdos a las 3 semanas de edad o mayores.

La presente invención proporciona además un kit. Este kit contiene un frasco que incluye una composición inmunogénica. Esta composición inmunogénica incluye tanto un antígeno de PCV2 como el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina. En una realización, este kit incluye además un manual de instrucciones que contiene la información para administrar la composición inmunogénica. En otra realización, la composición inmunogénica en el frasco se proporciona como una composición líquida lista para usar.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica. Este procedimiento incluye: i) cultivar M.hyo en un medio adecuado durante periodos que varían de 18 a 144 horas; ii) inactivar posteriormente el cultivo de M. hyo; iii) recoger el líquido de cultivo inactivado, en el que el líquido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como material celular insoluble; iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble mediante centrifugación, filtración o precipitación; v) eliminar sustancialmente tanto IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina; y vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de PCV2.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la eficacia de vacunas monovalentes de M.hyo preparadas con antígenos de M.hyo de diferentes tratamientos (T02-T10 descritos en el Ejemplo 3) frente a un placebo (T01). Los resultados se presentan como % de valores medios mínimos cuadráticos de lesión pulmonar.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de potencia de antígeno de PCV2 (ELISA de antígeno de PCV2) de vacunas de M.hyo en combinación con virus quimérico de PCV de tipo 1-tipo 2 destruido. El virus quimérico se incluyó en las composiciones a un nivel inicial de aproximadamente $1,6 \leq PR$. El estado de cada muestra se expresa como potencia relativa (PR).

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de viremia de PCV2 (PCR cuantitativa de PCV2) observados con formulaciones de vacuna de PCV/M.hyo que emplean diferentes plataformas de adyuvantes.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados serológicos de ELISA de anticuerpo de PCV2 (M/P) observados con formulaciones de vacuna de PCV/M.hyo que emplean diferentes plataformas de adyuvantes los días 1, 20 y 42 de exposición.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de PCV2 obtenida con los tratamientos T02-T04 descritos en el Ejemplo 7 frente a un placebo (T01). Los resultados se expresan como copias de ADN de PCV2/ml.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la diseminación nasal de PCV2 obtenida con los tratamientos T02-T04 descritos en el Ejemplo 7 frente al placebo (T01). Los resultados se expresan como copias de ADN de PCV2/ml.

La Figura 7 (A y B) son gráficos que muestran los resultados de un ensayo de interferón-gamma (IFN- γ) que mide respuestas de inmunidad celular (IC) específicas de PCV2. Los resultados de postvacunación/preexposición se presentan en la Figura 7A, y los resultados de postvacunación/postexposición se presentan en la Figura 7B. La estimulación de 5×10^6 células se consideró significativa.

La Figura 8 representa la eficacia de M.hyo de las formulaciones de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo en aceite SP. Las puntuaciones de pulmón para formulaciones que emplean tratamientos de M.hyo T02-T08 frente a un placebo (T01) se representan gráficamente en la Figura 8A. La tabla en la Figura 8B representa el contraste de tratamientos T02-T08 con el placebo.

La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra una realización de un procedimiento de fabricación usado para preparar antígeno de M.hyo tratado con proteína A compatible con PCV2.

La Figura 10 es una tabla que muestra la evaluación de adyuvantes para actividad viricida contra virus del PRRS.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica p46 de la cepa P-5722 de M.hyo;
 SEQ ID NO: 2 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a p46 de la cepa P-5722 de M.hyo;
 SEQ ID NO: 3 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica p97 de la cepa P-5722 de M.hyo;
 SEQ ID NO: 4 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a p97 de la cepa P-5722 de M.hyo;
 SEQ ID NO: 5 es una realización de una secuencia genómica que codifica un virus PCV1-2 quimérico;
 SEQ ID NO: 6 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 7 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente al polipéptido de ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 8 es una realización de una secuencia genómica que codifica un virus PCV1-2 quimérico;
 SEQ ID NO: 9 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 10 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente al polipéptido de ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 11 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente al polipéptido de ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 12 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;
 SEQ ID NO: 13 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente al polipéptido de ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 14 es una realización de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;
 SEQ ID NO: 15 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente al polipéptido de ORF2 de un circovirus porcino;
 SEQ ID NO: 16 es una realización de una secuencia genómica de una forma no virulenta del aislado de virus del PRRS norteamericano designado P129; y
 SEQ ID NO: 17 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a ORF2 a ORF5 del aislado de virus del PRRS designado ISU-55.
 SEQ ID NO: 18 es una realización de una secuencia de nucleótidos correspondiente a ORF6 y ORF7 del aislado de virus del PRRS designado ISU-55.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina. En una realización, la composición induce una respuesta inmunitaria protectora en un cerdo tanto contra PCV2 como contra M.hyo.

Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la fracción insoluble de la preparación de células completas de M.hyo no es inmunogénica. Por el contrario, la preparación soluble de M.hyo sin IgG es inmunogénica y puede combinarse eficazmente con antígenos de otros patógenos, tales como PCV2, sin interferencia analítica o inmunológica entre los antígenos. Esto hace a la preparación soluble de M.hyo una plataforma eficaz para las vacunas multivalentes de la presente invención, incluyendo formulaciones de un frasco, listas para usar. Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la eliminación de la inmunoglobulina y el residuo celular insoluble de la preparación de M.hyo potencia la seguridad de la composición inmunogénica.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un antígeno proteico" incluye una pluralidad de antígenos proteicos, incluyendo mezclas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "que comprende" signifique que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros elementos.

Como se define en el presente documento, una parte soluble de una preparación de células completas de M.hyo se refiere al sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina. La fracción de sobrenadante incluye proteínas solubles expresadas por M.hyo (antígenos proteicos de M.hyo) que se han separado o aislado de proteínas insolubles, bacterias completas y otro material celular de M.hyo insoluble por los medios

convencionales de centrifugación, filtración o precipitación. Además de incluir proteínas solubles específicas de M.hyo, la parte soluble de la preparación de células completas de M.hyo también incluye proteínas heterólogas, tales como las contenidas en el medio de cultivo usado para fermentación de M.hyo.

5 El término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T, o ambas, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria se puede generar para la molécula completa o para una parte de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno).

10 Como se define en el presente documento, una "composición inmunogénica o inmunológica", se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno que induce una respuesta inmunológica en el hospedador de una respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos a la composición o vacuna de interés.

15 La expresión "respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta inducida en un animal. Una respuesta inmunitaria puede referirse a inmunidad celular (IC); inmunidad humoral o puede implicar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmunitario. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T yd, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el hospedador presentará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de modo que se potencie la resistencia a nueva infección y/o se reduzca la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará por una reducción o falta de síntomas presentados normalmente por un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título vírico reducido en el hospedador infectado.

20 Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" significa capacidad de producir una respuesta inmunitaria en un animal hospedador contra un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmunitaria forma la base de la inmunidad protectora inducida por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

25 Un "adyuvante" como se usa en el presente documento significa una composición comprendida por una o más sustancias que potencian la respuesta inmunitaria a un antígeno(s). El mecanismo de funcionamiento de un adyuvante no se conoce completamente. Se cree que algunos adyuvantes potencian la respuesta inmunitaria liberando lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente inmunogénicos por sí mismos y se cree que actúan de forma sinérgica.

30 Como se usa en el presente documento, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene más de un antígeno sea de la misma especie (es decir, diferentes aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae*), de una especie diferente (es decir, aislados tanto de *Pasteurella hemolytica* como de *Pasteurella multocida*), o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

35 El término "cerdo" o "lechón" como se usa en el presente documento significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a una hembra en edad y con capacidad reproductivas. Una "cerda joven" es una cerda que nunca ha estado preñada.

Como se usa en el presente documento, el término "virulento" significa un aislado que conserva su capacidad para ser infeccioso en un hospedador animal.

40 "Vacuna inactivada" significa una composición de vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que ya no tiene capacidad de replicación o crecimiento. El patógeno puede ser de origen bacteriano, vírico, protozooario o fúngico. Puede conseguirse inactivación por una diversidad de procedimientos incluyendo congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con timerosal o formalina), sonicación, radiación, calor o cualquier otro medio convencional suficiente para prevenir la replicación o el crecimiento del organismo manteniendo al mismo tiempo su inmunogenicidad.

45 El término "variante" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones de aminoácidos conservativas u otras modificaciones menores de modo que el polipéptido correspondiente tenga función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo silvestre.

50 La "variación conservativa" indica el reemplazo de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar, o el reemplazo de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de modo que el resto de aminoácido codificado no cambie o sea otro resto biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro resto hidrófobo, o la sustitución de un resto polar, tal como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico o asparagina por glutamina, y similares. La expresión "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental sin sustituir siempre que los anticuerpos inducidos para el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "transportador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo líquido para contener antígenos de vacuna que pueden inyectarse en un hospedador sin efectos adversos. Los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Los transportadores pueden incluir agentes adyuvantes incluyendo, pero sin limitación, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colores y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inducir una respuesta inmunitaria en un hospedador.

Pueden administrarse composiciones de vacuna en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica médica o veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y la condición del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, mediante administración mucosa (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o mediante una vía parenteral (intradérmica, transdérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna pueden administrarse solas o pueden coadministrarse o administrarse secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tal como suspensiones o emulsiones. Las composiciones de vacuna pueden administrarse como una pulverización o mezcladas en alimento y/o agua o suministrarse en mezcla con un transportador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, adyuvantes, gelificantes o aditivos potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos farmacéuticos convencionales, tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida.

"Virus del PRRS norteamericano" significa cualquier virus del PRRS que tenga características genéticas asociadas con un aislado del virus del PRRS norteamericano, tal como, pero sin limitación, el virus del PRRS que se aisló por primera vez en los Estados Unidos a principios de los años 90 (véase, por ejemplo, Collins, J. E., y col., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); el aislado del virus del PRRS norteamericano MN-1b (Kwang, J. y col., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); la cepa de Quebec LAF-exp91 del virus del PRRS (Mardassi, H. y col., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); y aislado del virus del PRRS norteamericano VR 2385 (Meng, X.-J y col., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Se describen ejemplos adicionales de cepas del virus del PRRS norteamericano en el presente documento. Las características genéticas se refieren a similitud de secuencia de nucleótidos genómica y similitud de secuencia de aminoácidos compartidas por cepas del virus del PRRS norteamericano. Las cepas del virus del PRRS chinas generalmente demuestran aproximadamente 80-93 % de similitud de secuencia de nucleótidos con las cepas norteamericanas.

"Virus del PRRS europeo" se refiere a cualquier cepa del virus del PRRS que tenga características genéticas asociadas con el virus del PRRS que se aisló por primera vez en Europa en torno a 1991 (véase, por ejemplo, Wensvoort, G., y col., 1991, Vet. Q. 13:121-130). "Virus del PRRS europeo" se denomina también en ocasiones en la técnica "virus de Lelystad". Se describen ejemplos adicionales de cepas del virus del PRRS europeo en el presente documento.

Un virus modificado genéticamente está "atenuado" si es menos virulento que su cepa parental sin modificar. Una cepa es "menos virulenta" si muestra una reducción estadísticamente significativa en uno o más parámetros que determinan la gravedad de la enfermedad. Dichos parámetros pueden incluir el nivel de viremia, fiebre, gravedad de la dificultad respiratoria, gravedad de los síntomas reproductivos o el número o gravedad de las lesiones pulmonares, etc.

Un "clon infeccioso" es un genoma aislado o clonado del agente de enfermedad (por ejemplo virus) que puede modificarse de forma específica y deliberada en el laboratorio y después usarse para recrear el organismo modificado genéticamente vivo. Un virus modificado genéticamente vivo producido a partir del clon infeccioso puede emplearse en una vacuna vírica viva. Como alternativa, pueden prepararse vacunas de virus inactivados tratando el virus vivo procedente del clon infeccioso con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., por irradiación con luz ultravioleta o rayos X, por calor, etc.

Todas las vacunas de M.hyo y combinación de M.hyo disponibles en la actualidad se realizan a partir de preparaciones de micoplasma de células completas (bacterinas). Por el contrario, la presente invención emplea el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina.

M.hyo tiene requisitos absolutos de esteroides exógenos y ácidos grasos. Estos requisitos necesitan en general crecimiento de M.hyo en medio que contiene suero, tal como suero porcino. La separación del material insoluble de

la parte soluble de la preparación de células completas de M.hyo (por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o precipitación) no elimina los complejos inmunitarios o IgG porcinos. En una realización de la presente invención, la parte soluble de M.hyo se trata con proteína A o proteína G para eliminar sustancialmente los complejos inmunes e IgG contenidos en el sobrenadante de cultivo. En esta realización, se entiende que el tratamiento con proteína A se realiza después de la fermentación de M.hyo. Este se denomina como alternativa en el presente documento tratamiento de proteína A corriente abajo. En otra realización, puede emplearse tratamiento de proteína A corriente arriba del medio de cultivo (es decir, antes de la fermentación de M.hyo). La proteína A se une con la parte Fc de IgG. La proteína G se une preferentemente con la parte Fc de IgG, pero también se puede unir con la región Fab. Se conocen en la técnica procedimientos para purificar/eliminar IgG total de mezclas de proteínas en bruto, tales como sobrenadante de cultivo tisular, suero y líquido ascítico.

La parte soluble de la preparación de M.hyo incluye antígenos proteicos de M.hyo.

La fracción de sobrenadante de M.hyo incluye al menos antígenos proteicos de M.hyo de aproximadamente 46 kD (p46), 64 kD (p64) y 97 kD (p97) de peso molecular. La proteína de M.hyo de aproximadamente 64 kD (p64) puede denominarse como alternativa en el presente documento antígeno de superficie p65 de M.hyo descrito por Kim y col. [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], así como en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.788.962.

Futo y col. describieron la clonación y caracterización de una proteína de superficie de 46 kD de M.hyo, que puede emplearse en las composiciones de la presente invención [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. En una realización, el sobrenadante de cultivo de M.hyo incluye el p46 cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes de la cepa P-5722 se exponen en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se contempla además que pueden emplearse variantes de dichas secuencias de p46 en las composiciones de la presente invención, como se describe posteriormente.

Zhang y col. describieron y caracterizaron una proteína adhesina p97 de M.hyo [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Adicionalmente, King y col. describieron una proteína de 124 kD denominada Mhp1 de la cepa P-5722 de M.hyo y presentaron datos que sugieren que Mhp1 y p97 son la misma proteína [Vaccine 15:25-35 (1997)]. Dichas proteínas p97 pueden emplearse en las composiciones de la presente invención. En una realización, el sobrenadante de cultivo de M.hyo incluye el p97 cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes de la cepa P-5722 se exponen en las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente. Se contempla además que pueden emplearse variantes de dichas secuencias de p97 en las composiciones de la presente invención, como se describe posteriormente.

El sobrenadante de cultivo de M.hyo puede incluir antígenos proteicos específicos de M.hyo adicionales tales como, pero sin limitación, proteínas de aproximadamente 41 kD (p41), 42 kD (p42), 89 kD (p89) y 65 kD (p65). Véase, Okada y col., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 y Kim y col., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Además, el sobrenadante de cultivo de M.hyo puede incluir antígenos proteicos específicos de M.hyo de aproximadamente 102 kD (p102) y 216 kD (p216). Véase, patentes de los Estados Unidos N.º 6.162.435 y 7.419.806 de Minnion y col.

Puede usarse cualquier cepa de M.hyo como un material de partida para producir la parte soluble de la preparación de M.hyo de las composiciones de la presente invención. Pueden obtenerse cepas adecuadas de M.hyo de fuentes comerciales o académicas, incluyendo depositarios tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, Va.) y la Colección de Cultivos NRRL (Servicio de Investigación Agrícola, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Ill.). Solo la ATCC enumera las siguientes seis cepas de M.hyo a la venta: M.hyo ATCC 25095, M.hyo ATCC 25617, M.hyo ATCC 25934, M.hyo ATCC 27714, M.hyo ATCC 27715 y M.hyo ATCC 25934D. Una cepa preferida de M.hyo para su uso en las realizaciones de la presente invención se identifica como cepa P-5722-3, ATCC n.º 55052, depositada el 30 de mayo de 1990, conforme a las normas de accesibilidad requeridas por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos. A la vista de la diseminación extendida de la enfermedad, también pueden obtenerse cepas recuperando M.hyo de secreciones pulmonares o tejido de cerdos infectados con cepas conocidas que provocan neumonía micoplásmica en cerdos.

Los expertos en la materia entienden que pueden emplearse variantes de las secuencias de M.hyo en las composiciones de la presente invención. Dichas variantes podrían variar hasta 10-20 % en su identidad de secuencia y aún conservar las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes de M.hyo tienen al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia genómica de longitud completa de la cepa de M.hyo de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden estimarse, por ejemplo, mediante el experimento de exposición proporcionado en los Ejemplos. Por otra parte, la característica antigénica de un antígeno de M.hyo modificado aún se conserva cuando el antígeno modificado confiere al menos 70 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 % de la inmunidad protectora en comparación con la proteína de M.hyo de tipo silvestre.

En una realización, se incluye antígeno p46 soluble de M.hyo en las composiciones de la invención a una concentración final de aproximadamente 1,5 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 6 µg/ml. Se observa que p46 es la proteína usada para el ensayo de potencia de M.hyo (véase sección de ejemplos posterior). En otra realización, el antígeno de M.hyo puede incluirse

en las composiciones en una cantidad final de aproximadamente 5,5 % a aproximadamente 35 % del sobrenadante tratado con proteína A de cultivo completo de M.hyo.

La preparación soluble de M.hyo de la presente invención es tanto segura como eficaz contra M.hyo y es adecuada para administración en una única dosis. Además, Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la preparación soluble de M.hyo puede combinarse eficazmente con antígenos de otros patógenos, incluyendo PCV2, sin interferencia inmunológica entre los antígenos. Esto hace a la preparación soluble de M.hyo una plataforma eficaz para vacunas multivalentes, incluyendo la vacuna de combinación de PCV2/M.hyo de la presente invención. El antígeno de PCV2 puede proporcionarse simultáneamente con la composición de M.hyo (es decir, como vacunas individuales separadas), pero se combina preferentemente en una vacuna de un frasco, lista para usar.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de PCV2/M.hyo de la presente invención incluyen al menos un antígeno adicional. En una realización, el al menos un antígeno adicional es protector contra un microorganismo que puede provocar enfermedad en cerdos.

En algunas realizaciones, el al menos un componente antigénico adicional es protector contra bacterias, virus o protozoos que se sabe que infectan cerdos. Los ejemplos de dichos microorganismos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, bacterias leptospiros, *Lawsonia intracellularis*, virus de la gripe porcina (SIV), antígeno de *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus respiratorio porcino, virus de diarrea epidémica porcina (PED), rotavirus, virus torque teno (TTV), citomegalovirus porcino, enterovirus porcinos, virus de la encefalomiocarditis, un patógeno causante de enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica (CSF) y un patógeno causante de gastroenteritis transmisible porcina, o combinaciones de los mismos.

En una realización, una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo según la presente invención se proporciona como una vacuna de una única dosis, lista para usar en un frasco. Dicha vacuna de combinación lista para usar no requiere ninguna mezcla de vacunas separadas, de modo que no hay riesgo de contaminación o trabajo adicional asociado con el mezclado y no hay necesidad de usar la mezcla en un periodo de pocas horas. Además, una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en un frasco reduce los residuos y el espacio de almacenamiento en la nevera a la mitad. Asimismo, la administración en una dosis elimina el trabajo asociado con la administración de una segunda dosis al animal. Se observa que aunque existen en la actualidad vacunas de combinación de PCV2/M.hyo, estas se proporcionan como una vacuna lista para usar, de dos dosis (Circumvent®PCVM), o como una vacuna en 2 frascos, de dosis individual, que requiere la administración simultánea de vacunas separadas (por ejemplo, Ingelvac CircoFLEX® e Ingelvac MycoFLEX®). Preferentemente, la combinación de PCV2/M.hyo según la presente invención sería compatible con otros antígenos, tales como antígeno del virus del PRRS, de modo que todos los antígenos pueden administrarse en una única dosis.

En algunas realizaciones, el componente de antígeno de PCV2 de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo está en forma de un circovirus quimérico de tipo 1-tipo 2. El virus quimérico incluye un circovirus porcino recombinante inactivado de tipo 1 que expresa la proteína ORF2 de circovirus porcino de tipo 2. Se describen circovirus porcinos quiméricos y procedimientos para su preparación en el documento WO 03/049703 A2 y también en las patentes de los Estados Unidos N.º 7.279.166 y 7.575.752, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización, la secuencia de ADN de longitud completa del genoma del virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 5 o variantes de la misma, como se describe posteriormente. En otra realización, el gen inmunogénico de la cápside ORF2 del virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 6. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos de la proteína inmunogénica ORF2 expresada por el virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 7.

En otra realización más, la secuencia de ADN de longitud completa del genoma del virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 8. En una realización, el gen inmunogénico de la cápside ORF2 del virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 9. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos de la proteína inmunogénica ORF2 expresada por el virus PCV1-2 quimérico corresponde a la SEQ ID NO: 10.

Sin embargo, el ADN y proteína ORF2 de PCV2 del virus PCV1-2 quimérico no están limitados a las secuencias descritas anteriormente ya que el ADN y proteína ORF2 de PCV2 es un dominio altamente conservado en aislados de PCV2.

En algunas realizaciones, el componente de antígeno de PCV2 de una vacuna de combinación de M.hyo/PCV2 está en forma de una proteína ORF2 recombinante. En una realización, la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus. Como alternativa, pueden usarse otros vectores de expresión conocidos, tales como incluyendo, pero sin limitación, vectores de parapox.

En una realización, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante es la de la SEQ ID NO: 11, que está codificada por la SEQ ID NO: 12 (N.º de referencia de GenBank AF086834). En otra realización, la proteína ORF2 recombinante es la

de la SEQ ID NO: 13, que está codificada por la SEQ ID NO: 14. En otra realización más, la proteína ORF2 recombinante corresponde a la SEQ ID NO: 15. En otra realización más, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante corresponde a la SEQ ID NO: 7. En una realización adicional más, la proteína ORF2 de PCV2 recombinante corresponde a la SEQ ID NO: 10.

- 5 Sin embargo, la presente invención no está limitada a las secuencias de ADN y proteína ORF2 particulares descritas anteriormente. Ya que el ADN y proteína ORF2 de PCV2 es un dominio altamente conservado en aislados de PCV2, es muy probable que cualquier ORF2 de PCV2 sea eficaz como la fuente del ADN y/o polipéptido de ORF2 de PCV2 como se usa en el virus PCV1-2 quimérico o en la proteína de PCV2 recombinante.

- 10 Un ejemplo de un aislado de PCV2 adecuado del que puede obtenerse el ADN y proteína ORF2 de PCV2 es el número de aislado de PCV2 40895 (depositado en la ATCC el 7 de diciembre de 2001 y al que se asignó la Designación de Depósito de Patentes de ATCC PTA-3914). La secuencia (de nucleótidos) genómica del número de aislado de PCV2 40895 está disponible con el número de referencia de GenBank AF264042. Otros ejemplos de aislados de PCV2 adecuados de los que pueden obtenerse las secuencias de ADN y proteína ORF2 de PCV2 incluyen, pero sin limitación, los siguientes: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp.1011-48121 e Imp.1011-48285. Los
15 números de referencia de GenBank de las secuencias genómicas correspondientes a estos aislados de PCV2 son AF055391, AF055392, AF055393 y AF055394, respectivamente.

En algunas formas, se usan partes inmunogénicas de proteína ORF2 de PCV2 como el componente antigénico en la composición. Por ejemplo, pueden emplearse formas truncadas y/o sustituidas o fragmentos de proteína ORF2 de PCV2 en las composiciones de la presente invención.

- 20 Los expertos en la materia entienden que pueden emplearse variantes de las secuencias de PCV2 en las composiciones de la presente invención. Dichas variantes podrían variar hasta 10-20 % en su identidad de secuencia y aún conservar las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes de PCV2 tienen al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la
25 secuencia genómica de longitud completa del aislado de PCV2 de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden estimarse, por ejemplo, mediante el experimento de exposición proporcionado en los Ejemplos. Por otra parte, la característica antigénica de un antígeno de PCV2 modificado aún se conserva cuando el antígeno modificado confiere al menos 70 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 % de la inmunidad protectora en comparación con la proteína ORF2 de PCV2 de tipo silvestre.

- 30 El componente de antígeno de PCV2 se proporciona en la composición inmunogénica a un nivel de inclusión de antígeno eficaz para inducir la respuesta inmunitaria deseada, concretamente reducir la incidencia o disminuir la gravedad de señales clínicas resultantes de la infección por PCV2.

- En una realización, se incluye un virus PCV1-2 quimérico en las composiciones de la invención a un nivel de al menos $1,0 \leq PR \leq 5,0$, en el que PR es la unidad de Potencia Relativa determinada mediante cuantificación de
35 antígeno por ELISA (ensayo de potencia *in vitro*) en comparación con una vacuna de referencia. En otra realización, se incluye un virus PCV1-2 quimérico en la composición de la invención a una concentración final de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % de antígeno de PCV1-2 a granel concentrado 20 veces (20X).

- En otra realización, la proteína recombinante de ORF2 de PCV2 se incluye en las composiciones de la invención a un nivel de al menos 0,2 µg de antígeno/ml de la composición inmunogénica final (µg/ml). En una realización
40 adicional, el nivel de inclusión de la proteína recombinante de ORF2 de PCV2 es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 400 µg/ml. En otra realización más, el nivel de inclusión de la proteína recombinante de ORF2 de PCV2 es de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 200 µg/ml. En una realización adicional más, el nivel de inclusión de la proteína recombinante de ORF2 de PCV2 es de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 100 µg/ml. En otra realización más, el nivel de inclusión de la proteína recombinante de ORF2 de PCV2 es de
45 aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 µg/ml.

En una realización, una composición inmunogénica de la presente invención incluye la combinación de la invención de antígenos solubles de M.hyo y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), así como un antígeno del virus del PRRS. En otra realización, la composición induce una respuesta inmunitaria protectora en un cerdo contra M.hyo, PCV2 y virus del PRRS.

- 50 En una realización, se proporciona una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo/PRRS como una vacuna de en 2 frascos, de una única dosis. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona una combinación de PCV2/M.hyo como una composición líquida estable en un primer frasco y se proporciona un virus del PRRS en un estado liofilizado en un segundo frasco. En algunas realizaciones, pueden añadirse antígenos porcinos adicionales al primer o segundo frasco.

- 55 En una realización, el componente de virus del PRRS se proporciona como un virus vivo modificado genéticamente, liofilizado. Antes de la administración, el líquido de PCV2/M.hyo de un primer frasco puede usarse para rehidratar el virus del PRRS en un segundo frasco de modo que los tres antígenos puedan administrarse al animal en una única dosis. Se observa que aunque existen en la actualidad vacunas de combinación de PCV2/M.hyo/PRRS, se

proporcionan como una vacuna en 3 frascos, de una única dosis, que requiere la administración simultánea de tres vacunas separadas (por ejemplo, Ingelvac CircoFLEX®, Ingelvac MycoFLEX® e Ingelvac®PRRS MLV).

El agente etiológico de PRRS se aisló por primera vez en los Países Bajos y se denominó virus de Lelystad. Este virus se describió en el documento WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut). Se depositó un aislado del virus del PRRS europeo en el Institut Pasteur de París, número I-1102. El tipo norteamericano se aisló casi simultáneamente con el aislamiento del virus de tipo europeo, y se describe en el documento WO-93/03760 (Collins y col.). Se depositó un aislado del virus de tipo norteamericano en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), número VR-2332.

Se han aislado diferentes cepas de los tipos de virus tanto europeo como norteamericano. El documento WO 93/07898 (Akzo) describe una cepa europea, y vacunas obtenidas de ella, depositada en la CNCM (Institut Pasteur), número 1-1140. Además, el documento WO 93/14196 (Rhone-Merieux) describe una nueva cepa aislada en Francia, depositada en la CNCM (Institut Pasteur), número 1-1153. Asimismo, el documento EP0595436 B1 (Solvay) describe una nueva cepa de tipo norteamericano, más virulenta que la inicialmente descrita, y vacunas de la misma. Esta cepa se ha depositado en la ATCC, pero el número de depósito no está detallado en la solicitud de patente. Además, el documento ES2074950 BA (Cyanamid Iberica) y su homólogo GB2282811 B2 describen una denominada "cepa española", que es diferente de otras cepas europeas y norteamericanas. Esta "cepa española" se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (EACCC), número V93070108.

Los antígenos del virus del PRRS para su uso en las composiciones de PCV2/M.hyo/PRRS de la presente invención incluyen aislados de virus del PRRS norteamericanos, cepas de virus del PRRS chinas y cepas de virus del PRRS europeos, así como versiones modificadas genéticamente de dichos aislados/cepas. En una realización, el componente de antígeno de virus del PRRS empleado en las composiciones según la presente invención es un virus del PRRS norteamericano.

En algunas realizaciones, el componente de antígeno del virus del PRRS empleado en las composiciones de la presente invención es el aislado de virus del PRRS norteamericano designado P129 o una versión modificada genéticamente, viva, del mismo. Preferentemente, el virus del PRRS modificado genéticamente es incapaz de producir una infección patógena pero es capaz de inducir una respuesta inmunoprotectora eficaz contra infección por el virus del PRRS de tipo silvestre.

Un virus del PRRS modificado genéticamente para su uso en las composiciones de la invención puede producirse a partir de un clon infeccioso. La preparación de un clon de ADNc infeccioso del aislado de virus del PRRS norteamericano designado P129 se describe en la patente de los Estados Unidos N.º 6.500.662 que se incorpora completamente por referencia. La secuencia de ADNc de P129 se desvela en el número de referencia de GenBank AF494042 y en la patente de los Estados Unidos N.º 6.500.662.

En una realización, La secuencia de nucleótidos de una forma no virulenta de P129 para su uso en las composiciones de la presente invención está representada por la SEQ ID NO: 16. Sin embargo, la presente invención no está limitada a esta secuencia. Esta secuencia y las secuencias de otras formas no virulentas de P129 se describen en la Solicitud Internacional N.º PCT/IB2011/055003, presentada el 9 de noviembre de 2011, cuyos contenidos (incluyendo cualquier presentación de fase nacional de los Estados Unidos basada en esta Solicitud Internacional) se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Preferentemente, el virus del PRRS se modifica para prevenir la regulación negativa de la función mediada por interferón.

En otras realizaciones, el componente de antígeno del virus del PRRS empleado en las composiciones de la invención es el aislado de virus del PRRS designado ISU-55. El aislado ISU-55 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), con el número de referencia VR2430. La secuencia de nucleótidos de los genes de ORF2 a ORF5 del aislado de ISU-55 se representa mediante la SEQ ID NO: 17. La secuencia de nucleótidos de los genes de ORF6 y ORF7 del aislado de ISU-55 se representa mediante la SEQ ID NO: 18.

Otro aislado de virus del PRRS norteamericano que puede usarse en las composiciones es ISU-12, que se depositó en la ATCC con los números de referencia VR2385 [purificado en placa 3 x] y VR2386 [sin purificar en placa]. Otros aislados de virus del PRRS norteamericano adecuados adicionales que pueden emplearse en las composiciones de la presente invención son los siguientes: ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 e ISU-79, que se depositaron en la ATCC con los números de referencia VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 y VR2474, respectivamente. Pueden emplearse versiones modificadas genéticamente de cualquiera de estos aislados de ISU en las composiciones de la presente invención. Estos aislados de ISU y el aislado de ISU-55 se describen en detalle en las siguientes patentes de los Estados Unidos de Paul, y col: US 5.695.766, 6.110.467, 6.251.397, 6.251.404, 6.380.376, 6.592.873, 6.773.908, 6.977.078, 7.223.854, 7.264.802, 7.264.957 y 7.517.976, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otras realizaciones más, el componente de antígeno de virus del PRRS empleado en las composiciones según la presente invención es el tipo norteamericano depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), número VR-2332 o una versión modificada genéticamente del mismo. Por ejemplo, el virus del PRRS puede ser un virus vivo modificado basado en el aislado identificado como ATCC VR2332, que se emplea en INGELVAC® PRRS

ATP e INGELVAC® PRRS MLV, de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

En otras realizaciones más, el componente de antígeno del virus del PRRS empleado en las composiciones de la presente invención es un aislado de virus del PRRS europeo o virus de Lelystad o una versión modificada genéticamente del mismo. Un ejemplo de una cepa de virus del PRRS se identifica como el depósito N.º 1-1102, descrito anteriormente. Se describen secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al depósito 1-1102 en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.620.691 de Wensvoort y col., que se incorpora completamente por la presente en el presente documento por referencia. La preparación de un clon infeccioso de un aislado de virus del PRRS europeo o virus de Lelystad se describe en la patente de los Estados Unidos N.º 6.268.199 que se incorpora completamente por la presente en el presente documento por referencia.

Otros ejemplos de aislados de virus del PRRS adecuados incluyen, pero sin limitación, los descritos anteriormente. Además, pueden emplearse versiones modificadas genéticamente, vivas, de los aislados de virus del PRRS en las composiciones de la presente invención. Puede usarse un clon infeccioso para recrear dichos organismos modificados genéticamente vivos.

Los expertos en la materia entienden que pueden emplearse variantes de las secuencias de virus del PRRS en las composiciones de la presente invención. Dichas variantes podrían variar hasta 10-20 % en su identidad de secuencia y aún conservar las características antigénicas que las hacen útiles en composiciones inmunogénicas. Preferentemente, las variantes de virus del PRRS tienen al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, aún más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia genómica de longitud completa del aislado de virus del PRRS de tipo silvestre. Las características antigénicas de una composición inmunológica pueden ser, por ejemplo, estimadas por experimentos de exposición. Por otra parte, la característica antigénica de un antígeno de virus del PRRS modificado aún se conserva cuando el antígeno modificado confiere al menos 70 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 % de la inmunidad protectora en comparación con el antígeno de virus del PRRS de tipo silvestre.

En una realización, el componente de antígeno de virus del PRRS es un virus vivo, modificado genéticamente, que se incluye en las composiciones de la invención a un nivel de al menos $2,1 \leq \text{DICT}_{50} \leq 5,2$, en el que DICT_{50} es la dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % determinada por cuantificación de antígeno (ensayo de potencia *in vitro*).

El componente de antígeno de PCV2 de las composiciones de PCV2/M.hyo/PRRS de la invención puede estar en forma de un circovirus quimérico de tipo 1-tipo 2, incluyendo el virus quimérico un circovirus porcino recombinante inactivado de tipo 1 que expresa la proteína ORF2 de circovirus porcino de tipo 2. En otra realización, el componente de antígeno de PCV2 de las composiciones de PCV2/M.hyo/PRRS de la invención está en forma de una proteína ORF2 recombinante.

Los antígenos de PCV2 adecuados para su uso en las composiciones de PCV2/M.hyo/PRRS pueden obtenerse de cualquiera de los aislados de PCV2 descritos anteriormente, así como otros aislados de PCV2. Los antígenos de PCV2 adecuados para emplear en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, las secuencias de PCV2 descritas anteriormente y variantes de las mismas.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse siguiendo la convención aceptada de incluir transportadores aceptables para animales, incluyendo seres humanos (si es aplicable), tales como tampones convencionales, estabilizadores, diluyentes, conservantes y/o solubilizantes, y también pueden formularse para facilitar la liberación sostenida. Los diluyentes incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares.

Los aditivos para isotonicidad incluyen cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros. Otros vehículos y aditivos de vacuna adecuados, incluyendo los que son particularmente útiles en la formulación de vacunas vivas modificadas, se conocen o resultarán evidentes para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 18ª ed., 1990, Mack Publishing, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las vacunas de la presente invención pueden comprender además uno o más componentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, un adyuvante o citocina, entre otros. Los tipos de adyuvantes adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen los siguientes: un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos. Algunos ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, *Corynebacterium parvum*, bacilo de Calmette Guérin, gel de hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, bacto-adyuvante, determinados polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, copolímero en bloque (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante de amina lipídica Avridina (N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), aceite de parafina, sistema de adyuvante de RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), dipéptido de muramilo y similares.

Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen

formulaciones de SEAM62 y SEAM 1/2 modificados. SEAM62 modificado es una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno 5 % (v/v) (Sigma), detergente SPAN® 85 1 % (v/v) (ICI Surfactants), detergente TWEEN® 80 0,7 % (v/v) (ICI Surfactants), etanol al 2,5 % (v/v), Quil A 200 µg/ml, colesterol 100 µg/ml y lecitina 0,5 % (v/v). SEAM 1/2 modificado es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno 5 % (v/v), detergente SPAN® 85 1 % (v/v), detergente Tween 80 al 0,7 % (v/v), etanol al 2,5 % (v/v), Quil A 100 µg/ml y colesterol 50 µg/ml.

Otro ejemplo de un adyuvante útil en las composiciones de la invención es aceite SP. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "aceite SP" designa una emulsión de aceite que comprende un copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, escualano, monooleato de sorbitano polioxietileno y una solución salina tamponada. Los copolímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno son tensioactivos que ayudan en la suspensión de componentes sólidos y líquidos. Estos tensioactivos están disponibles en el mercado como polímeros con el nombre comercial Pluronic®. El tensioactivo preferido es poloxámero 401 que está disponible en el mercado con el nombre comercial Pluronic® L-121. En general, la emulsión de aceite SP es una mezcla de adyuvantes inmunoestimulantes que comprenderá de aproximadamente 1 a 3 % vol/vol de copolímero en bloque, de aproximadamente 2 a 6 % vol/vol de escualano, más particularmente de aproximadamente 3 a 6 % de escualano, y de aproximadamente 0,1 a 0,5 % vol/vol de monooleato de sorbitano polioxietileno, siendo el resto una solución salina tamponada. En una realización, la emulsión de aceite SP está presente en la composición final en cantidades v/v de aproximadamente 1 % a 25 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a 15 %, más preferentemente de aproximadamente 5 % a 12 % v/v.

Otro ejemplo más de un adyuvante adecuado para su uso en las composiciones de la invención es adyuvante AMPHIGEN™ que consiste en lecitina desaceitada disuelta en un aceite, habitualmente parafina líquida ligera.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles en las composiciones de la invención son los siguientes adyuvantes patentados: sistema de adyuvante de emulsión doble Microsol Diluvac Forte®, adyuvante Emunade y adyuvante Xsolve. Los adyuvantes tanto Emunade como Xsolve son emulsiones de aceite mineral ligero en agua, pero Emunade también contiene alhidrogel y acetato de d,l- α -tocoferilo es parte del adyuvante XSolve. Un ejemplo adicional más de un adyuvante adecuado para su uso en las composiciones de la invención es adyuvante ImpranFLEX™ (un adyuvante de agua en aceite). Un ejemplo adicional más de un adyuvante adecuado es un adyuvante basado en carbómero (Carbopol®). Los adyuvantes Carbopol® preferidos incluyen polímero Carbopol® 934 y polímero Carbopol® 941.

En una realización, el adyuvante o mezcla de adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. En otra realización, el adyuvante/mezcla de adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. En otra realización más, el adyuvante/mezcla de adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 1 mg/dosis.

El adyuvante o mezcla de adyuvante está normalmente presente en la composición de vacuna de la invención en cantidades v/v de aproximadamente 1 % a 25 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a 15 %, más preferentemente de aproximadamente 5 % a 12 % v/v.

Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones u otras citocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente.

Un aspecto adicional se refiere a un procedimiento para preparar una composición inmunogénica según la presente invención. Este procedimiento comprende i) cultivar M.hyo en un medio adecuado durante periodos que varían de 18 a 144 horas; ii) inactivar posteriormente el cultivo de M. hyo; iii) recoger el líquido de cultivo inactivado, en el que el líquido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como material celular insoluble; iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble mediante centrifugación, filtración o precipitación; v) eliminar sustancialmente tanto IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina; y vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de PCV2.

Un ejemplo de un medio adecuado para cultivar M.hyo es caldo de cultivo PPLO (base de caldo de cultivo *Mycoplasma*), que cuando se complementa con enriquecimientos nutritivos, se usa para aislar y cultivar *Mycoplasma*.

En algunas realizaciones, el cultivo de M.hyo se cultiva hasta el crecimiento de fase logarítmica tardío, después de lo cual se inactiva el cultivo. En algunas otras realizaciones, el cultivo se inactiva elevando el pH (por ejemplo, hasta aproximadamente 7,8). Esto sucede exponiendo el cultivo de producción a un agente de inactivación, tal como etilenimina binaria (BEI). La BEI se genera in situ durante la incubación de bromhidrato de L-bromoetilamina (BEA) en el cultivo de producción. Posteriormente, el pH del cultivo inactivado se neutraliza, tal como añadiendo una cantidad equivalente de un agente que neutraliza el agente de inactivación en la solución. En algunas realizaciones, el agente de inactivación es BEI y el agente de neutralización es tiosulfato sódico. En una realización, el pH del

cultivo inactivado se ajusta a aproximadamente 7,4 añadiendo tiosulfato de sodio.

La fracción líquida soluble de la preparación de células completas de M.hyo se separa del material celular insoluble usando procedimientos convencionales. En una realización, esta separación es por una etapa de filtración. En otra realización, esta separación es por una etapa de centrifugación. En otra realización más, la separación es por una etapa de precipitación.

En una realización, la fracción líquida soluble de una preparación de células completas de M.hyo neutralizadas, inactivadas, se trata con resina de proteína A para eliminar sustancialmente tanto la IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina en la misma. En otras realizaciones, puede usarse resina de proteína G para eliminar sustancialmente tanto la IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina contenidos en la fracción líquida soluble. Se conocen bien en la técnica procedimientos para eliminar tanto IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina con resinas de Proteína A o Proteína G.

Según un aspecto adicional, el procedimiento para preparar una composición inmunogénica multivalente según la presente invención comprende preparar el antígeno de M.hyo soluble como se ha descrito anteriormente y mezclar este con un antígeno de PCV2, un adyuvante adecuado y uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. Este procedimiento incluye opcionalmente añadir al menos un antígeno porcino adicional, tal como, pero sin limitación, antígeno de virus del PRRS como se ha descrito anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit. Un "kit" se refiere a una pluralidad de componentes que se agrupan entre sí. En una realización, un kit según la presente invención incluye un frasco (u otro receptáculo adecuado) que comprende una composición inmunogénica. Esta composición inmunogénica que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina. Opcionalmente, el kit puede incluir además un manual de instrucciones. El manual de instrucciones incluye la información para administrar la composición inmunogénica.

En algunas realizaciones, la combinación de PCV2/M.hyo en el frasco del kit se proporciona como una composición líquida lista para usar. En otras realizaciones, el kit incluye un segundo frasco que comprende antígeno de virus del PRRS. En algunas realizaciones, el antígeno de virus del PRRS está en forma de un virus vivo, modificado genéticamente, que se proporciona en un estado liofilizado. En tales casos, el manual de instrucciones incluirá las directrices para rehidratar el componente de virus del PRRS con los contenidos líquidos de un frasco que contiene la combinación de PCV2/M.hyo. El manual de instrucciones también incluirá la información para administrar la formulación o las formulaciones trivalentes de PCV2/M.hyo/PRRS resultantes.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica según la presente invención se administra a cerdos que tienen anticuerpos obtenidos por vía materna contra M.hyo. En otras realizaciones, una composición inmunogénica de la presente invención se administra a cerdos que tienen anticuerpos obtenidos por vía materna tanto contra M.hyo como contra PCV2.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica multivalente según la presente invención se administra a un lechón de 3 semanas de edad o mayor. Sin embargo, se contempla que una composición de vacuna multivalente según la invención también puede usarse para volver a vacunar cerdas jóvenes antes de la reproducción. Como se sabe en la técnica, una cerda joven es una cerda hembra que nunca ha estado preñada. Las cerdas jóvenes vacunadas pasarán anticuerpos obtenidos por vía materna a sus neonatos lactantes a través del calostro.

Se contempla además que una vacuna multivalente según la invención puede usarse para volver a vacunar anualmente perras en reproducción. Preferentemente, una vacuna multivalente según la presente invención se administra a cerdos (por ejemplo, lechones o cerdas jóvenes) en una dosis. En una realización, una vacuna multivalente según la presente invención no requiere mezcla de vacunas monovalentes separadas antes de la administración, es decir, se proporciona una formulación de PCV2/M.hyo lista para usar contenida en un frasco. En otra realización, una formulación multivalente requiere mezcla de una vacuna divalente según la presente invención contenida en un primer frasco con una vacuna monovalente contenida en un segundo frasco. En una realización, la vacuna monovalente contenida en el segundo frasco incluye antígeno de virus del PRRS. Opcionalmente, pueden añadirse antígenos adicionales a uno de estos frascos.

En algunas realizaciones, la aparición de inmunidad es de 2-3 semanas después de la vacunación con una composición de vacuna multivalente según la presente invención. En otras realizaciones, la duración de la inmunidad es de aproximadamente 17-23 semanas después de la vacunación con una composición de vacuna multivalente según la presente invención.

Los siguientes ejemplos exponen materiales y procedimientos preferidos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan solamente como ilustración, y nada en los mismos debería considerarse una limitación sobre el ámbito general de la invención.

Ejemplos**Ejemplo 1: Procedimientos de producción de *Mycoplasma hyopneumoniae* para antígeno de M.hyo combinable con PCV2**Fermentación e inactivación de M.hyo

5 Se prepararon medios para escala de inóculo y producción de antígenos de la siguiente manera. Se preparó caldo de cultivo de organismo de tipo pleuroneumonía (PPLO) procedente de corazón porcino (BD Biosciences N.º de catálogo 21498) según las directrices del fabricante (es decir, 21 g/l) y se preparó solución de extracto de levadura a 21 g/l en USP. Después se añadió solución de extracto de levadura al PPLO a 6,25 % y la mezcla se esterilizó por calentamiento hasta 121 °C durante ≥ 30 minutos. Se preparó clorhidrato de cisteína a 90 g/l y se esterilizó por filtrado. Se realizó solución de dextrosa añadiendo 450 g de dextrosa por litro de agua USP seguido de esterilización por calor. Para preparar el medio final, se añadió suero porcino al medio básico a 10 % seguido de cisteína a 0,01 % y dextrosa a 1,0 %. El medio se inoculó con un 10 % v:v de un cultivo de fase logarítmica de *M. hyopneumoniae* (cepa P5722-3). El cultivo se mantuvo a 37 °C y el pH y dO se mantuvieron a 7,0 y 25 %, respectivamente. En el crecimiento de fase logarítmica tardía, el cultivo se inactivó mediante etilenimina binaria (BEI), un compuesto de aziridina, producido a partir de bromhidrato de 2-bromoetilamina. De forma específica, la inactivación se realizó elevando el pH hasta 7,8 añadiendo 2-bromoetilaminobromhidrato (BEA) hasta una concentración final de 4 mM e incubando durante 24 horas. La BEI se neutralizó mediante la adición de tiosulfato sódico a una relación molar 1:1 seguida de incubación de 24 horas adicionales. El líquido de cultivo inactivado se mantuvo a 2-8 °C hasta el procesamiento posterior.

Ejemplo 2: Procedimientos de producción de circovirus porcino quimérico (cPCV)1-2

El cPCV1-2 se construyó por clonación del gen de cápside inmunogénico del circovirus porcino patógeno de tipo 2 (PCV2) en la cadena principal genómica del circovirus porcino no patógeno de tipo 1 (PCV1). El procedimiento para construcción del clon de ADN quimérico se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N.º 7.279.166, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se adquirió una reserva infecciosa del virus quimérico del Dr. X. J. Meng, Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia, Blacksburg, VA, y se usó para infectar células de riñón porcino (PK)-15 cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM) complementado con hidrolizado de lactalbúmina al 0,05 % (LAH), sulfato de gentamicina 30 µg/ml y suero bovino fetal al 5 %. Las células PK-15 infectadas por cPCV1-2 resultantes se expandieron adicionalmente por pases en serie cuatro veces más usando el mismo medio de cultivo excepto con suero bovino fetal 2-3 %. El quinto pase se congeló, se descongeló y se filtró, y los lisados resultantes se usaron para preparar un preinóculo primario y posterior inóculo primario.

El medio que se usó para producir inóculos de virus fue el mismo que se usó en la producción de reserva de virus. Para el medio de cultivo, MEM, OptiMEM, o equivalente es el medio basal que puede usarse para plantar la línea celular PK-15 para crecimiento. El medio de cultivo puede complementarse con hasta 10 % de suero bovino, hasta 0,5 % de hidrolizado de lactalbúmina, hasta 0,5 % de albúmina sérica bovina y hasta 30 µg/ml de gentamicina. Para el medio de propagación de virus, se usa MEM, OptiMEM o equivalente. El medio de propagación de virus puede complementarse con hasta 0,5 % de hidrolizado de lactalbúmina, hasta 2 % de suero bovino, hasta 0,5 % de albúmina sérica bovina y hasta 30 µg/ml de gentamicina. Pueden añadirse hasta 5 g/l de glucosa y hasta 5 mmol/l de L-glutamina al medio de cultivo y/o el medio de propagación de virus según sea necesario para mantener las células.

El virus de inóculo primario de cPCV1-2 se añade a una suspensión celular de células PK-15 y se adsorbe durante hasta 3 horas. El virus de inóculo se diluye en medio basal de cultivo para proporcionar una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 - 0,0001.

Se inoculan inicialmente cultivos de células PK-15 con virus de inóculo de trabajo en el momento de la siembra celular o cuando las células alcanzan aproximadamente 20 % a 50 % de confluencia. Este pase inicial puede denominarse "procedimiento de infección de una etapa" para la producción de reserva de antígeno, o puede usarse para pases en serie. Para pases en serie, las células PK-15 infectadas por cPCV1-2 se expanden adicionalmente hasta el pase 7 por divisiones en serie a la relación de 1:5-20 para propagación de virus. El medio de cultivo que contiene una suspensión de células infectadas del pase previo actúa como material de inóculo para el siguiente pase. Las células infectadas por cPCV1-2 se incuban durante tres (3) a 14 días para cada pase a 36 ± 2 °C cuando las células alcanzan ≥ 90 % de confluencia. El virus cPCV1-2 provoca cambios citopáticos observables durante la replicación vírica. En el momento de recogida, se observa redondeo de células y considerables residuos flotantes. También se observan los cultivos para encontrar pruebas visuales de contaminación bacteriana o fúngica. El tiempo de incubación entre recogidas para el antígeno de cPCV se proporciona en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1 Tiempos mínimos y máximos para recoger antígeno de cPCV

Procedimiento	Tiempo mínimo / máximo	Intervalo de temperatura
Infección de una etapa	de 5 a 16 días	36 ± 2 °C
Pase en serie (de MSV + 3 a MSV + 7)	de 16 a 36 días	36 ± 2 °C

Los líquidos de cultivo de cPCV1-2 se recogen en vasos estériles y se toman muestras de ellos para ensayo de micoplasma usando procedimientos conocidos. Pueden realizarse múltiples recogidas de frascos rotatorios, biorreactores y vasos de perfusión.

- 5 Antes de la inactivación del virus cPCV1-2 recogido, pueden concentrarse uno o más lotes de antígenos (por ejemplo, hasta 60X) por ultrafiltración. Los concentrados pueden lavarse con solución salina equilibrada para reducir las proteínas en suero.

- El procedimiento de inactivación, atenuación o destoxificación del virus cPCV1-2 se describirá a continuación. Después de concentración de antígeno de cPCV, se añade *Beta*-propiolactona (BPL) al material vírico de cPCV1-2 agrupado para obtener una concentración aproximada de 0,2 % v/v. Los líquidos víricos agrupados se agitan después durante un mínimo de 15 minutos y después se transfieren los líquidos de antígeno a granel inactivantes a un segundo vaso estéril. Los líquidos de antígeno transferidos se mantienen a 2 - 7 °C, con agitación constante, durante un mínimo de 24 horas. Después de un mínimo de 24 horas, se realiza una segunda adición de 0,2 % v/v de BPL a la suspensión agrupada. Posteriormente los contenidos se agitan, se transfieren a un tercer vaso y se mantienen a 2 - 7 °C, con agitación constante, durante un tiempo adicional de no menos de 84 horas. En general, el tiempo de inactivación total no es menor de 108 horas y no es mayor de 120 horas. El procedimiento de inactivación se resume en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Procedimiento de inactivación

Inactivante	Concentración final	Temp. Intervalo	Tiempo-horas (mín/máx)
<i>Beta</i> -propiolactona (BPL)	0,4 % v/v (2 adiciones x 0,2 % v/v)	2 - 7 °C (con agitación)	108 - 120

- La inactivación se termina mediante la adición de una concentración de no más de 0,1 M de solución de tiosulfato sódico. El pH de la reserva de antígeno inactivado se ajusta a aproximadamente 6,8 usando NaOH o HCl. Después de la inactivación, se toma una muestra representativa del grupo y se ensaya para determinar la compleción de la inactivación. El producto antigénico de cPCV1-2 inactivado se normaliza para alcanzar una diana de más de 1,0 PR como se mide mediante ELISA de potencia.

25 Ejemplo 3: Procesamiento corriente abajo de antígenos de M.hyo y ensayo analítico de estos antígenos procesados

Procesamiento corriente abajo de antígenos de M.hyo:

Se trató líquido de fermentación inactivado (preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1) para cada grupo indicado de la siguiente manera. Estos antígenos de M.hyo procesados se emplearon en el Ejemplo 4 posterior.

- 30 T02: (Volumen completo) no procesado.
 T03: (10X UF concentrado) Concentrado mediante filtración en flujo tangencial a través de una membrana de punto de corte de 100 KDa de peso molecular (fibra hueca). La reducción de volumen final fue igual a 10X.
 T04 y T05: (10X UF concentrado y centrifugado) Se recogieron células de micoplasma concentradas (de T03) y se lavaron una vez con PBS mediante centrifugación a ~20.000xg (Sorvall modelo RC5B). T06 y T07: (10X centrifugado) El líquido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000xg (Sorvall RC5B) y se lavó una vez resuspendiendo las células en PBS seguido de una centrifugación adicional. La reducción de volumen final fue igual a 10X.
 T08: (10X centrifugado y calentado) Se concentraron células de micoplasma y se lavaron según T06 y se calentaron hasta 65 °C durante 10 minutos.
 T09: (Sobrenadante sin células) El sobrenadante recogido de la primera centrifugación como se ha descrito para T06 se esterilizó por filtrado a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Nalgene).
 T10: (Sobrenadante sin células-tratado con proteína A) Se mezcló sobrenadante estéril (preparado según T09) con resina de proteína A (Proteína A Sepharose, Pharmacia Inc) a una relación de volumen de 10:1 durante 4 horas. La resina se retiró por esterilización por filtrado y el líquido filtrado se almacenó a 2-8 °C. Este procedimiento usa tratamiento de proteína A "corriente abajo" postfermentación para eliminar anticuerpos e inmunocomplejos. Aunque la presente invención no excluye el tratamiento de proteína A corriente arriba, los presentes inventores han descubierto que en el caso de M.hyo, el tratamiento de proteína A corriente arriba del medio de cultivo condujo a

resultados de p46 que eran menores y contradictorios en comparación con el medio sin tratar (datos no mostrados).

Ensayo analítico de antígenos procesados corriente abajo de M.hyo

5 Las preparaciones de antígenos de M.hyo procesados corriente abajo (preparadas como se ha descrito anteriormente) se ensayaron para determinar la recuperación de antígeno p46 específico de M.hyo y la presencia de PCV2. Además, estas preparaciones de antígenos de M.hyo se ensayaron para determinar la presencia de virus torque teno (TTV), incluyendo genotipo 1 (g1TTV) y genotipo 2 (g2TTV). Los resultados se presentan posteriormente en la Tabla 3.

Tabla 3 Caracterización de antígenos procesados corriente abajo de M.hyo

Tratamiento	M.Hyo a granel	ab de PCV2	ADN de qPCR	
	p46 UR/ml	relación M/P	g1TTV	g2TTV
Volumen completo	809	0,248	1,00E+03	1,78E+03
10x UF concentrado	6666	0,819	1,00E+03	9,94E+03
10x UF conc. + centrifugado	614	0,019	0	0
10x centrifugado	763	-0,015	1,90E+02	1,91E+02
10x centrifugado + calentado	690	-0,012	0	2,07E+02
Sobre sin células	719	0,242	4,20E+02	3,23E+03
Sobre sin células (Prot A)	826	-0,014	0	2,06E+03

10 En referencia a la Tabla 3 anterior, se demostró la recuperación del antígeno p46 específico de M.hyo para cada una de las preparaciones de antígenos procesadas corriente abajo de M.hyo. Además, los siguientes tratamientos eliminaron con éxito el anticuerpo de PCV2: 10X UF concentrado y centrifugado, 10x centrifugado, 10x centrifugado y calentado y sobrenadante sin células (tratado con proteína A). Con respecto a TTV, los siguientes tratamientos eliminaron con éxito g1TTV: 10X UF concentrado y centrifugado, 10x centrifugado y calentado, y sobrenadante sin células (tratado con proteína A). Solamente el tratamiento designado 10X UF concentrado y centrifugado retiró g2TTV. Se describen aislados de virus torque teno, incluyendo genotipos 1 y 2, en el documento US20110150913, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

15 Ya que se conoce en la técnica que la proteína A se une con IgG, los expertos habituales en la materia entienden que no solamente el anticuerpo de PCV2, sino otros anticuerpos de cerdos, incluyendo anticuerpo de PRRS, anticuerpo de HPS y anticuerpo de SIV se eliminarán eficazmente por el tratamiento de proteína A. Esto hace al sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A sin células de la presente invención compatible no solamente con antígeno de PCV2, sino también con otros antígenos porcinos debido a la falta de interferencia inmunológica entre los antígenos. Adicionalmente, se espera razonablemente que la eliminación de los residuos celulares no protectores y eliminación de la inmunoglobulina y complejos de antígeno/inmunoglobulina haga una vacuna más segura.

Ejemplo 4: Preparación de formulaciones de vacunas experimentales de M.hyo

25 Todas las vacunas de M.hyo experimentales se formularon con una concentración final de adyuvante Amphigen del 5 %. Además, todas las vacunas se normalizaron con un ELISA de p46 y se conservaron con timerosal. Las formulaciones de vacunas experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados según los tratamientos T02-T10 anteriores. Además, el tratamiento T01 correspondió a un placebo (sin antígeno de M.hyo, solamente adyuvante Amphigen 5 %) mientras que el tratamiento T11 es un control positivo correspondiente a una vacuna de M.hyo basada en bacterina expirada (RespiSure-ONE®, Pfizer Animal Health). Estas formulaciones se describen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4 Formulaciones de vacunas experimentales de M.hyo

Tratamiento	Serie de PVI*	Unidades de p46 diana/ds	Antígeno de M Hyo (ml)	Adyuvante (ml)	Vol. de formulación (ml)
T01	123639 (Placebo)	Solamente Amphigen 5 %, sin antígeno			
T02	L100211A	452	279,36	250	1000
T03	L100211B	452	6,78	50	200

(continuación)

(continuación)

Tratamiento	Serie de PVI*	Unidades de p46 diana/ds	Antígeno de M Hyo (ml)	Adyuvante (ml)	Vol. de formulación (ml)
T04	L100211C	452	73,62	50	200
T05	L100211D	816	132,90	50	200
T06	L100211E	452	59,24	50	200
T07	L100211F	816	106,95	50	200
T08	L100211G	452	65,51	50	200
T09	L100211H	452	62,87	50	200
T10	L100211J	452	54,72	50	200
T11	A827870	Vacuna "RespiSure" expirada			
*Serie de producto de veterinario de investigación (PVI)					

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia *in vivo* de vacunas de M.hyo con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo

5 Este estudio se realizó para evaluar la eficacia *in vivo* de vacunas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) con antígenos de M hyo de diferentes procedimientos corriente abajo (PCA). Se inoculó en cerdos de 3 semanas de edad por vía intramuscular una única dosis de las diferentes formulaciones de vacunas descritas en la Tabla 4 anterior. Se incluyeron dieciséis animales en cada uno de los grupos de tratamiento. Los animales se expusieron 21 días después de la vacunación a un aislado de campo de M.hyo virulento. Se realizaron necropsias de los animales 28 días después de la exposición y los pulmones se retiraron y se puntuaron con respecto a consolidación coherente con la infección por M.hyo. El criterio principal para protección contra exposición a M.hyo fueron las puntuaciones de consolidación de los pulmones. Se acepta en general que hay una relación entre el tamaño de las lesiones pulmonares provocadas por neumonía enzoótica y un efecto adverso en la tasa de crecimiento. La Tabla 5 a continuación contiene las puntuaciones de lesiones pulmonares para los grupos de tratamiento respectivos. La significación estadística se determinó mediante un análisis de modelo mixto de puntuaciones pulmonares para cada grupo.

Tabla 5 Resultados de lesiones pulmonares

Tratamiento	Descripción	PR de p46 diana/observada	% de medias de MC retrotransformadas de lesiones pulmonares	Intervalo de % de pulmón con lesiones	Contraste	valor de p	Significativo
T01	Placebo (Amphigen 5 %)	ND	11,7	1,2 - 44,3	ND	ND	ND
T02	Volumen completo	13/15,6	1,2	0,1 - 18,5	T01 frente a 02	0	Sí
T03	Volumen completo de UF 10x	13/11,9	0,3	0,0 - 2,8	T01 frente a 03	0	Sí
T04	UF 10x + centrifugado	13/28,1	5,9	0,0 - 40,5	T01 frente a 04	0,1589	No
T05	UF 10x + centrifugado	24/48,2	3,7	0,0 - 42,3	T01 frente a T05	0,0309	Sí
T06	10 x centrifugado	13/30,4	4,7	0,0 - 23,6	T01 frente a 06	0,0388	Sí
T07	10 x centrifugado	24/57,4	4,6	0,3 - 37,3	T01 frente a T07	0,0323	Sí
T08	10 x centrifugado + calor	13/17,7	4,5	0,3 - 21,7	T01 frente a T08	0,0137	Sí
T09	Sobrenadante (sin células)	13/14,1	1,4	0,0 - 33,0	T01 frente a T09	0,0004	Sí

(continuación)

Tratamiento	Descripción	PR de p46 diana/observada	% de medias de MC retrotransformadas de lesiones pulmonares	Intervalo de % de pulmón con lesiones	Contraste	valor de p	Significativo
T10	Sobrenadante + Prot A	13/12,1	3,1	0,0 - 25,8	T01 frente a T10	0,0094	Sí
T11	RSO expirado	13/12,5	2,2	0,1 - 32,1	T01 frente a T11	0,0009	Sí

En referencia a la Tabla 5 anterior, los resultados con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo indicaron que todas las vacunas experimentales excepto T04 difirieron en gran medida del placebo. Estos resultados de lesiones de M.hyo se representan gráficamente en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, T04 proporcionó resultados inaceptables. Todos los otros tratamientos difirieron significativamente del placebo (T01). Las puntuaciones de consolidación de los pulmones indicaron que T02, T03 y T09-T11 proporcionaban la protección más eficaz contra exposición a M.hyo.

La potencia relativa de p46 de las vacunas experimentales se evaluó usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich de doble anticuerpo (DAS ELISA). Los resultados de DAS ELISA de p46 presentados en la Tabla 5 anterior indican que todas las vacunas experimentales superaron la potencia diana. Además, la potencia relativa de p46 se mantuvo o aumentó durante el almacenamiento de las vacunas durante un periodo de un mes (datos no mostrados). Se observó un aumento aparente de la potencia a lo largo del tiempo en antígenos centrifugados con la excepción de los antígenos que se sometieron a calor. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, es probable que todos los "cadáveres" celulares se degraden a lo largo del tiempo y liberen más del antígeno p46 unido a membrana en el caso de los antígenos centrifugados.

Ejemplo 6: Evaluación de la compatibilidad de las vacunas de M.hyo experimentales con antígeno de PCV2

Este estudio se realizó para evaluar la compatibilidad de las vacunas experimentales de M.hyo con antígenos de M.hyo de diferentes procedimientos corriente abajo con antígeno de PCV2. Las formulaciones de vacunas experimentales de M.hyo se describen en las Tablas 4 y 5 anteriores. Las potencias relativas de p46 observadas para estas vacunas se han descrito en la Tabla 5 anterior. Estas vacunas experimentales de M.hyo se combinaron cada una con antígeno de PCV2. En este ejemplo, el antígeno de PCV2 fue un virus quimérico PCV de tipo 1-tipo 2 muerto (Fostera PCV) preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. El virus quimérico se incluyó en las composiciones a un nivel inicial de aproximadamente $1,6 \leq PR$, en el que la PR es la unidad de Potencia Relativa determinada mediante cuantificación de antígeno por ELISA de PCV2 (ensayo de potencia *in vitro*) en comparación con una vacuna de referencia eficaz.

Las formulaciones de combinación de M.hyo/PCV2 experimentales se evaluaron mediante ELISA de PCV2. Los resultados se presentan en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, solamente las preparaciones de antígenos de M.hyo de los siguientes procesos corriente abajo fueron compatibles con el antígeno de PCV2: ultrafiltración y centrifugación (T04 y T05), centrifugación (T06 y T07), centrifugación más calor (T08) y sobrenadante tratado con proteína A (T10). De estas, el sobrenadante tratado con proteína A de M.hyo fue el más compatible con antígeno de PCV2 en comparación con el control de placebo que incluía el virus quimérico y adyuvante Amphigen, pero no antígeno de M.hyo. El nivel de virus PCV quimérico en el sobrenadante tratado con proteína A fue PR 1,5 en comparación con PR 1,69 para el placebo. Se concluyó por lo tanto que no hay ninguna interferencia inmunológica, o esta es mínima, entre la preparación de antígeno soluble de M.hyo tratado con proteína A y antígeno de PCV2 del virus quimérico.

La eficacia *in vivo* del sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A demostrada en el Ejemplo 5 anterior junto con los resultados descritos en el presente ejemplo indicaron que el sobrenadante tratado con proteína A era una plataforma potencialmente eficaz para combinaciones de M.hyo-PCV2.

Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia de PCV2 de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco en diferentes formulaciones de adyuvantes

Este estudio se diseñó para evaluar la eficacia de PCV2 en una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco en diferentes formulaciones de adyuvantes. En este ejemplo, el antígeno de PCV2 fue un virus quimérico PCV de tipo 1-tipo 2 muerto (Fostera PCV). El virus quimérico se combinó con una preparación de antígenos solubles de M.hyo que estaba sustancialmente exenta de IgG (es decir, sobrenadante tratado con proteína A).

Procesamiento de líquidos:

Se trató líquido de fermentación de M.hyo inactivado (descrito anteriormente en el Ejemplo 1) para cada grupo indicado de la siguiente manera.

T02-T04: El líquido de fermentación completo que contenía células de *M. hyopneumoniae* vivas (descrito anteriormente) se centrifugó a ~20.000xg (Sorvall RC5B) y el sobrenadante se recogió y esterilizó a través de un filtro de 0,2 µm. rProteína A Sepharose (número de pieza 17-5199-03, GE Healthcare) se empaquetó en una columna de cromatografía de 1l. Después de la retirada del tampón de almacenamiento y tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón de NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,04. Se pasaron aproximadamente 2 litros de los líquidos que contenían antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificados/filtrados a través de la resina de proteína A a un caudal de 100 cm/h. El flujo continuo se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µm.

T05: Este es un control positivo correspondiente a una formulación de tipo PCV de Foster (sin antígeno de M.hyo). El nivel del virus quimérico en esta formulación de tipo PCV de Foster fue aproximadamente a niveles de formulación de dosis mínima de inmunización (DMI). El virus quimérico se incluyó en las vacunas experimentales de PCV2/M.hyo a niveles de formulación similares.

Todas las vacunas de PCV2/M.hyo experimentales se formularon con diferentes formulaciones de adyuvantes. Las formulaciones de vacunas experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados según los tratamientos T02-T04 anteriores. Además, el Tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina estéril).

Todas las vacunas se normalizaron con un ELISA de p46 y se conservaron con timerosal.

Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 6 a continuación, en la que el símbolo * indica el antígeno de M hyo de inóculo de M hyo global, sobrenadante tratado con proteína A y el símbolo ** indica la serie de producto de veterinario de investigación (PVI).

Tabla 6 Formulaciones de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo usadas para estudio de eficacia de PCV2

Tratamiento	Serie de PVI**	Ag de PCV1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro
T01	87-244-DK (Placebo)	ND			Solución salina estéril
T02	L0411RK08	PR 1,6	PR 7,5	Aceite SP 10 %	ND
T03	L0411RK09			Amphigen 5 %	
T04	L0611RK03			Amphigen 5 % + SLCD 5 %	
T05	L0611RK04		ND	SLCD 20 %	

Se inoculó en cerdos de 3 semanas de edad por vía intramuscular una única dosis de las diferentes formulaciones de vacunas descritas en la Tabla 6 anterior. Se incluyeron dieciséis animales en cada uno de los grupos de tratamiento. Los animales se expusieron 21 días después de la vacunación a un aislado de campo de PCV2 virulento.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de viremia de PCV2 (PCR cuantitativa de PCV2) observados con las diferentes plataformas de adyuvantes. Se observa que la viremia de PCV2 se usó como la variable de eficacia primaria. Los resultados de viremia de PCV2 se presentan como copias de ADN/ml. Como se muestra en la Figura 3, todos los tratamientos tuvieron significativamente menos viremia en comparación con el placebo los días 28, 35 y 42 (la exposición fue el día 21). El adyuvante de aceite SP 10 % tuvo significativamente menos viremia en comparación con Amphigen 5 % los días 28 y 35. El adyuvante de Amphigen 5 % más SLCD 5 % tuvo significativamente menos viremia en comparación con Amphigen 5 % los días 28 y 35. La plataforma de adyuvante SLCD 20 % tuvo significativamente menos viremia en comparación con Amphigen 5 % los días 28, 35 y 42.

La serología de PCV2, diseminación fecal de PCV2, diseminación nasal de PCV2, respuestas de inmunidad celular (IC), agotamiento linfóide e inmunohistoquímica (IHC) también se supervisaron como variables de eficacia secundarias. Estos resultados se describirán a continuación.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de ELISA de PCV2 los días 1, 20 y 42 del estudio (la exposición fue el día 21). El estado de cada muestra se expresó como una relación de muestra con respecto a positivas (M/P). Como se muestran en la Figura 4, SLCD 20 % fue el único tratamiento que fue significativamente diferente del placebo (T01) tanto el día 20 como el día 42. Además, Amphigen 5 % fue el único tratamiento no significativamente diferente del placebo el día 20.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la diseminación fecal de PCV2 obtenida con los tratamientos T02-T04 frente al placebo (T01). Estos resultados se expresan como copias de ADN de PCV2/ml. Los resultados de la Figura 5 indican que todos los tratamientos tuvieron significativamente menos diseminación fecal en comparación con el placebo el día 42. Además, Amphigen 5 % y SLCD 5 % (T04) tuvieron significativamente menos diseminación fecal en comparación con Amphigen 5 % (T03) el día 42. No se observaron otras diferencias de los tratamientos.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la diseminación nasal de PCV2 obtenida con los tratamientos T02-T04 frente

al placebo (T01). Estos resultados se expresan como copias de ADN de PCV2/ml. Los resultados de la Figura 6 indican que todos los tratamientos tuvieron significativamente menos diseminación nasal en comparación con el placebo el día 42. Además, SLCD 20 % (T05) tuvo significativamente menos diseminación nasal en comparación con Amphigen 5 % (T03) el día 42. No se observaron otras diferencias de los tratamientos.

- 5 La Figura 7 (A y B) son de dos gráficos que muestran los resultados de un ensayo de interferón-gamma (IFN- γ) que mide respuestas de inmunidad celular (IC) específicas de PCV2. Los resultados de IC se muestran después de la vacunación/antes de la exposición (Figura 7A) y después de la vacunación/después de la exposición (Figura 7B). En estos gráficos, la estimulación de 5×10^6 células se consideró significativa (...). Todas las vacunas experimentales de PCV2/M.hyo proporcionaron una respuesta de IFN- γ detectable después de la vacunación. El aceite SP 10 % (T02) impulsó la respuesta de IFN- γ más fuerte después de la vacunación. El SLCD 20 % (T05) indujo una respuesta más temprana, pero la menor respuesta el día 20. Hubo una gran respuesta después de la exposición, especialmente vista en el grupo de placebo. Adicionalmente, la respuesta después de la exposición fue menor en los grupos de tratamiento de cerdos vacunados en comparación con el grupo de placebo.

- 15 La Tabla 7 a continuación muestra el agotamiento linfóide obtenido con los tratamientos experimentales en contraste con el placebo.

Tabla 7 Histopatología de PCV2 (agotamiento linfóide)

Tratamiento	Agotamiento linfóide			En contraste con placebo	
	Positivo	Negativo	% Pos. total	Valor de p	Significativo
Placebo	9	7	56 %	ND	ND
Aceite SP 10 %	1	15	6 %	0,0059	Sí
Amphigen 5 %	1	15	6 %	0,0059	Sí
Amph 5 % + SLCD 5 %	0	16	0 %	0,0008	Sí
SLCD 20 %	1	15	6 %	0,0059	Sí

- 20 Los resultados presentados en la Tabla 7 anterior muestran que todas las vacunas proporcionaron protección fuerte contra el agotamiento linfóide. Además, no se observó ningún contraste de tratamientos de vacuna estadísticamente significativo. La Tabla 8 a continuación muestra la inmunohistoquímica obtenida con los tratamientos experimentales en contraste con el placebo.

Tabla 8 Histopatología de PCV2 (inmunohistoquímica)

Tratamiento	Inmunohistoquímica			En contraste con placebo	
	Positivo	Negativo	% Pos. total	Valor de p	Significativo
Placebo	12	4	75 %	ND	ND
Aceite SP 10 %	0	16	0 %	0,0001	Sí
Amphigen 5 %	1	15	6 %	0,0002	Sí
Amph 5 % + SLCD 5 %	0	16	0 %	0,0001	Sí
SLCD 20 %	0	16	6 %	0,0001	Sí

Los resultados presentados en la Tabla 8 anterior muestran que todas las vacunas proporcionaron protección fuerte contra la colonización por PCV2 como se demuestra por la inmunohistoquímica. Además, no se observó ningún contraste de tratamientos de vacuna estadísticamente significativo.

- 25 En conclusión, los resultados presentados en este ejemplo demuestran que la preparación de antígenos solubles de M.hyo no interfiere con la eficacia de PCV2. Los resultados también muestran que todas las formulaciones de vacunas experimentales de PCV/M.hyo proporcionan eficacia contra la exposición a PCV2. Adicionalmente, los resultados indican que hay algunas diferencias estadísticas y numéricas obtenidas con las diferentes formulaciones de adyuvantes, produciendo el aceite SP 10 % la mayor eficacia.

Ejemplo 8: Evaluación de la eficacia de M.hyo de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco con diferentes formulaciones de adyuvantes

Este estudio se diseñó para evaluar la eficacia de M.hyo de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco con diferentes formulaciones de adyuvantes. El antígeno de M.hyo se combinó con circovirus porcino (quimera de tipo 1-tipo 2 o virus inactivado, PCV1-2) en un frasco.

Procesamiento de líquidos:

Se trató líquido de fermentación de M.hyo inactivado (descrito anteriormente en el Ejemplo 1) para cada grupo indicado de la siguiente manera.

T02-T04: Estos tratamientos fueron iguales que los descritos para los grupos de tratamiento T02-T04 en el Ejemplo 7 anterior.

T05: Este se formuló con células de M.hyo inactivadas (bacterina de M.hyo) como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior bajo el encabezamiento "Fermentación e inactivación".

Todas las vacunas de PCV2/M.hyo experimentales se formularon con diferentes formulaciones de adyuvantes. Las formulaciones de vacunas experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados según los tratamientos T02-T04. Además, el Tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina estéril). El Tratamiento T05 es un control positivo correspondiente a una vacuna RespiSure® expirada, que es una vacuna basada en bacterina M.hyo (Pfizer Animal Health).

Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 9 a continuación, en la que el símbolo * indica el antígeno de M hyo de inóculo de M hyo global, sobrenadante tratado con proteína A y el símbolo ** indica la serie de producto de veterinario de investigación (PVI).

Tabla 9 Formulaciones de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo usadas para estudio de eficacia de M.hyo en diferentes formulaciones de adyuvantes

Tratamiento	Serie de PVI**	Ag de PCV1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro
T01	87-244-DK (Placebo)	ND			Solución salina estéril
T02	L0411RK08	PR 1,6	PR 7,5	Aceite SP 10 %	ND
T03	L0411RK09			Amphigen 5 %	
T04	L0611RK03			Amphigen 5 % + SLCD 5 %	
T05	A827870	Vacuna "RespiSure" expirada			

Se inoculó en cerdos de 3 semanas de edad por vía intramuscular una única dosis de las diferentes formulaciones de vacunas descritas en la Tabla 9 anterior. Se incluyeron catorce animales en los grupos tanto de placebo como de aceite SP 10 %, se incluyeron trece animales en el grupo de control positivo y se incluyeron dieciséis animales en los grupos tanto de Amphigen 5 % como de Amphigen 5 % + SLCD 5 %.

Los animales se expusieron 21 días después de la vacunación a un aislado de campo de M.hyo virulento. Se realizaron necropsias de los animales 28 días después de la exposición y los pulmones se retiraron y se puntuaron con respecto a consolidación coherente con la infección por M.hyo. La Tabla 10 a continuación contiene las puntuaciones de lesiones pulmonares para los grupos de tratamiento respectivos. La significación estadística se determinó mediante un análisis de modelo mixto de puntuaciones pulmonares para cada grupo.

Tabla 10 Lesiones pulmonares de M.hyo

Tratamiento	N.º de animal	Media de MC de lesión pulmonar	Intervalo de % de lesión pulmonar
Placebo (T01)	14	13,1 %	0,1 - 50,5
Aceite SP 10 % (T02)	14	4,3 %	0,0 - 50,8
Amphigen 5 % (T03)	16	4,7 %	0,0 - 38,5
Amph 5 % + SLCD 5 % (T04)	16	12,0 %	0,1 - 55,8
RSO expirado (T05)	13	2,28 %	0,0 - 34,5

Como se ha indicado en la Tabla 10 anterior, el grupo de placebo tenía una puntuación de lesión pulmonar media de 13,1 %, en comparación con los grupos de tratamiento de aceite SP 10 % y Amphigen 5 % que tenían puntuaciones de pulmón medias de 4,3 % y 4,7 %, respectivamente. Las formulaciones tanto de aceite SP 10 % como de Amphigen 5 % redujeron y/o previnieron las lesiones pulmonares. Por tanto, las vacunas experimentales de PCV/M.hyo formuladas con aceite SP 10 % o Amphigen 5 % se consideraron eficaces. El antígeno de PCV2 no parecía interferir con la eficacia de M.hyo de estas formulaciones.

Por el contrario, el grupo de Amphigen 5 % + SLCD 5 % tuvo una puntuación de lesión pulmonar media de 12,0 % que fue un resultado inaceptable porque no era diferente en comparación con el placebo. En consecuencia, la vacuna experimental de PCV/M.hyo formulada con Amphigen 5 % + SLCD 5 % no se consideró tan eficaz.

Se observa que debido al reducido número de animales y la alta variabilidad de la puntuación de lesiones pulmonares, no pudo demostrarse de forma concluyente ningún efecto estadístico del tratamiento en este estudio. Por este motivo, se decidió que se diseñaría otro estudio para ensayar la eficacia de M.hyo de las formulaciones experimentales de PCV/M.hyo en aceite SP 10 %. Este estudio repetido se presenta en el Ejemplo 9 a continuación.

Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia de M.hyo de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco en aceite SP 10 %

Este estudio es una prueba de concepto diseñada para evaluar la eficacia de fracción de M.hyo de cuatro vacunas experimentales de PCV2/M.hyo (series L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 y L0711RK14 en la Tabla 11 posterior) preparadas por diferentes procedimientos de fabricación de M.hyo que utilizan Proteína A para la eliminación de IgG en comparación con vacunas de control preparadas con el procedimiento de fabricación de M.hyo convencional. Cada una de estas cuatro vacunas experimentales de PCV2/M.hyo incluyó el aceite SP 10 % como el adyuvante.

Procesamiento de líquidos:

T02: Antígeno de *M. hyopneumoniae* inactivado como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior.

T03 y T04: Formulados con células de *M. hyopneumoniae* inactivadas como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior.

T05: Tratamiento con proteína A de medio usado para cultivar *M. hyopneumoniae*. Se fabricó PPLO (procedente de corazón porcino) según las instrucciones del fabricante (es decir, 21 g/l) y se fabricó solución de extracto de levadura a 21 g/l en USP. Se añadió solución de extracto de levadura al PPLO a 6,25 % y la mezcla se esterilizó por calentamiento hasta 121 °C durante ≥ 30 minutos. Se preparó clorhidrato de cisteína a 90 g/l y se esterilizó por filtrado. Se realizó solución de dextrosa añadiendo 450 g de dextrosa por litro de agua USP seguido de esterilización por calor. Para preparar el medio final, se añadió suero porcino al medio básico a 10 % seguido de cisteína a 0,01 % y dextrosa a 1,0 %. Los anticuerpos en medio de PPLO completo se eliminaron por tratamiento con proteína A. En resumen, se empaquetó un litro de rProteína A Sepharose (número de pieza 17-5199-03 GE Healthcare) en una columna de vidrio (10 X 11,5 cm). Después de la retirada de tampón de almacenamiento, la columna se trató con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M. La resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón de NaPO₄ 50 mM, NaCl 1 M (pH 7,0). Se cargaron quince litros de medio de PPLO completo en la resina a un caudal lineal de 140 cm/hora. El flujo continuo en columna se recogió y se esterilizó por filtrado a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Sartorius). El medio tratado se usó para propagar células de *M. hyopneumoniae* como se ha descrito en "Fermentación e inactivación" anterior. Se formuló cultivo inactivado completo (incluyendo células) en la vacuna final.

T06: Se prepararon células de *M. hyopneumoniae* inactivadas como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior. El líquido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000xg (Sorvall RC5B) durante 30 min. y el sobrenadante se esterilizó mediante filtración a 0,2 µm. Se empaquetaron ciento quince ml de resina de rProteína A (número de pieza 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón de NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Se pasaron aproximadamente 1,2 litros de los líquidos que contenían antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificados/filtrados a través de la resina a un caudal de 120 cm/h. El flujo continuo se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µm.

T07: Se prepararon células de *M. hyopneumoniae* inactivadas como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1 anterior. El líquido de fermentación inactivado se clarificó mediante filtración de flujo tangencial. En resumen, un filtro de sulfona de poliéter (GE HealthCare, número de pieza 56-4102-71) con tamaño de poro nominal de 0,2 µm se esteriliza con solución de hidróxido de sodio 0,5 N seguido de aclarado exhaustivo con agua USP estéril. Se introdujo líquido de cultivo de micoplasma inactivado en el aparato a una tasa de recirculación dirigida a 14,6 l/minuto y una presión transmembrana de 13,79-23,44 kPa. Se realizó clarificación a temperatura ambiente. El permeado de filtrado se recogió y se almacenó a 2-8 C hasta procesamiento posterior. Se empaquetaron ciento quince ml de resina de rProteína A (número de pieza 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón de NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Se pasaron aproximadamente 2,3 litros de los líquidos que contenían antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificados/filtrados a través de la resina a un caudal de 120 cm/h. El flujo continuo se recogió y se

esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM.

T08: Se prepararon células de *M. hyopneumoniae* inactivadas como se describe en "Fermentación e inactivación" anteriormente. El líquido de fermentación inactivado se centrifugó a ~20.000xg (Sorvall RC5B) durante 30 min. y el sobrenadante se esterilizó mediante filtración a 0,2 µM. Se empaquetaron ciento quince ml de rProteína A Sepharose (número de pieza 17-5199-03 GE Healthcare) en una columna de cromatografía (5x6 cm). Después de la retirada del tampón de almacenamiento y tratamiento con 2 volúmenes de columna de ácido acético 1 M, la resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón de NaPO₄ 50 mM/NaCl 1 M, pH 7,01. Se pasaron aproximadamente 1,2 litros de los líquidos que contenían antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificados/filtrados a través de la resina a un caudal de 120 cm/h. El flujo continuo se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 µM.

Las formulaciones de vacunas experimentales se prepararon con antígenos de M.hyo procesados según los tratamientos T02-T08 anteriores. T02, T03 y T04 correspondían a controles positivos. Además, el Tratamiento T01 correspondió a un placebo (solución salina estéril).

Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 11 a continuación. El antígeno de M.hyo corresponde al antígeno de M.hyo de inóculo de M.hyo global, sobrenadante tratado con proteína A. La información en la columna de "tratamiento de proteína A" indica si el sobrenadante de M.hyo se trató con Proteína A antes o después de la fermentación.

Tabla 11 Formulaciones de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo usadas para estudio de eficacia de M.hyo en adyuvante de aceite SP

Tratamiento	N.º de serie	Ag de PCV1-2	Ag de M.hyo	Tratamiento de proteína A	Procedimiento de clarificación de sobrenadante	Marca de proteína A	Adyuvante	Otro	
T01	L0311AS11	ND							Solución salina estéril
T02	A828718	ND	13	RespiSure one expirada					ND
T03	L0711RK09	PR 1,5	M.hyo sin tratamiento de proteína A y con PCV-2					Amphigen	
T04	L0711RK10	ND	M.hyo sin tratamiento de proteína A y sin PCV-2						
T05	L0711RK11	PR 1,5	PR 7,5	Antes	ND	Sepharose	Aceite SP 10 %		
T06	L0711RK12			Después	Centrífuga	MAbSelect			
T07	L0711RK13			Después	Filtro	MAbSelect			
T08	L0711RK14			Después	Centrífuga	Sepharose			

Se inoculó en cerdos de 3 semanas de edad por vía intramuscular una única dosis de las diferentes formulaciones de vacunas descritas en la Tabla 11 anterior. Se incluyeron 18 cerdos en cada grupo de tratamiento. Los animales se expusieron 21 días después de la vacunación a un aislado de campo de M.hyo virulento. Se realizaron necropsias de los animales 28 días después de la exposición y los pulmones se retiraron y se puntuaron con respecto a consolidación coherente con la infección por M.hyo. La Figura 8 (A y B) muestra las puntuaciones de lesiones pulmonares para los grupos de tratamiento respectivos. La significación estadística se determinó mediante un análisis de modelo mixto de puntuaciones pulmonares para cada grupo.

Los resultados de lesión pulmonar representados en las Figuras 8A y 8B indican que de todos los tratamientos, solamente dos (T07 y T08) tenían 100 % de cerdos en la categoría de lesión pulmonar <5 %. Se indica que se observó una fuerte diferencia estadística en este estudio.

Los resultados en el presente ejemplo demuestran la eficacia de M.hyo significativa en una formulación experimental de PCV2/M.hyo en 1 frasco que emplea el sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A y que utiliza aceite SP como el adyuvante. Adicionalmente, el Ejemplo 7 anterior ha demostrado la eficacia de PCV2 en una formulación de PCV2/M.hyo en 1 frasco que emplea el sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A y que utiliza aceite SP como el adyuvante. En conjunto, se ha demostrado la eficacia tanto de M.hyo como de PCV2 en las combinaciones de PCV2/M.hyo en 1 frasco que emplean sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A.

Ejemplo 10: Seguridad *in vivo* de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo

Este estudio se realizó para evaluar la seguridad *in vivo* de vacunas de experimentales de PCV2-M.hyo formuladas a dosis de antígeno máxima en diversas formulaciones de adyuvantes en el animal hospedador cuando se proporcionan a la edad más joven (3 semanas de edad). Se evaluaron plataformas de adyuvantes diferentes para determinar cuál de estas plataformas proporcionaba un perfil de seguridad aceptable basado en la temperatura, reacciones en el sitio de inyección y observaciones clínicas. Se usó una formulación de SLCD 20 %/aceite SP 10 % como un control positivo ("inseguro") debido a problemas históricos con reacciones de sitios de inyección observadas por este grupo de investigación y otros.

Procesamiento de líquidos:

Todas las vacunas se prepararon con antígeno de *M. hyopneumoniae* como se describe en "Fermentación e inactivación" en el Ejemplo 1. Se usó antígeno a granel completo de M.hyo ya que se sabía que contenía antígenos de M.hyo solubles e insolubles, además de las inmunoglobulinas e inmunocomplejos que se eliminarían tras el tratamiento de proteína A. Fue razonable concluir que la eliminación de residuos celulares insolubles e inmunoglobulinas e inmunocomplejos solamente potenciará adicionalmente la seguridad de las formulaciones de vacuna. La intención de este estudio fue ensayar de forma rigurosa la seguridad de las diversas formulaciones de adyuvantes que contenían antígeno de PCV2 y antígeno de M.hyo. Los antígenos de PCV2 y M.hyo se formularon a niveles de liberación máximos para evaluar la seguridad adicionalmente. Estas formulaciones experimentales se describen en la Tabla 12 a continuación. PVI indica Producto Veterinario de Investigación (PVI).

Tabla 12 Formulaciones de vacunas experimentales de PCV2/M.hyo usadas para estudio de seguridad

Serie de PVI	Ag de PCV1-2	Ag de M Hyo*	Adyuvante	Otro	Vol. de vacuna mínimo (ml)
87-244-DK (Placebo)	ND			Estéril Solución salina	ND
L0411RK15	PR 7,8	PR 13	Aceite SP 10 %	ND	200
L0411RK16			Amphigen 5 %		200
L0611RK05			Amphigen 5 % + SLCD 5 %		200
L0611RK06			SLCD 20 % + aceite SP 10 %		200
*antígeno de M hyo = de inóculo de M hyo global (antígeno a granel completo).					

Los parámetros de seguridad empleados en este estudio fueron perfil de temperatura rectal y reacción en el sitio de inyección. Los resultados de este estudio indicaron que todas las plataformas de adyuvantes candidatas proporcionaron un perfil de seguridad aceptable con respecto a perfil de temperatura rectal y observaciones clínicas (resultados no mostrados). Solamente el SLCD 20 % + aceite SP 10 % (es decir, control positivo) fue significativamente diferente de la vacuna de placebo y tuvo varias reacciones en sitios de inyección graves (resultados no mostrados).

Ejemplo 11: Preparación de antígeno de M.hyo tratado con proteína A para estudios fundamentales

La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra una realización de un procedimiento de fabricación usado para preparar antígeno de M.hyo tratado con proteína A compatible con PCV2. Los cultivos completos inactivados de M.hyo se clarificaron de células mediante filtración de flujo tangencial. En resumen, un filtro de sulfona de poliéter (GE Healthcare, número de pieza 56-4102-49) con tamaño de poro nominal de 0,45 µm se esteriliza con solución de hidróxido de sodio 0,5 N seguido de aclarado exhaustivo con agua USP estéril. Se introdujo líquido de cultivo de micoplasma inactivado en el aparato a una tasa de recirculación dirigida a 11,0 l/minuto y una presión transmembrana de ~34,47 kPa. Se realizó clarificación a temperatura ambiente. El permeado de filtrado se recogió y se almacenó a 2-8 °C hasta procesamiento posterior.

Tras la purificación, se trataron líquidos que contienen antígenos con resina de proteína A para reducir los niveles de anticuerpos. En resumen, la resina de proteína A MAbSelect (GE Healthcare) se empaquetó en una columna de vidrio hasta una altura de 12 cm. La resina se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 50 mM, tampón de NaCl 250 mM (pH 7,0). Se cargó líquido que contenía antígenos, equivalente a 10 volúmenes de columna, en la resina a un caudal lineal de 100 cm/hora. El flujo continuo en columna se recogió y se esterilizó por filtrado a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Se consiguió regeneración de la columna haciendo fluir 3 volúmenes de columna de solución de acetato 25 mM a pH 3,7 seguido de 4 volúmenes de columna de solución de ácido acético 1 M. Se midieron anticuerpos anti-PCV2 y los niveles de antígenos de *M. hyopneumoniae* en el líquido de antígeno final mediante ELISA de anticuerpos específicos de PCV2 y ELISA de cuantificación de antígeno p46, respectivamente.

Ejemplo 12: Eficacia de la fracción quimérica de PCV1-2 después de la administración intramuscular de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco en aceite SP 10 %

Se designó que el estudio presentado en este ejemplo evaluaba la eficacia de la fracción de virus muerto, quimera de PCV1-2, de una vacuna de combinación experimental de PCV2/M.hyo en 1 frasco, administrada una vez a cerdos de 21 ±3 días de edad y expuesta a un aislado de PCV2 virulento a aproximadamente 6 semanas de edad.

Se formularon cuatro vacunas experimentales de PCV1-2/M.hyo bivalentes a niveles de dosis de antígenos diferentes, pero equilibrados, y una vacuna de M.hyo monovalente experimental (control negativo) con el antígeno de mayor pase. El lote de control de antígeno de M.hyo se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 11 anterior. El antígeno de PCV2 fue un antígeno de cPCV1-2 muerto preparado como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior. Antes de la inactivación del virus quimérico, el lote de antígeno de PCV2 se concentró 20X y los concentrados se lavaron con una solución salina equilibrada. Las formulaciones de vacunas experimentales finales se potenciaron usando aceite SP 10 %. Estas formulaciones experimentales se describen posteriormente y en la Tabla 13, en la que se proporciona la dosis de antígeno (% de los lotes de antígeno de PCV2 y M.hyo).

T01: Preparación experimental (L1211RK11) de antígeno de M.hyo (14,1 %-alto) sin fracción de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2 (0 %). Esto corresponde a un control negativo (M.hyo monovalente).

T02: Preparación experimental (L1211RK09) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (1,375 %-Alto) y antígeno de M.hyo (14,1 %-Alto).

T03: Preparación experimental (L1211RK15) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (0,688 %-Medio) y antígeno de M.hyo (9,4 %-Medio).

T04: Preparación experimental (L0112RK03) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (0,344 %-Bajo) y antígeno de M.hyo (4,7 %-Bajo).

T05: Preparación experimental (L1211RK17) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (0,172 %-Muy bajo) y antígeno de M.hyo (2,32 %-Muy bajo).

Tabla 13 Diseño experimental

Grupo	N	PC o PVI ¹	Vacunación				
			N.º de serie / Lote	Dosis de antígeno (PCV2 / M.hyo)	Adyuvante	Dosis	Vía
T01	24	Placebo	L1211RK11	Ninguna/alta	Aceite SP 10 %	2 ml	IM, Lado derecho del cuello
T02	24	PCV2-M.hyo	L1211RK09	Alta/alta			
T03	24	PCV2-M.hyo	L1211RK15	Media/media			
T04	24	PCV2-M.hyo	L0112RK03	Baja/baja			

(continuación)

Grupo	N	PC o PVI ¹	Vacunación				
			N.º de serie / Lote	Dosis de antígeno (PCV2 / M hyo)	Adyuvante	Dosis	Vía
T05	24	PCV2-M hyo	L1211RK17	Muy baja/muy baja			
¹ PVI= vacuna de virus muerto, quimera de circovirus porcino de tipo 1 - tipo 2 (PCV2)-extracto bacteriano de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (M hyo) PC = extracto bacteriano de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> potenciado con aceite SP 10 % (sin fracción de quimera de circovirus porcino de tipo 1 - tipo 2) IM = por vía intramuscular							

El día 0 (3 semanas de edad) se administró una única dosis de 2 ml de la vacuna asignada mediante inyección IM en el lado derecho de cada cerdo incluido en el estudio. No se observó ningún acontecimiento adverso después de la vacunación. Se recogió una muestra de suero de todos los cerdos semanalmente antes de la exposición. Cualquier cerdo en el que se detectó viremia de PCV2 antes de la exposición se retiró del estudio. El día antes de la exposición se recogieron muestras fecales y muestras de suero. Los cerdos se expusieron posteriormente a un virus de exposición PCV2a. La exposición se realizó aproximadamente 3 semanas después de la vacunación (día 21). En cada cerdo se inocularon 3 ml totales de virus de exposición PCV2a (aislado n.º 40895, prediluido a 5,10 log₁₀ DIAF₅₀/ml) con 2 ml por vía intranasal y 1 ml por vía intramuscular en el lado izquierdo del cuello. Se tituló una alícuota reservada del virus de exposición después de la exposición para confirmar la dosis de exposición real. El volumen sin diluir se prediluyó 2 veces y los resultados de retrotitulación alcanzaron un nivel de exposición de 5,10 log₁₀ DIAF₅₀/ml. Antes de la necropsia, se recogieron suero y muestras fecales semanalmente durante la fase de exposición de tres semanas. A las tres semanas después de la exposición todos los cerdos se sacrificaron y se les realizaron necropsias. Se recogieron muestras de suero y muestras fecales, junto con 4 tejidos linfoides diferentes. Durante la necropsia, se recogieron secciones de tres ganglios linfáticos (traqueobronquial, mesentérico, inguinal) y la amígdala para cada cerdo y se identificaron individualmente y se fijaron en solución de formalina tamponada al 10 %. Los resultados de ensayo se proporcionan a continuación.

Ensayo de potencia de la vacuna

Se consideró que la serie de vacuna de PCV/M.hyo L1211RK15 descrito anteriormente era el candidato de referencia. En consecuencia, se determinó la potencia relativa tanto para la fracción de M.hyo como para la fracción de PCV2 frente a este candidato de referencia. Estos resultados se presentan en la Tabla 14 a continuación. La serie L1211RK11 corresponde al placebo (sin fracción de PCV2).

Tabla 14 Resultados de potencia

Serie	Referencia L1211RK15	
	Potencia de <i>M. hyo</i>	Potencia de PCV
L1211RK11	1,57	0,00
L1211RK09		2,08
L1211RK15		1,05
L0112RK03		0,56
L1211RK17		0,27

Los resultados mostrados para cada serie son promedios de todas las repeticiones ensayadas.

Viremia de PCV2

Después de la exposición, en comparación con el grupo de placebo, todos los grupos vacunados tuvieron una reducción significativa en el porcentaje de cerdos virémicos [$P \leq 0,05$], y a lo largo del estudio al menos 47 % de los cerdos en los grupos tratados (T02-T05) permanecieron negativos para viremia de PCV2 (Tabla 15 a continuación). De manera similar, todos los grupos de vacuna tuvieron menores ($P=0,0001$) números de copias de ADN de PCV2 que el grupo de placebo después de la exposición (datos no mostrados).

Tabla 15 qPCR cualitativa de viremia de suero - porcentaje de positivo total y estimación de fracción de prevención

Trt	Vacuna	¿Positivo?				Observaciones totales	Valor de P
		Pos		Neg			
		N.º	%	N.º	%	Número	
T01	L1211RK11	23	95,8	1	4,2	24	
T02	L1211RK09	2	8,3	22	91,7	24	<0,0001
T03	L1211RK15	7	31,8	15	68,2	22	0,0006
T04	L0112RK03	12	52,2	11	47,8	23	0,0063
T05	L1211RK17	7	29,2	17	70,8	24	0,0004

Diseminación fecal de PCV2

Las muestras fecales después de la exposición revelaron que 83,3 % de los cerdos del grupo de placebo (T01) eran positivos para diseminación fecal de PCV2. Por el contrario, todos los grupos de vacuna (T02-T05) tuvieron una reducción significativa en el porcentaje de cerdos que diseminaban ADN de PCV2 detectable por PCR ($P \leq 0,0061$). Estos resultados se presentan en la Tabla 16 a continuación. De manera similar, todos los grupos de vacuna tuvieron números significativamente menores de copias de ADN de PCV2 que el grupo de placebo después de la exposición (datos no mostrados).

Tabla 16 Diseminación fecal presente en algún momento después de la exposición (día>21)

Trt	Vacunas	¿Fecal presente?				Observaciones totales	Valor de P
		Pos		Neg			
		N.º	%	N.º	%	Número	
T01	L1211RK11	20	83,3	4	16,7	24	
T02	L1211RK09	6	25,0	18	75,0	24	0,0002
T03	L1211RK15	9	40,9	13	59,1	22	0,0049
T04	L0112RK03	10	43,5	13	56,5	23	0,0061
T05	L1211RK17	6	25,0	18	75,0	24	0,0002

Respuesta de anticuerpos de suero

Todos los cerdos fueron seronegativos para PCV2 antes de la vacunación. Los cerdos en el grupo de placebo permanecieron seronegativos antes de la exposición. Por el contrario, los cerdos en todos los grupos de vacuna excepto por el grupo T05 mostraron aumentos significativos ($P \leq 0,0287$) del título de anticuerpo de PCV2 el día 20 después de la vacunación en comparación con el placebo, lo que indica la respuesta inmunitaria activa a PCV2 después de la vacunación. Los títulos de anticuerpos de ELISA de PCV2 se resumen en la Tabla 17 a continuación. Los títulos antes de la exposición indicaron una diferencia significativa ($P \leq 0,0393$) en los grupos T02 y T03 con respecto al grupo T01 los días 7-20 y entre los grupos T01 y T04 el día 20 ($P \leq 0,0287$). En los días 28 a 42, todos los grupos de vacuna tuvieron títulos significativamente menores que T01 ($P \leq 0,0129$; Tabla 17 a continuación).

Tabla 17 Comparación de tratamientos de títulos de M/P de ELISA de PCV2 por día de estudio

Contraste	Día -1	Día 07	Día 14	Día 20	Día 28
T01 frente a T02	ns	0,0229	0,0005	0,0001	<0,0001
T01 frente a T03	ns	0,0302	0,0393	0,0060	<0,0001
T01 frente a T04	ns		ns	0,0287	<0,0001
T01 frente a T05	ns		ns	ns	<0,0001

(continuación)

Contraste	Día 35	Día 42			
T01 frente a T02	<0,0001	0,0056			
T01 frente a T03	<0,0001	0,0024			
T01 frente a T04	<0,0001	0,0114			
T01 frente a T05	<0,0001	0,0129			
*Cuando el contraste es significativo ($\leq 0,05$) se indica un valor de P, los valores de $P > 0,05$ se designan como ns (no significativos)					

Lesiones linfoides y colonización

En el momento de la necropsia, en comparación con el grupo de placebo, todos los grupos vacunados tuvieron una reducción significativa de la cantidad total de antígeno de PCV2 detectado en los tejidos. Los datos con respecto a infección por PCV2 en tejidos linfoides (puntuaciones de IHC) se resumen en la Tabla 18 a continuación. Como se muestra en la Tabla 18, todos los grupos de vacuna tuvieron puntuaciones de IHC significativamente menores que el grupo de placebo T01.

Tabla 18 Puntuaciones de IHC de PCV2: Si los tejidos linfoides o de amígdalas son anómalos en algún momento

Tratamiento	LSM	Comparación con valor de P de L 12111RK11
L1211RK11	0,75	
L1211RK09	0,15	0,0003
L1211RK15	0,30	0,0055
L0112RK03	0,34	0,0106
L1211RK17	0,41	0,0273
* El animal se consideró anómalo si la puntuación fue > 0 en cualquier muestra de tejido linfoide o amígdalas.		

Todos los grupos vacunados también vieron una reducción significativa en agotamiento linfoide de PCV2 como se muestra en la Tabla 19 a continuación.

Tabla 19 Agotamiento linfoide de PCV2: Si los tejidos linfoides o de amígdalas son anómalos en algún momento

Tratamiento	LSM	Comparación con valor de P de L12111RK11
L1211RK11	0,48	
L1211RK09	0,04	0,0053
L1211RK15	0,13	0,0181
L0112RK03	0,08	0,0069
L1211RK17	0,11	0,0116
* El animal se consideró anómalo si la puntuación fue > 0 en cualquier muestra de tejido linfoide o amígdalas.		

Adicionalmente, todos los grupos vacunados vieron una reducción significativa en el reemplazo histiocítico como se muestra en la Tabla 20 a continuación.

Tabla 20 Reemplazo histiocítico de PCV2: si los tejidos linfoides o de amígdalas son anómalos en algún momento

Tratamiento	LSM**	Comparación con valor de P de L1211RK11
L1211RK11	ND	
L1211RK09	ND	0,0006
L1211RK15	ND	0,0098
L0112RK03	ND	0,0098
L1211RK17	ND	0,0173

* El animal se consideró anómalo si la puntuación fue > 0 en cualquier muestra de tejido linfoide o amígdalas.

** Se usó ensayo exacto de Fisher debido a la ausencia de convergencia, por lo tanto no se determinaron las medias de mínimos cuadrados (ND).

Los datos presentados en este ejemplo indican que los grupos de vacuna:

Protegeron y ayudaron significativamente en la prevención de la viremia de PCV2 después de la exposición;

Ayudaron significativamente en la prevención de la diseminación fecal de PCV2 después de la exposición en todos los animales vacunados;

Indujeron una respuesta serológica estadísticamente significativa 28 días después de la vacunación en los grupos T02-T05. Además, T02 y T03 demostraron una respuesta estadísticamente significativa tan pronto como 7 días después de la vacunación en comparación con T01;

Redujeron significativamente las lesiones microscópicas (agotamiento linfoide y reemplazo histiocítico) en todos los animales vacunados; y

Todas las vacunas demostraron ser eficaces y se seleccionó la serie de vacuna L1211RK15 como un candidato de referencia.

Ejemplo 13: Eficacia de la fracción de M.hyo después de la administración intramuscular de una vacuna de combinación de PCV2/M.hyo en 1 frasco en aceite SP 10 %

El objeto del estudio presentado en este ejemplo fue evaluar la eficacia de la fracción de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) de un virus muerto experimental, de quimera de Circovirus porcino (PCV) de tipo 1 - tipo 2-extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo), administrada por vía intramuscular una vez a cerdos de 21 ± 3 días de edad y expuesta a un homogeneizado virulento de pulmón de *M. hyopneumoniae* a las 7 semanas después de la vacunación.

Se formularon cuatro vacunas experimentales de PCV1-2/M.hyo bivalentes a niveles de dosis de antígenos diferentes, pero equilibrados, y una vacuna de PCV2 monovalente experimental (control negativo). El lote de control de antígeno de M.hyo se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 11 anterior. El antígeno de PCV2 fue un antígeno de cPCV1-2 muerto preparado como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior. Antes de la inactivación del virus quimérico, el lote de antígeno de PCV2 se concentró 20X y los concentrados se lavaron con una solución salina equilibrada. Las formulaciones de vacunas experimentales finales se potenciaron usando aceite SP 10 %. Estas formulaciones experimentales se describen posteriormente y en la Tabla 21 a continuación, en la que se proporciona la dosis de antígeno (% de los lotes de antígeno de PCV2 y M.hyo).

T01: Preparación experimental (L1211RK10) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (1,375 %-Alto) sin fracción de M.hyo (0 %). Esto corresponde a un control negativo (PCV2 monovalente).

T02: Preparación experimental (L1211RK09) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (1,375 %-Alto) y antígeno de M.hyo (14,1 %-Alto).

T03: Preparación experimental (L1211RK15) de virus muerto, quimera de PCV de tipo 1-tipo 2, de pase alto (0,688 %-Medio) y antígeno de M.hyo (9,4 %-Medio).

Tabla 21 Diseño experimental

Grupo	N	PC o PVI ¹	Vacunación				
			N.º de serie/lote	PR de dosis de antígeno (PCV2 / M hyo)	Adyuvante	Dosis	Vía
NTX	9	Centinela	ND	Sin vacunación			
T01	38	Placebo - PCV2	L1211RK10	Alta / ninguna	Aceite SP 10 %	2 ml	IM, Lado izquierdo del cuello
T02	38	PCV2-M hyo	L1211RK09	Alta / alta			
T03	38	PCV2-M hyo	L1211RK15	Media / media			

¹ PVI = Producto de Veterinario de Investigación = vacuna de virus muerto, quimera de circovirus porcino de tipo 1 - tipo 2 (PCV2)-extracto bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo)
PC = Producto de Control = fracción de PCV1-2 quimérico muerto potenciado con aceite SP 10 % reforzado (sin fracción de *M. hyopneumoniae*)
IM = por vía intramuscular

El día 0, se incluyeron 123 cerdos clínicamente sanos, susceptibles, en este estudio a las tres semanas de edad. Los cerdos se bloquearon por camada y se asignaron aleatoriamente a un grupo centinela (NTX) o uno de los tres grupos de tratamiento (T01-T03); a los que se administraron por vía intramuscular 2 ml de una vacuna experimental de PCV1-2/*M. hyopneumoniae* a la dosis mínima de inmunización (DMI), una vacuna experimental de PCV1-2/*M. hyopneumoniae* a una dosis ligeramente mayor que la DMI o un placebo que contenía PCV1-2 solamente a la DMI. Siete semanas después de la vacunación los cerdos centinela se sacrificaron y se les realizaron necropsia para confirmar la ausencia de *M. hyopneumoniae* y todos los cerdos tratados se expusieron dos veces (en dos días sucesivos) con un homogeneizado virulento de pulmón de *M. hyopneumoniae* vivo. Todos los cerdos restantes se sacrificaron y se les realizaron necropsias cuatro semanas después de la exposición. En la necropsia los pulmones se puntuaron con respecto a las lesiones típicas de *M. hyopneumoniae*. Las lesiones de pulmón después de la exposición son la variable de resultado primario. La vacunación se considera eficaz si el intervalo de confianza al 95 % inferior de la fracción mitigada es >0.

Ensayo de potencia de la vacuna

Se consideró que la serie de vacuna de PCV/M.hyo L1211RK15 descrito anteriormente era el candidato de referencia. En consecuencia, se determinó la potencia relativa tanto para la fracción de M.hyo como para la fracción de PCV2 usada en este estudio de eficacia de M.hyo frente a este candidato de referencia. Estos resultados se presentan en la Tabla 22 a continuación. La serie L1211RK10 corresponde al placebo (sin fracción de M.hyo).

Tabla 22 Resultados de potencia

Serie	Referencia L1211RK15	
	Potencia de M. hyo ¹	Potencia de PCV ²
L1211RK10	0,00	2,33
L1211RK09	1,48	2,20
L1211RK15	1,00	1,07

Los resultados mostrados para cada serie son promedios de todas las repeticiones ensayadas.

¹ Potencia de *M. hyopneumoniae* ensayada en cinco repeticiones.

² Potencia de PCV ensayada en una repetición (L1211RK10) o cinco repeticiones (L1211RK09, L1211RK15).

Serología

Los títulos de anticuerpos de M.hyo indicaron que todos los cerdos eran serológicamente negativos para *M. hyopneumoniae* el día 0 y permanecieron negativos antes de la exposición. En todos los puntos temporales después de la vacunación (días 21, 47 y 75) T02 y T03 tuvieron media geométrica de mínimos cuadrados significativamente mayor ($P \leq 0,0004$) de títulos de anticuerpos de *M. hyopneumoniae* en comparación con T01 (datos de serología no mostrados).

Porcentaje de pulmón total con lesiones

Las distribuciones de frecuencias de puntuaciones de lesiones pulmonares para cada lóbulo de pulmón se

calcularon por tratamiento. El porcentaje de pulmón total con lesiones se calculó usando la siguiente fórmula: Porcentaje de pulmón total con lesiones = $\{(0,10 \times \text{craneal izquierda}) + (0,10 \times \text{media izquierda}) + (0,25 \times \text{caudal izquierda}) + (0,10 \times \text{craneal derecha}) + (0,10 \times \text{media derecha}) + (0,25 \times \text{caudal derecha}) + (0,10 \times \text{accesoria})\}$. La transformación por raíz cuadrada del arco seno se aplicó al porcentaje de pulmón total con lesiones antes del análisis. El porcentaje de pulmón total con lesiones se analizó usando un modelo lineal mixto. Se realizaron comparaciones por pares entre grupos de tratamiento si el efecto del tratamiento fue significativo. Se calcularon las medias de mínimos cuadrados retrotransformadas del porcentaje de pulmón total con lesiones y sus intervalos de confianza al 95 % así como los mínimos y máximos. Las lesiones pulmonares se resumieron con la fracción mitigada estratificada y límites de confianza al 95 %. Los resultados de lesiones pulmonares se presentan en la Tabla 23 a continuación.

Tabla 23 Análisis de porcentaje de pulmón total con lesión

Sumario de medias de mínimos cuadrados						
Grupo	Serie	N	% de pulmón con lesión ¹	Intervalo	Fracción mitigada	
NTX		9	0,1	de 0,0 a 0,8		
Grupo	Serie	N	% de pulmón con lesión ¹	Intervalo	Contraste frente a T01	IC al 95 % ⁴
T01	L1211RK10	36	6,1 ^b	de 0,0 a 32,3		
T02	L1211RK09	36	2,7 ^a	de 0,0 a 23,5	40,9	de 13,3 a 61,8
T03	L1211RK15	38	2,6 ^a	de 0,0 a 49,0	46,9	de 18,2 a 68,3
¹ Media de mínimos cuadrados retrotransformada Los grupos de tratamiento con la misma letra no son significativamente diferentes a valor de P 0,05.						

Se observaron varias lesiones de pulmón de bajo porcentaje en los pulmones de cerdo NTX que se atribuyeron a una incidencia conocida de *Bordetella* en esta piara. El cultivo bacteriano en frotis tisulares de pulmón confirmó que varios cerdos fueron positivos para cultivo de *B. bronchiseptica* y el cultivo de *M. hyopneumoniae* confirmó que todos los cerdos NTX eran negativos para cultivo de *M. hyopneumoniae* antes de la administración de exposición.

El protocolo cumplió los criterios de validez porque las lesiones pulmonares medias de MC para T01 fueron >4 %. Las lesiones pulmonares medias de MC para T02 y T03 fueron significativamente ($P \leq 0,05$) menores que T01 y ambas cumplieron los criterios de fracción mitigada de que el intervalo de confianza al 95 % inferior fuera >0. Los requisitos de validez de este estudio se cumplieron porque no hubo ninguna prueba de exposición previa a *M. hyopneumoniae*. La exposición fue válida porque las puntuaciones medias de lesión pulmonar retrotransformadas en cerdos con placebo (T01) fue >4 %.

En comparación con el grupo de control negativo (T01), los grupos de tratamiento T02 y T03 demostraron una reducción significativa ($P \leq 0,05$) en el porcentaje de pulmón con lesión en comparación con T01. Las fracciones mitigadas para T02 y T03 en comparación con T01 cumplieron los criterios del protocolo para eficacia.

En las condiciones de este estudio, ambas vacunas (T02 y T03) ayudaron a mitigar las lesiones pulmonares, la variable primaria para eficacia. Los resultados en el presente ejemplo demuestran eficacia de M.hyo significativa en una formulación experimental de PCV2/M.hyo en 1 frasco.

Ejemplo 14: Evaluación de actividad viricida contra virus del PRRS

Los estudios presentados en este ejemplo se diseñaron para evaluar las diversas plataformas de adyuvantes para actividad viricida contra virus del PRRS. Los experimentos iniciales se centraron solamente en adyuvante (es decir, las formulaciones no contenían PCV o antígenos de M.hyo). La evaluación de adyuvante para actividad viricida de PRRS se presenta en la Figura 10. La evaluación viricida preliminar indicó que el aceite SP 10 %, Carbopol 0,2 % y Amphigen 2,5 % no son viricidas para virus del PRRS. Por el contrario, el adyuvante de SLCD 20 % parecía ser viricida para virus del PRRS.

Se realizaron estudios adicionales para evaluar si las formulaciones de PCV/M.hyo potenciadas con las diferentes plataformas de adyuvantes no eran viricidas para virus del PRRS. Estos resultados se presentan en la Tabla 24 a continuación, en la que el símbolo * indica las series de vacunas que fueron viricidas para el virus del PRRS.

Tabla 24 Resultados de ensayo viricida de PRRS con diferentes formulaciones

Serie de vacuna usada en estudios de los ejemplo 7, 8, 10			Potencia		Viricida para PRRS	
Estudio	Descripción	N.º de serie	PR de p46 (ur/ds)	PR de PCV2 NVSL	A	B
Ejemplos 7, 8, 10	Solución salina estéril (cloruro de sodio 0,9 %)	87-244-DK (Placebo)				
Ejemplos 7, 8	cPCV (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en aceite SP 10 %	L0411RK08	7,1	1,29	-0,10	-0,13
Ejemplos 7, 8	cPCV (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en Amphigen 5 %	L0411RK09	7,3	1,33	-0,10	+0,14
Ejemplos 7, 8	cPCV (PR 1,6) + M Hyo tratado con Prot A (PR 7,5) en Amph 5 % + SLCD 5 %	L0611RK03	6,9	1,15	-0,36	-0,33
Ejemplo 7	cPCV (PR 1,6) monovalente en SLCD 20 %	L0611RK04		1,50	-1,86*	-0,50
Ejemplo 8	Serie de RespiSure one expirada	A827870	12,6			
Ejemplo 10	cPCV (PR 7,8) + volumen completo de M Hyo (PR 13,3) en aceite SP 10 %	L0411RK15	14	1,03	-0,32	-0,03
Ejemplo 10	cPCV (PR 7,8) + volumen completo de M Hyo (PR 13,3) en Amphigen 5 %	L0411RK16	15,5	1,12	-0,36	-0,53
Ejemplo 10	cPCV (PR 7,8) + volumen completo de M Hyo (PR 13,3) en Amph 5 % + SLCD 5 %	L0611RK05	17,5	1,50	-0,54	-0,33
Ejemplo 10	cPCV (PR 7,8) + volumen completo de M Hyo (PR 13,3) en SLCD 20 % + aceite SP 10 %	L0611RK06	15,9	1,13	-1,93*	-0,99*
*Indica viricida (pérdida >0,7 log) A - TMG de control de ensayo viricida ~ 5,53 log/ml B - TMG de control de ensayo viricida ~ 6,42 log/ml						

Los resultados presentados en la Tabla 24 anterior indican que el aceite SP 10 % no es viricida para virus del PRRS.

Se prepararon series de vacunas de PCV/M.hyo adicionales usando aceite SP 10 % como el adyuvante (Tabla 25). La potencia antigénica de estas series de vacunas se comparó con una serie de vacuna de PCV/M.hyo de referencia (L1211RK15) descrito anteriormente. Los resultados mostrados en la Tabla 25 posterior indican además que el aceite SP 10 % no es viricida para virus del PRRS. Los valores de muestras de ensayo en la Tabla 25 fueron todos más altos (signo +) que el control de ensayo viricida, que tuvo un título medio geométrico (TMG) de aproximadamente 5,9±0,5 log/ml.

Tabla 25 Resultados de ensayo viricida con diferentes formulaciones de PCV/M.hyo potenciadas con aceite SP 10 %

Serie de vacuna usada		Potencia		Viricida para PRRS
Descripción	N.º de serie	PR de p46 (ur/ds) Referencia L1211RK15	PCV2 NVSL Referencia L1211RK15	log10 DICT50/ml
Diluyente estéril (agua estéril)	1949122	nd	nd	
cPCV + M Hyo tratado con Prot A en aceite SP 10 %	L0912RK12	1,62	2,60	+0,58
cPCV + M Hyo tratado con Prot A en aceite SP 10 %	L0912RK10	0,88	1,23	+0,58
cPCV + M Hyo tratado con Prot A en aceite SP 10 %	L0912RK11	1,24	2,62	+0,58

(continuación)

Serie de vacuna usada		Potencia		Viricida para PRRS
Descripción	N.º de serie	PR de p46 (ur/ds) Referencia L1211RK15	PCV2 NVSL Referencia L1211RK15	log10 DICT50/ml
cPCV + M Hyo tratado con Prot A en aceite SP 10 %	L0912RK08	1,08	1,03	+0,91
cPCV + M Hyo tratado con Prot A en aceite SP 10 %	L0912RK09	1,65	2,06	+0,50

TMG de control de ensayo viricida ~ 5,9 ± 0,5 log/ml

Los resultados presentados en este ejemplo demuestran que el aceite SP 10 % no es viricida para virus del PRRS. Los resultados presentados en este ejemplo demuestran adicionalmente que la formulación de PCV/M.hyo potenciada con aceite SP 10 % estaba entre las series de vacunas que no se consideraban viricidas para el virus del PRRS (Tabla 24 y Tabla 25). En conclusión, la formulación de PCV/M.hyo potenciada con aceite SP 10 % se consideró una plataforma eficaz sobre la que basar una combinación trivalente que incluyera PCV, M.hyo y virus del PRRS.

Ejemplo 15: Preparación de una vacuna de combinación de PCV/M.hyo/PRRS

Se proporciona una formulación de PCV/M.hyo potenciada con una plataforma de adyuvante que no es viricida para virus del PRRS (véase Tablas 24 y 25 anteriores), como una composición líquida en un frasco lista para usar. Esta formulación de PCV/M.hyo en 1 frasco emplea sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A. Se ha demostrado la eficacia tanto de M.hyo como de PCV2 en dichas formulaciones de PCV2/M.hyo que emplean sobrenadante de M.hyo tratado con proteína A (véase Ejemplos 7-9). En el presente ejemplo, esta formulación de PCV2/M.hyo divalente se combina con un antígeno de virus del PRRS monovalente.

En una realización, una combinación de PCV/M.hyo en aceite SP 10 % y correspondiente a una de las series de vacuna L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 y L0711RK14 en la Tabla 11 anterior o L1211RK09, L1211RK15, L0112RK03 y L1211RK17 en la Tabla 13 anterior se proporciona como una composición líquida lista para usar en un frasco. Los resultados presentados en el Ejemplo 14 anterior demostraron que el aceite SP 10 % no es viricida para virus del PRRS. El Ejemplo 14 también demostró que las formulaciones de PCV2/M.hyo potenciadas con aceite SP 10 % estaban entre las series de vacunas que no se consideraron viricidas para virus del PRRS. En el presente ejemplo, dicha composición líquida de PCV2/M.hyo en 1 frasco se usa para rehidratar una composición de virus del PRRS vivo modificado genéticamente en un segundo frasco, de modo que todos los antígenos están contenidos en un único frasco antes de administrarse a un cerdo de una edad adecuada (por ejemplo, a las 3 semanas de edad o mayor).

En una realización, el virus del PRRS tiene la secuencia genómica correspondiente a la SEQ ID NO: 16 o una variante de la misma. En otra realización, el virus del PRRS empleado en la composición trivalente es el aislado de virus del PRRS designado ISU-55, que se depositó en la ATCC con el número de referencia VR 2430. Se describen en el presente documento cantidades adecuadas de los antígenos respectivos. Convenientemente, todos los antígenos se administran en una única dosis al cerdo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica multivalente que comprende el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo); y un antígeno de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha separado de material celular insoluble por centrifugación, filtración o precipitación y está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el sobrenadante del cultivo de M.hyo se ha tratado con proteína A o proteína G antes de añadirse a la composición inmunogénica.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el antígeno de PCV2 está en forma de un circovirus quimérico de tipo 1-tipo 2, comprendiendo dicho virus quimérico un circovirus porcino recombinante inactivado de tipo 1 que expresa la proteína ORF2 de circovirus porcino de tipo 2.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno de PCV2 está en forma de una proteína ORF2 recombinante.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que la proteína ORF2 recombinante se expresa a partir de un vector de baculovirus.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además al menos un antígeno adicional es protector contra un microorganismo que puede provocar enfermedad en cerdos, en la que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), parvovirus porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, bacterias leptospiras, *Lawsonia intracellularis*, virus de la gripe porcina (SIV), antígeno de *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus respiratorio porcino, virus de diarrea epidémica porcina (PED), rotavirus, virus torque teno (TTV), citomegalovirus porcino, enterovirus porcinos, virus de la encefalomiocarditis, un patógeno causante de enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica (CSF) y un patógeno causante de gastroenteritis transmisible porcina, o combinaciones de los mismos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende además un adyuvante.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un adyuvante de aceite en agua, un adyuvante de polímero y agua, un adyuvante de agua en aceite, un adyuvante de hidróxido de aluminio, un adyuvante de vitamina E y combinaciones de los mismos.
9. Una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la inmunización de un cerdo contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) y PCV2 que comprende administrar al cerdo la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que la composición se administra en una única dosis.
11. La composición para el uso de la reivindicación 9 o 10, en la que la composición se administra a cerdos que tienen anticuerpos obtenidos por vía materna contra al menos uno de M.hyo y PCV2, o tanto M.hyo como PCV2.
12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la composición se administra a cerdos a las 3 semanas de edad o mayores.
13. Una composición de vacuna que comprende una composición inmunogénica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición de vacuna como se define en la reivindicación 13 para su uso en la protección de cerdos contra la neumonía enzoótica y el síndrome multisistémico consuntivo postdestete (PMWS).
15. Un kit que comprende: un frasco que comprende una composición inmunogénica o de vacuna que incluye tanto un antígeno de PCV2 como el sobrenadante de un cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo), en el que el sobrenadante está exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina como se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 14 y, opcionalmente, que incluye además un manual de instrucciones que contiene la información para administrar la composición inmunogénica.
16. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el procedimiento:
 - i) cultivar M.hyo en un medio adecuado durante periodos que varían de 18 a 144 horas;
 - ii) inactivar posteriormente el cultivo de M.hyo;

- iii) recoger el líquido de cultivo inactivado, en el que el líquido de cultivo inactivado comprende tanto una fracción líquida soluble como material celular insoluble;
- iv) separar la fracción líquida soluble del material celular insoluble mediante filtración, centrifugación o precipitación;
- 5 v) eliminar tanto IgG como inmunocomplejos de antígeno/inmunoglobulina de la fracción líquida soluble separada para formar el sobrenadante de cultivo de M. hyo exento tanto de (i) IgG como de (ii) inmunocomplejos compuestos de antígeno unido a inmunoglobulina; y
- vi) posteriormente combinar el sobrenadante con un antígeno de PCV2.

Figura 1

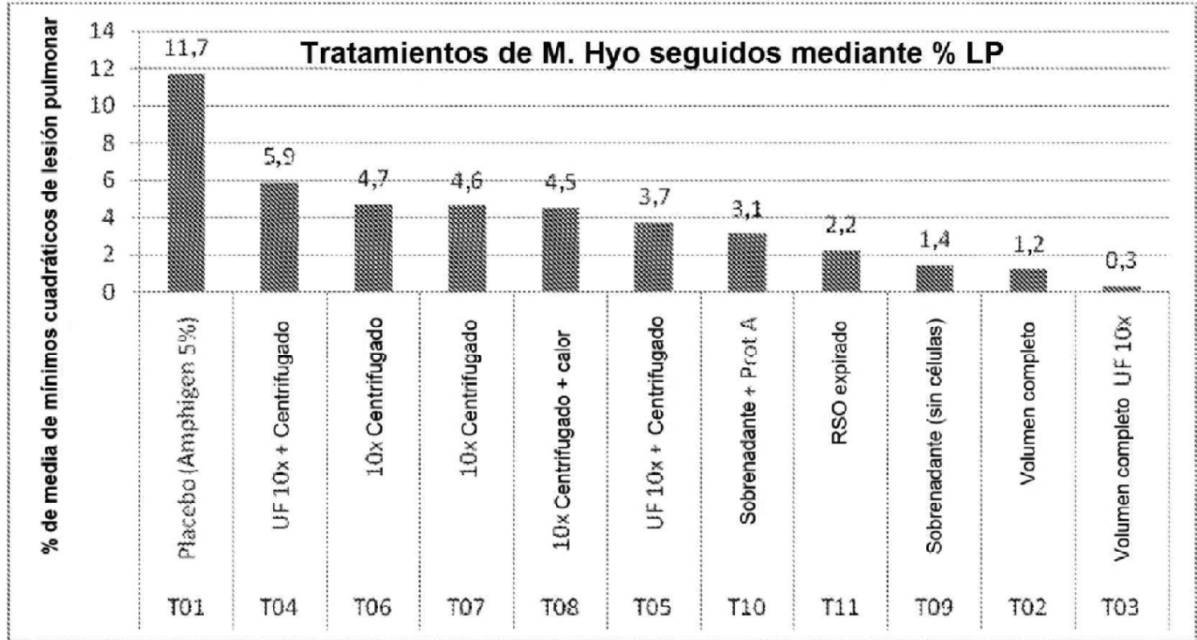


Figura 2

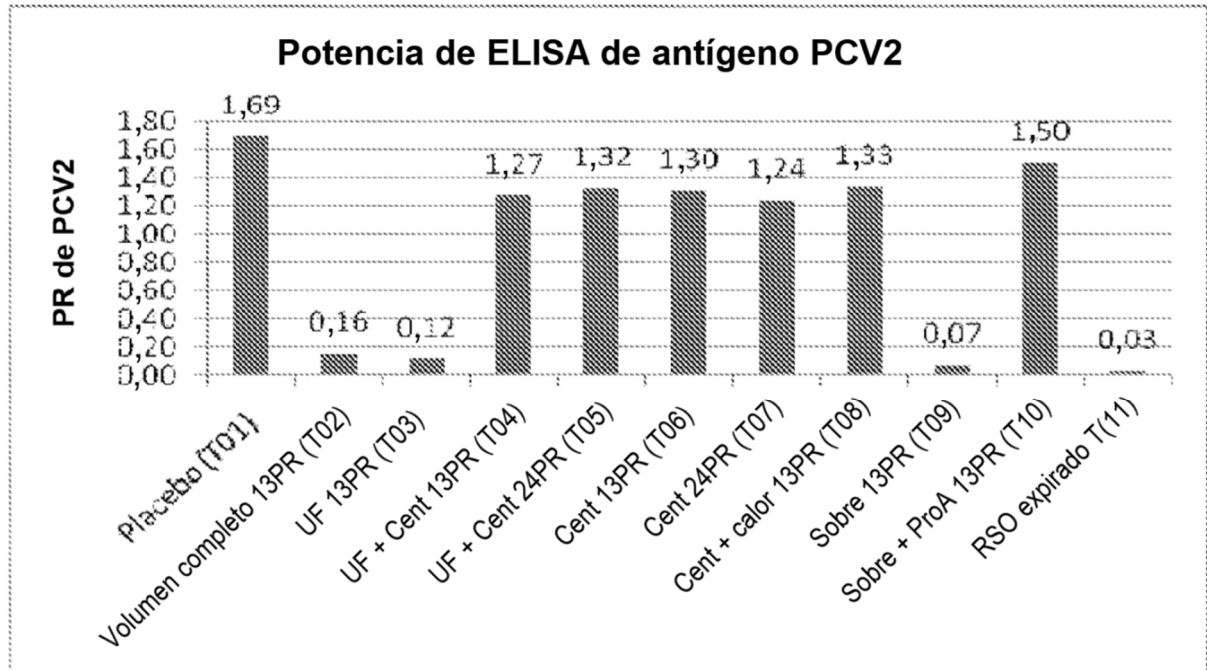


Figura 3

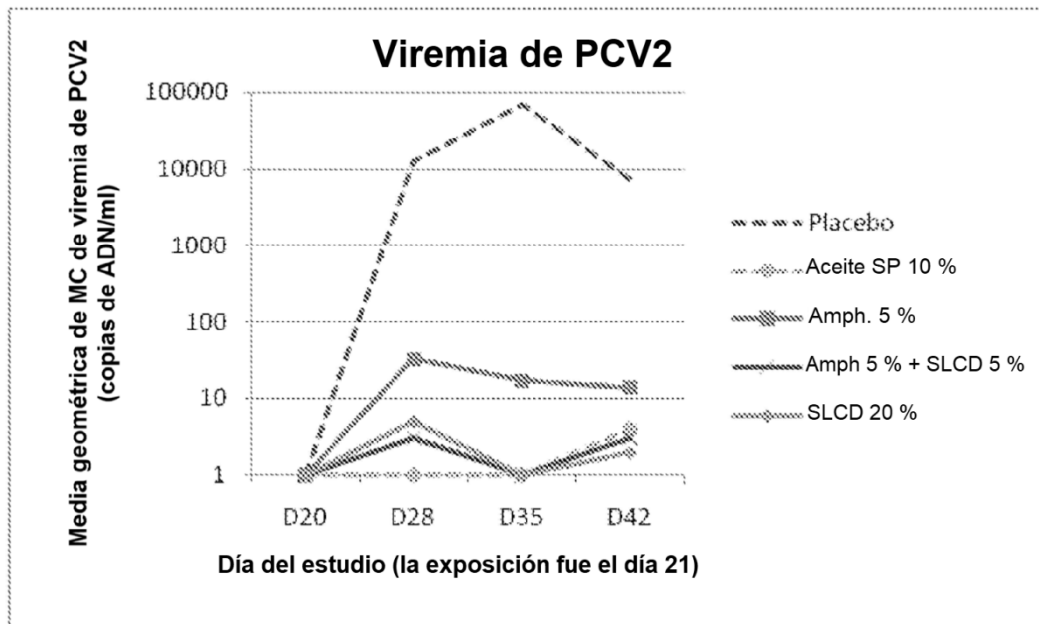


Figura 4

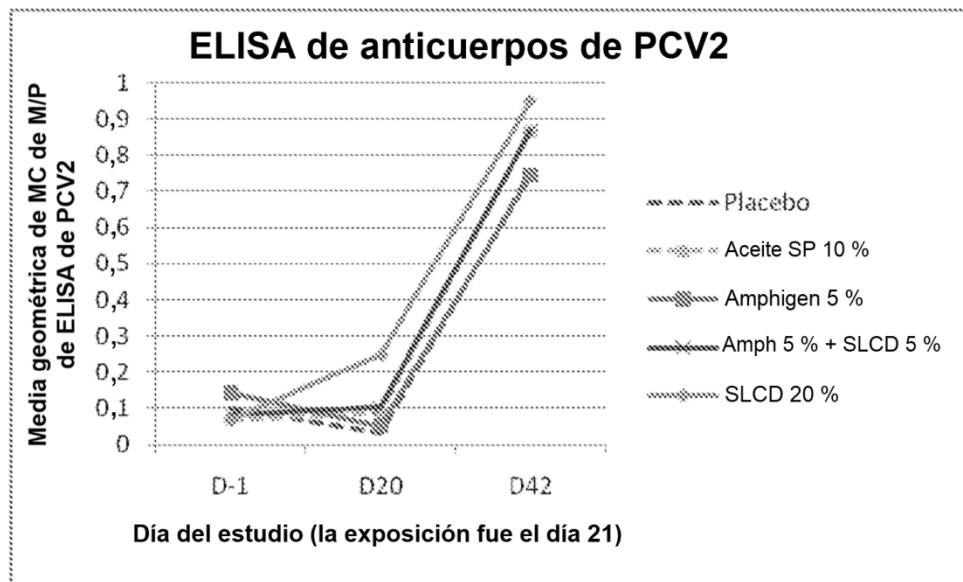


Figura 5

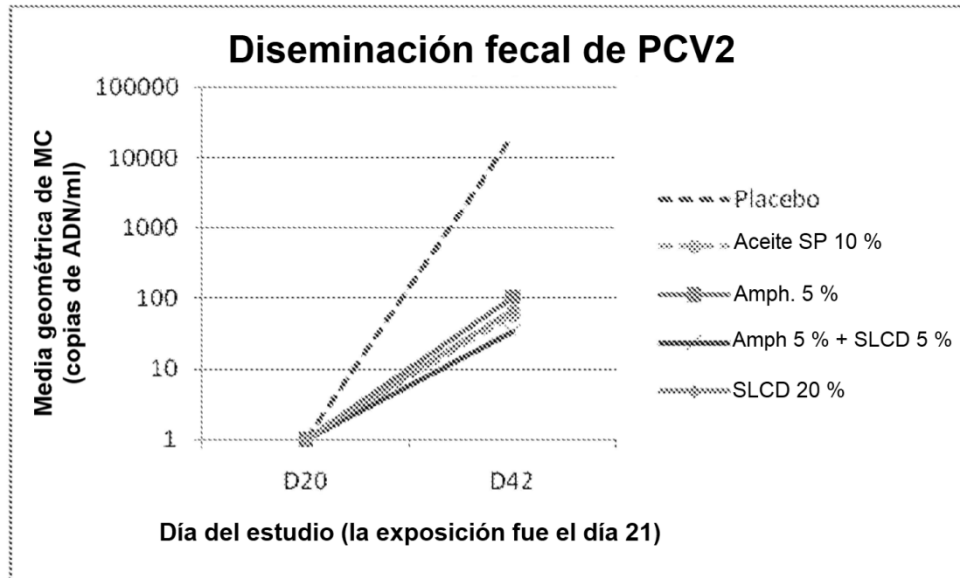


Figura 6

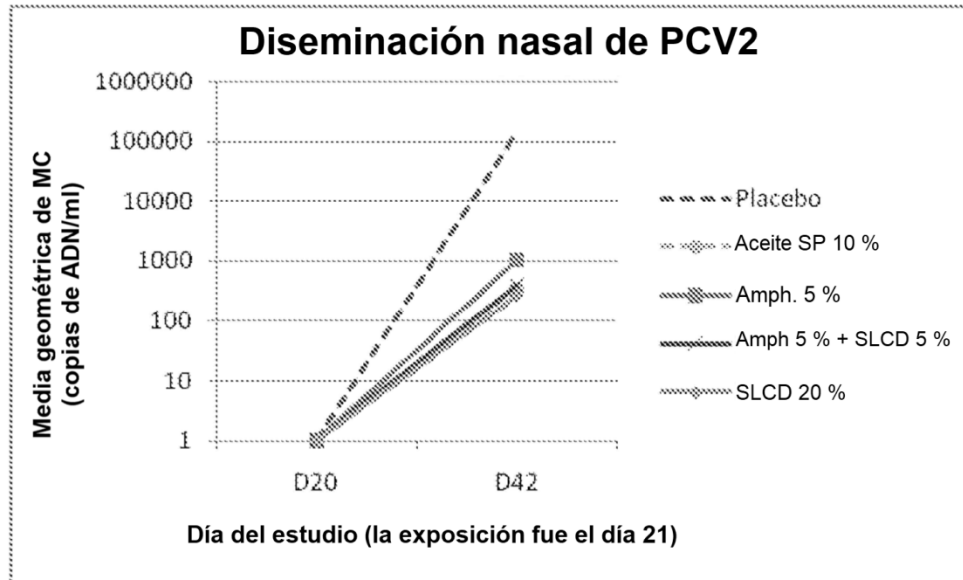


Figura 7A

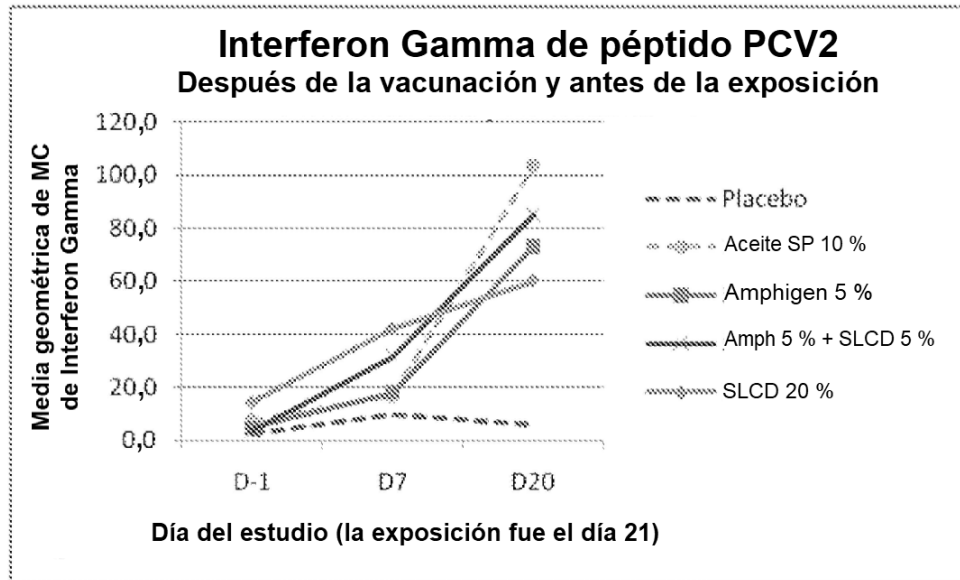


Figura 7B

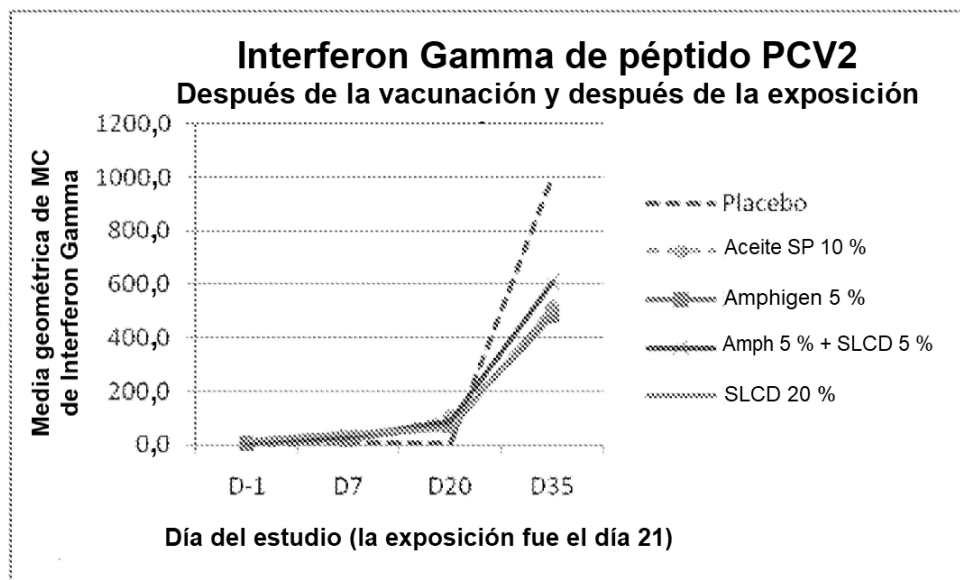


Figura 8A

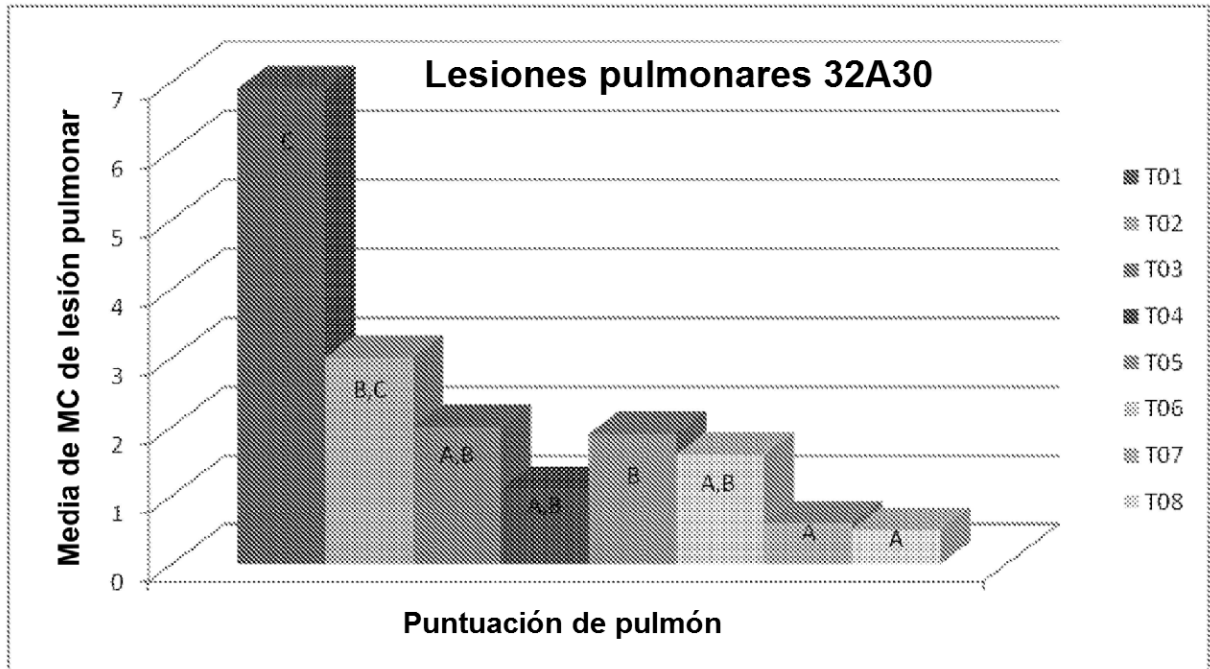


Figura 8B

Contraste	Fracción mitigada	Intervalo de confianza del 95 %
T01 frente a T02	41,2	-5,9 a 76,5
T01 frente a T03	64,7	29,4 a 100
T01 frente a T04	76,5	41,2 a 100
T01 frente a T05	73,3	33,3 a 100
T01 frente a T06	62,5	25 a 100
T01 frente a T07	87,5	62,5 a 100
T01 frente a T08	88,2	64,7 a 100

Figura 9

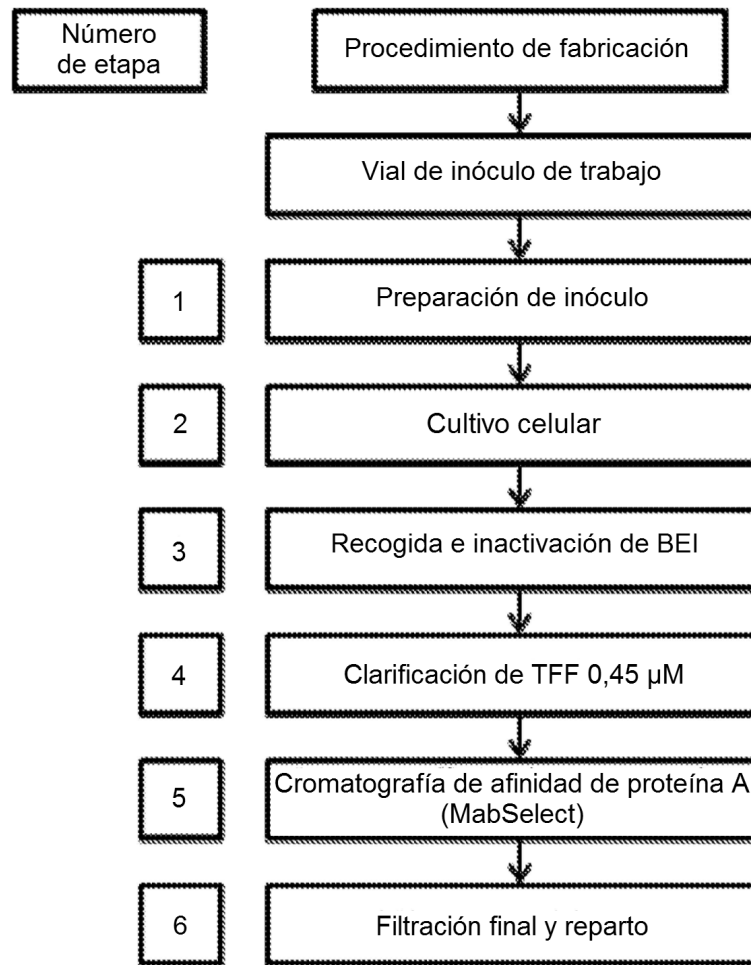


Figura 10

Actividad viricida preliminar	Diferencia con respecto al agua			
	rehid. 100 %	90/10	90/10	Actividad viricida promedio
	Título lío­filizado	Liq. (DMEM) 90/10	Liq. (Ultra) 90/10	
SLCD 20 %	0,8	0,7	2,0	1,3
Carbopol 0,2 %	0,3	-0,3	0,2	-0,1
Aceite SP 10 %	0,2	0,0	0,0	0,0
Aceite SP 10 %/Carbopol 0,2 %	0,3	-0,2	0,0	-0,1
SLCD 20 %/aceite SP 10 %	1,0	0,3	0,7	0,5
SLCD 20 %/aceite SP 10 %/Carbopol 0,2 %	0,2	0,0	0,5	0,3
Amphigen 5 % (a partir de reserva 40 %)	1,0	0,7	1,5	1,1
Amphigen 2,5 % (a partir de reserva 40 %)	ND	-0,2	ND	-0,2
Amphigen 5 % (a partir de reserva 20 %)	ND	0,8	ND	0,8
Amphigen 2,5 % (a partir de reserva 20 %)	ND	0,2	ND	0,2
Amphigen 5 % (a partir de reserva 40 %)	ND	1,3	ND	1,3
Amphigen 2,5 % (a partir de reserva 40 %)	ND	0,8	ND	0,8
	Indica actividad viricida potencial			